

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 125**

51 Int. Cl.:

C07K 14/74 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2015 PCT/EP2015/055097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15136001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2015 E 15709185 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3116902**

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

30 Prioridad:

11.03.2014 DK 201470119

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

10.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 782 125 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para generar linfocitos T compatibles para trasplante alogénico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a linfocitos T modificados por ingeniería, a un método para su preparación y a su uso como medicamento, particularmente para inmunoterapia. Los linfocitos T modificados por ingeniería de la invención se caracterizan, entre otras cosas, por que la expresión de beta-2-microglobulina (B2M) y/o transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CIITA) se inhibe, por ejemplo, mediante el uso de endonucleasas de sitio de corte poco frecuente capaces de inactivar selectivamente mediante la escisión del ADN el gen que codifica B2M y/o CIITA, o mediante el uso de moléculas de ácido nucleico que inhiben la expresión de B2M y/o CIITA. Para hacer que los linfocitos T no sean reactivos, se inactiva al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T, por ejemplo, mediante el uso de endonucleasas de sitio de corte poco frecuente capaces de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica dicho componente TCR. Adicionalmente, se puede realizar una etapa de expresión del polipéptido inmunosupresor, tal como el homólogo de MHC1 viral o el ligando NKG2D en dichos linfocitos T modificados para prolongar la supervivencia de dichos linfocitos T modificados en el organismo huésped. Dicho linfocito T modificado es particularmente adecuada para trasplantes alogénicos, especialmente porque reduce tanto el riesgo de rechazo por parte del sistema inmunitario del huésped como el riesgo de desarrollar enfermedad de injerto contra huésped. La invención abre el camino a estrategias de inmunoterapia adoptiva estándar y asequibles que usan linfocitos T para tratar el cáncer, infecciones y enfermedades autoinmunes.

25 **Antecedentes de la invención**

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

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

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

En el mejor de los casos, se querría usar una terapia normalizada en la que las células terapéuticas alogénicas podrían prefabricarse, caracterizarse en detalle y estar disponibles para administración inmediata a pacientes. Por alogénico se entiende que las células se obtienen de individuos que pertenecen a la misma especie pero son genéticamente diferentes. Sin embargo, el uso de células alogénicas tiene en la actualidad muchas desventajas. En hospedadores inmunocompetentes las células alogénicas son rechazadas rápidamente, un proceso denominado rechazo de hospedador frente a injerto (HvG) y esto limita sustancialmente la eficacia de las células transferidas. En

huéspedes inmunocompetentes, las células alogénicas son capaces de injertarse, pero sus especificidades de los receptores de linfocitos T endógenos (TCR) pueden reconocer el tejido del huésped como extraño, lo que da como resultado enfermedad de injerto contra el hospedador (GvHD), lo que puede conducir a daño tisular grave y muerte.

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

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

25 La proteína CIITA (SEQ ID NO: 4 - secuencia de referencia en NCBI: NP_000237.2) que actúa como un regulador positivo de la transcripción génica del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, incluyendo la transcripción del gen β 2m y a menudo se denomina "factor de control maestro" para la expresión de estos genes. El ARNm de CIITA (SEQ ID NO: 5) solo puede detectarse en líneas y tejidos de células positivas para el sistema de antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II. Esta distribución tisular altamente restringida sugiere que la expresión de genes DE HLA clase II está en gran medida bajo el control de CIITA (Mach B., et al., 1994).

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

45 Las células NK ejercen funciones citotóxicas hacia las células con las que interactúan en función del equilibrio entre las señales activadoras e inhibitoras que recibieron a través de diferentes receptores monomórficos o polimórficos. Un receptor activador central en las células NK humanas es NKG2D y sus ligandos incluyen proteínas tales como MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, ULBP3 [Raulet DH, (2003), *Nature Reviews Immunology* 3 (10): 781-79]. Por otro lado, la señal inhibitoria está mediada por la interacción entre los receptores NK como LIR-1/ILT2 y moléculas de MHC de clase I [Ljunggren HG et al. (1990), *Immunol Today*. 11:237-244]. Algunos virus, tales como los citomegalovirus, han adquirido mecanismos para evitar la vigilancia inmunitaria mediada por las células NK. El genoma del HCMV codifica proteínas que pueden prevenir la expresión en la superficie del MHC de clase I (es decir, US2, US3, US6 y US11) al tiempo que expresa una proteína homóloga del MHC de clase I (UL18) que actúa como señuelo para bloquear la lisis celular mediada por NK [Kim, Y et al. (2008), *PLOS Pathogens*. 4: e1000123 y Wilkinson G. et al. (2010). *J Clin Virol*. 41(3):206-212]. Además, el HCMV interfiere con la ruta del NKG2D secretando una proteína capaz de unirse a los ligandos NKG2D y evitar su expresión en la superficie [Welte SA et al. (2003), *Eur J Immunol* 33 (1): 194-203]. En células tumorales, algunos mecanismos han evolucionado para evadir la respuesta de NKG2D secretando ligandos de NKG2D, tales como ULBP2, MICB o MICA (Waldhauer I, Steinle A (2003). La liberación proteolítica de la proteína 2 de unión a UL16 soluble de las células tumorales. *Cancer Res* 2006; 66(5): 2520-2526; Salih HR et al. (2006), *Hum Immunol*. 2006 Mar;67(3):188-95; Salih HR et al. (2003) *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1389-96; Salih HR et al. (2002) *J Immunol*.;169(8):4098-102].

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

Sumario de la invención

5 La presente invención concierne métodos para preparar linfocitos T modificados por ingeniería, en particular linfocitos T alogénicos obtenidos de un donante, para que sean adecuados para fines de inmunoterapia. Los métodos de la presente invención permiten más particularmente la modulación precisa de la expresión de ciertas moléculas efectoras importantes para el reconocimiento inmunitario y la histocompatibilidad.

10 Según un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un linfocito T modificado, preferentemente un linfocito T alogénico obtenido de un donante, que comprende las etapas de:

- a) inhibir la expresión de beta 2-microglobulina (B2M) y/o transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CIITA) en dicho linfocito T que se ha proporcionado; y
 - 15 b) inactivar al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) en dichos linfocitos T; y
 - c) introducir en dicho linfocito T una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada.
- 20

De acuerdo con determinadas realizaciones, la inhibición de la expresión de B2M se logra mediante una modificación del genoma, más particularmente a través de la expresión en el linfocito T de una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivarse selectivamente por escisión de ADN del gen que codifica B2M, tal como el gen $\beta 2m$ humano establecido en la SEQ ID NO:2 (NCBI Secuencia de referencia: NG_012920.1), o un gen que tiene al menos un 70 %, tal como al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 99 %, de identidad de secuencia con el gen $\beta 2m$ humano establecido en la SEQ ID NO:2 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 2. Dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede ser una nucleasa TAL, meganucleasa, nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o endonucleasa guiada por ARN (tal como Cas9).

25

30

De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la inhibición de la expresión de B2M se logra utilizando (por ejemplo, introduciendo en el linfocito T) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente (por ejemplo, se une) en condiciones celulares al ARNm celular y/o el ADN genómico que codifica B2M, inhibiendo de ese modo la transcripción y/o traducción del gen. De acuerdo con realizaciones particulares, la inhibición de la expresión de B2M se logra mediante el uso ((por ejemplo, la introducción en el linfocito T) de un oligonucleótido antisentido, ribozima o molécula de ARN interferente (ARNi). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de la complementaria de la SEQ ID NO:3 (es decir, el ARNm que codifica la B2M humana; secuencia de referencia de NCBI: NM_004048).

35

De acuerdo con determinadas realizaciones, la inhibición de la expresión de CIITA se logra mediante una modificación del genoma, más particularmente a través de la expresión en el linfocito T de una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivarse selectivamente por escisión de ADN del gen que codifica CIITA, tal como el gen de CIITA humano (Secuencia de referencia NCBI: NG_009628.1), o un gen que tiene al menos un 70 %, tal como al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 99 %, de identidad de secuencia con el gen de CIITA humano de acuerdo con NG_009628.1 en toda la longitud del gen de CIITA humano de acuerdo con NG_009628.1. Dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede ser una nucleasa TAL, meganucleasa, nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o endonucleasa guiada por ARN (tal como Cas9).

40

45

De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la inhibición de la expresión de CIITA se logra usando (por ejemplo, introduciendo en el linfocito T) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente (por ejemplo, se une) en condiciones celulares al ARNm celular y/o ADN genómico que codifica CIITA, inhibiendo de ese modo la transcripción y/o traducción del gen. De acuerdo con realizaciones particulares, la inhibición de la expresión de CIITA se logra mediante el uso ((por ejemplo, la introducción en el linfocito T) de un oligonucleótido antisentido, ribozima o molécula de ARN interferente (ARNi). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de la complementaria de la SEQ ID NO:5 (es decir, el ARNm que codifica la isoforma 2 de la CIITA humana).

50

55

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

60

65

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

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona en un aspecto adicional linfocitos T aislados modificados por ingeniería que expresan un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada, que se caracterizan además porque i) se inhibe la expresión de beta 2-microglobulina (B2M) y/o transactivador del complejo de histocompatibilidad mayor de clase II (CIITA); y ii) al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) está inactivo.

15 De acuerdo con determinadas realizaciones, se proporciona un linfocito T que expresa una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica B2M. Más particularmente, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente, que puede ser una TAL-nucleasa, meganucleasa, nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o endonucleasa guiada por ARN.

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

25 De acuerdo con determinadas realizaciones, se proporciona un linfocito T que expresa una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica CIITA. Más particularmente, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógena que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente, que puede ser una TAL-nucleasa, meganucleasa, nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o endonucleasa guiada por ARN.

30 De acuerdo con ciertas otras realizaciones, se proporciona un linfocito T que comprende una molécula de ácido nucleico exógena que inhibe la expresión de CIITA. De acuerdo con realizaciones particulares, dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, ribozima o molécula de ARN interferente (ARNi). De acuerdo con realizaciones preferidas, dicha molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de la complementaria de SEQ ID NO:5.

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

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

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

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

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

5 Por tanto, la presente invención proporciona además un linfocito T modificado por ingeniería o una composición, tal como una composición farmacéutica, que comprende el mismo para su uso como medicamento. De acuerdo con determinadas realizaciones, la composición o linfocito T modificado por ingeniería es para su uso en el tratamiento de un cáncer y, más particularmente, para su uso en el tratamiento del linfoma. De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la composición o linfocito T modificado por ingeniería es para su uso en el tratamiento de infección vírica. De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la composición o linfocito T modificado por ingeniería es para su uso el tratamiento de infecciones bacterianas.

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

Breve descripción de los dibujos

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

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

25 **Figura 3:** Comparación de la distribución de dispersión frontal lateral (FSC), un indicador del tamaño celular, entre células positivas para TCR y negativas para TCR.

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

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

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

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

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

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

alogenicos por KO de B2M combinada con la expresi3n del ligando NKG2D soluble fortalece su protecci3n inmunosupresora.

5 **Figura 10:** An3lisis FACS de la expresi3n de β 2-m en linfocitos T. Los linfocitos T no transfectados (arriba) y transfectados (centro y abajo) se analizan mediante FACS para determinar la viabilidad (izquierda) y la expresi3n de β 2-m (derecha).

Descripci3n detallada de la invenci3n

10 Salvo que se defina especifcamente en este documento, todos los t3rminos t3cnicos y cientifcos utilizados tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia en los campos de la terapia g3nica, bioquimica, gen3tica y biologfa molecular.

15 Todos los m3todos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar en la pr3ctica o el ensayo de la presente invenci3n, con m3todos y materiales adecuados que se describen en este documento. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecer3. Adem3s, los materiales, m3todos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes, a menos que se especifique de otra manera.

20 La pr3ctica de la presente invenci3n emplear3, a menos que se indique lo contrario, t3cnicas convencionales de biologfa celular, cultivo celular, biologfa molecular, biologfa transg3nica, microbiologfa, ADN recombinante e inmunologfa, que est3n dentro de la experiencia en la materia. Tales t3cnicas se explican por completo en la bibliograffa. V3ase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera edici3n, (Sambrook *et al*, 2001, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 25 1984); Mullis *et al*. Patente de Estados Unidos N.3 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries y S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); la serie, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson y M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., Nueva York, especifcamente, vol. 154 y 155 (Wu *et al*. eds.) y vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Vol3menes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); y Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

M3todos para preparar linfocitos T modificados por ingenierfa

40 En un aspecto general, la presente invenci3n se refiere a m3todos para preparar linfocitos T modificados por ingenierfa, en particular linfocitos T alog3nicos obtenidos de un donante.

En consecuencia, la presente invenci3n proporciona un m3todo para preparar un linfocito T modificado, preferentemente un linfocito T alog3nico obtenido de un donante, comprendiendo dicho m3todo las etapas de:

45 a) inhibir la expresi3n de beta 2-microglobulina (B2M) y/o transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CIITA) en dicho linfocito T que se ha proporcionado;

50 b) inactivar al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) en dichos linfocitos T; y

c) introducir en dicho linfocito T una mol3cula de 3cido nucleico ex3geno que comprende una secuencia de nucle3tidos que codifica un Receptor de Ant3geno Quim3rico (CAR) dirigido contra al menos un ant3geno expresado en la superficie de una c3lula maligna o infectada.

55 De acuerdo con determinadas realizaciones, el m3todo comprende inhibir la expresi3n de beta 2-microglobulina (B2M). Como alternativa, o adem3s, el m3todo puede comprender inhibir la expresi3n del transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CIITA).

60 De acuerdo con determinadas realizaciones, la inhibici3n de la expresi3n de B2M se logra mediante una modificaci3n del genoma, m3s particularmente a trav3s de la expresi3n en el linfocito T de una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisi3n de ADN el gen que codifica B2M (por ejemplo, el gen β 2m humano expuesto en la SEQ ID NO:2).

65 De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la inhibici3n de la expresi3n de CIITA se logra mediante una modificaci3n del genoma, m3s particularmente a trav3s de la expresi3n en el linfocito T de una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivarse selectivamente por escisi3n del ADN del gen que codifica CIITA (por ejemplo, el

gen CIITA humano).

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

Una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente que se usará de acuerdo con la presente invención para inactivar el gen de $\beta 2m$ puede, por ejemplo, ser una TAL-nucleasa, meganucleasa, nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o endonucleasa guiada por ARN (tal como Cas9).

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

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

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

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

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

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

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

Una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente que se usará de acuerdo con la presente invención para inactivar el gen CIITA puede, por ejemplo, ser una TAL-nucleasa, meganucleasa, nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o endonucleasa guiada por ARN (tal como Cas9).

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

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

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

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

10 Para expresarse en el linfocito T, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede introducirse en la célula por medio de una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente. De acuerdo con realizaciones particulares, el método de la invención comprende además introducir en dicho linfocito T una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende
15 una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente, preferentemente, una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica CIITA (por ejemplo, el gen de CIITA humano).

20 Como resultado, se obtiene un linfocito T modificado por ingeniería que expresa una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente, preferentemente una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica CIITA. Por consiguiente, la inactivación del gen CIITA por dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente conduce a la inhibición de la expresión de CIITA en el linfocito T modificado por ingeniería. Por lo tanto, se obtiene un linfocito T modificado por ingeniería que se caracteriza porque la expresión de CIITA está inhibida. De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la inhibición de la expresión de B2M
25 se logra utilizando (por ejemplo, introduciendo en el linfocito T) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente (por ejemplo, se une) en condiciones celulares al ARNm celular y/o el ADN genómico que codifica B2M, inhibiendo de ese modo la transcripción y/o traducción del gen. De acuerdo con realizaciones particulares, la inhibición de la expresión de B2M se logra mediante el uso (por ejemplo, la introducción en el linfocito T) de un oligonucleótido antisentido, ribozima o molécula de ARN interferente (ARNi).

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

De acuerdo con otras realizaciones particulares, la molécula de ácido nucleico es una ribozima, preferentemente una ribozima en cabeza de martillo.

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

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

45 Dado que la B2M es un componente estructural importante del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la inhibición de la expresión de B2M conduce a una reducción o eliminación de moléculas del MHC sobre la superficie del linfocito T modificado por ingeniería. Por consiguiente, el linfocito T modificado por ingeniería ya no presenta antígenos sobre la superficie que son reconocidos por las células C8+. Especialmente en el caso de un linfocito T alogénico obtenido de un donante, la reducción o eliminación de moléculas de MHC que presentan antígeno no propio en la superficie del linfocito T evita que el linfocito T modificado por ingeniería, cuando se infunde en un huésped alogénico, sea reconocido por los linfocitos CD8+ del huésped. Esto hace que el linfocito T modificado por ingeniería sea especialmente adecuado para trasplantes alogénicos, especialmente porque reduce el riesgo de rechazo por el sistema inmunológico del huésped.
50

55 De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la inhibición de la expresión de CIITA se logra usando (por ejemplo, introduciendo en el linfocito T) una molécula de ácido nucleico que hibrida específicamente (por ejemplo, se une) en condiciones celulares al ARNm celular y/o ADN genómico que codifica CIITA, inhibiendo de ese modo la transcripción y/o traducción del gen. De acuerdo con realizaciones particulares, la inhibición de la expresión de CIITA se logra mediante el uso (por ejemplo, la introducción en el linfocito T) de un oligonucleótido antisentido, ribozima o molécula de ARN interferente (ARNi).
60

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

65 Según otra realización particular, la molécula de ácido nucleico es una ribozima, preferentemente una ribozima en cabeza de martillo.

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

Como resultado, se obtiene un linfocito T modificado por ingeniería que se caracteriza porque la expresión de CIITA está inhibida.

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

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

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

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

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

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

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

Para expresarse en el linfocito T, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede introducirse en la célula por medio de una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente. De acuerdo con realizaciones particulares, el método de la invención comprende además introducir en dicho linfocito T una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivarse

selectivamente por escisión de ADN, preferentemente rotura de la doble cadena, al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR).

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

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

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

Endonucleasa de sitio de corte poco frecuente

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

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

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

65 En otras realizaciones particulares, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente también puede ser una

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

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

En otras realizaciones particulares, dicha endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una "nucleasa TALE" o una "MBBBD-nucleasa" resultante de la fusión de un dominio de unión al ADN normalmente derivado de proteínas efectoras activadoras de la transcripción (TALE) o de un dominio de unión base por base modular (MBBBD), con un dominio catalítico que tiene actividad endonucleasa. Tal dominio catalítico generalmente proviene de enzimas, tal como por ejemplo I-TevI, Cole7, NucA y Fok-I. La nucleasa TALE se puede conformar en formas monoméricas o diméricas, dependiendo del dominio catalítico seleccionado (documento WO2012138927). Dichas nucleasas TALE modificadas por ingeniería están disponibles comercialmente bajo el nombre comercial TALEN™ (Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 París, Francia). En general, el dominio de unión al ADN deriva de un efector de tipo activador de transcripción (TALE), en el que la especificidad de secuencia es impulsada por una serie de repeticiones de 33-35 aminoácidos que se originan de las proteínas bacterianas de *Xanthomonas* o *Ralstonia AvrBs3*, PthXo1, AvrHah1, PthA, Tal1c como ejemplos no limitantes. Estas repeticiones difieren esencialmente en dos posiciones de aminoácidos que especifican una interacción con un par de bases (Boch, Scholze *et al.* 2009; Moscou y Bogdanove 2009). Cada par de bases en el objetivo de ADN se pone en contacto con una sola repetición, con la especificidad resultante de los dos aminoácidos variantes de la repetición (el denominado dipéptido variable de repetición, RVD). Los dominios de unión a TALE pueden comprender además un dominio de translocación N-terminal responsable del requisito de una primera base de timina (T0) de la secuencia objetivo y un dominio C-terminal que contiene señales de localización nuclear (NLS). Un dominio de unión a ácido nucleico TALE generalmente corresponde a un armazón de TALE central modificado por ingeniería que comprende una pluralidad de secuencias repetidas TALE, comprendiendo cada repetición un RVD específico para cada base de nucleótidos de un sitio de reconocimiento TALE. En la presente invención, cada secuencia de repetición TALE de dicho armazón central está hecha de 30 a 42 aminoácidos, más preferentemente 33 o 34, en el que dos aminoácidos críticos (el denominado dipéptido variable de repetición, RVD) ubicado en las posiciones 12 y 13 median en el reconocimiento de un nucleótido de dicha secuencia del sitio de unión a TALE; dos aminoácidos críticos equivalentes se pueden localizar en posiciones distintas de 12 y 13, especialmente en la secuencia de repetición TALE más alta que 33 o 34 aminoácidos de longitud. Preferentemente, los RVD asociados con el reconocimiento de los diferentes nucleótidos son HD para reconocer C, NG para reconocer T, NI por reconocer A, NN para reconocer G o A. En otra realización, los aminoácidos críticos 12 y 13 pueden mutar hacia otros restos de aminoácidos para modular su especificidad hacia los nucleótidos A, T, C y G, y en particular para mejorar esta especificidad. Un dominio de unión a ácido nucleico TALE generalmente comprende entre 8 y 30 secuencias repetidas de TALE. Más preferentemente, dicho armazón central de la presente invención comprende entre 8 y 20 secuencias repetidas TALE; de nuevo más preferentemente 15 secuencias repetidas TALE. También puede comprender una secuencia de repetición TALE única truncada adicional hecha de 20 aminoácidos ubicados en el extremo C de dicho conjunto de secuencias de repetición TALE, es decir, una secuencia de repetición de semi-TALE en C-terminal adicional. Otros dominios modulares de unión a ácido nucleico específicos de base por base (MBBBD) se describen en el documento WO 2014/018601. Dichos MBBBD pueden modificarse por ingeniería, por ejemplo, a partir de proteínas recién identificadas, a saber, EAV36_BURRH, E5AW43_BURRH, E5AW45_BURRH y E5AW46_BURRH del genoma recientemente secuenciado

de los hongos endosimbiontes *Burkholderia Rhizoxinica*. Estos polipéptidos de unión a ácido nucleico comprenden módulos de aproximadamente 31 a 33 aminoácidos que son específicos de base. Estos módulos muestran menos del 40 % de identidad de secuencia con repeticiones comunes de TALE de *Xanthomonas* y presentan más variabilidad de secuencia de polipéptidos. Los diferentes dominios de las proteínas anteriores (módulos, extremos N y C) de *Burkholderia* y *Xanthomonas* son útiles para diseñar nuevas proteínas o armazones que tengan propiedades de unión a secuencias de ácido nucleico específicas y pueden combinarse para formar proteínas quiméricas TALE-MBBBD.

Moléculas inhibidoras de ácido nucleico

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

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

La presente invención también contempla el uso de moléculas de ácido nucleico que inhiben la expresión de CIITA. Más particularmente, el ácido nucleico puede ser un oligonucleótido antisentido, ribozima o molécula de ARN interferente (ARNi). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de la complementaria de SEQ ID NO:5.

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

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

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

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

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

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

Se puede administrar un oligonucleótido antisentido a la célula, por ejemplo, en forma de un vector de expresión, tal

como un plásmido o un vector viral, que, cuando se transcribe en las células, produce ARN que es complementario de al menos una porción única del ARNm celular para B2M. Como alternativa, el oligonucleótido antisentido puede generarse *ex vivo* e introducirse en la célula por cualquier medio conocido en la técnica. El oligonucleótido antisentido puede sintetizarse *ex vivo* mediante un método estándar conocido en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como un sintetizador de ADN automatizado disponible comercialmente de, por ejemplo, Applied Biosystems). Se han desarrollado varios métodos para administrar ADN o ARN antisentido a las células, por ejemplo, mediante inyección directa o mediante modificación diseñada para apuntar a la célula deseada (por ejemplo, usando oligonucleótidos antisentido unidos a péptidos o anticuerpos que se unen específicamente a receptores o antígenos expresados en la superficie de la célula objetivo.

De acuerdo con realizaciones preferidas, se usa un vector de ADN recombinante en el que una secuencia de nucleótidos que codifica un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de B2M o CIITA se coloca bajo el control de un promotor, tal como un promotor fuerte de pol III o pol II. El uso de tal construcción para transfectar una célula objetivo, tal como un linfocito T, dará como resultado la transcripción de una cantidad suficiente de ARN monocatenario que formará pares de bases complementarias con el transcrito endógeno y, por lo tanto, evitará la traducción del ARNm de B2M o CIITA. Según estas realizaciones, un vector de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el oligonucleótido antisentido se introduce en la célula donde se produce la transcripción de un ARN antisentido. Tal vector puede permanecer episomal o estar cromosómicamente integrado, siempre que pueda transcribirse para producir el ARN antisentido. La expresión de la secuencia que codifica el ARN antisentido puede ser por cualquier promotor conocido en la técnica que actúa en mamíferos, preferentemente células humanas. Dicho promotor puede ser inducible o constitutivo. Los promotores de ejemplo incluyen, pero sin limitación, la región promotora temprana de SV40, conteniendo el promotor la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous, el promotor de la timidina del herpes y las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína.

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

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

De acuerdo con otras realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de la complementaria de la SEQ ID NO:5. En el caso de una molécula bicatenaria, dicho oligonucleótido antisentido bicatenario comprende una primera cadena que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO:5 y una segunda cadena complementaria de dicha primera cadena. En el caso de una molécula monocatenaria, dicho oligonucleótido monocatenario comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos de la complementaria de SEQ ID NO:5.

El oligonucleótido antisentido puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria de una región no codificante o codificante del ARNm de B2M o CIITA. De acuerdo con realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de nucleótidos complementaria al extremo 5' del ARNm de B2M o CIITA, por ejemplo, la secuencia no traducida en 5' hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG. De acuerdo con otras realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia no traducida en 3' del ARNm de B2M o CIITA. De acuerdo con otras realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de la región codificante del ARNm de B2M o CIITA. Ya sea que esté diseñado para hibridarse con la región 5', 3' o de codificación del ARNm de B2M o CIITA, un oligonucleótido antisentido debe tener al menos seis nucleótidos de longitud, preferentemente al menos 10 nucleótidos de longitud y tiene, preferentemente, menos de aproximadamente 100 y, más preferentemente, menos de aproximadamente 50, 25, 20, 15 o 10 nucleótidos de longitud. De acuerdo con realizaciones preferidas, el oligonucleótido antisentido tiene de 6 a 25, tal como de 10 a 25 nucleótidos de longitud.

Según otras realizaciones particulares, una molécula de ribozima diseñada para escindir catalíticamente el transcrito de ARNm de B2M o CIITA se usa para evitar la traducción y expresión de B2M o CIITA en el linfocito T, respectivamente (véase, por ejemplo, los documentos s WO 90/11364 y US 5.093.246 para orientación general). De acuerdo con realizaciones preferidas, la ribozima es una ribozima en cabeza de martillo. Las ribozimas en cabeza de martillo escinden los ARNm en ubicaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm objetivo, por ejemplo, el ARNm de B2M, tal como el ARNm de B2M humano expuesto en la SEQ ID NO:3. El único requisito es que el ARNm objetivo tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. Las construcciones y la producción de ribozimas EN cabeza de martillo son bien conocidas en la técnica y se describen con más detalle en Haseloff y Gerlach (1988). Según realizaciones preferidas, la ribozima está modificada por ingeniería de tal manera que el sitio de reconocimiento de escisión se encuentra cerca del extremo 5' del ARNm de B2M. Según otras realizaciones preferidas, la ribozima está modificada por ingeniería de tal manera que el sitio de reconocimiento de escisión se encuentra cerca del extremo 5' del ARNm de CIITA. Esto aumenta la

eficiencia y minimiza la acumulación intracelular de transcripciones de ARNm no funcionales.

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

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

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

Según una realización preferida, la molécula de ARNi es un ARN interferente complementario a la SEQ ID NO:5. De acuerdo con otra realización preferida, la molécula de ARNi es una molécula de ácido ribonucleico que comprende al menos 10 nucleótidos consecutivos del complemento de la SEQ ID NO:5. De acuerdo con otra realización preferida, la molécula de ARNi es una molécula de ácido ribonucleico bicatenario que comprende una primera cadena idéntica a 20 hasta 25, tal como de 21 a 23, nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO: 5 y una segunda cadena complementaria a dicha primera cadena.

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

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

En combinación con este enfoque, los inventores han descubierto que los linfocitos T pueden ser alterados por PD1 (proteína 1 de muerte celular programada, también conocida como PD1; PD-1; CD279; SLEB2; hPD-1; hPD-I o hSLE1), que es una molécula de proteína de superficie celular de 288 aminoácidos codificada por el gen PDCD1 (NCBI - NC_000002.12). Esta proteína se expresa en los linfocitos T y las células pro-B y se ha descubierto que regula negativamente las respuestas de los linfocitos T (Carter L., *et al.* 2002). La formación del complejo receptor de PD-1/ligando PD-L1 transmite una señal inhibitoria, que reduce la proliferación de los linfocitos T.

El ligando 1 de muerte programada (PD-L1) es una proteína transmembrana de tipo 1 de 40 kDa que se considera que desempeña un papel importante en la supresión del sistema inmunológico durante eventos particulares, tal como el embarazo, aloinjertos de tejido, enfermedad autoinmune y otros estados patológicos, tal como hepatitis. PDL-1 (también llamado CD274 o B7H1) está codificado por el gen CD274 (NCBI - NM_014143).

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

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

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

5 Expresión de al menos un polipéptido inmunosupresor no endógeno

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

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

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

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

Expresión del homólogo vírico de MHC

De acuerdo con realizaciones particularmente preferidos, dicho polipéptido inmunosupresor no endógeno expresado
25 en dicho linfocito T es un homólogo vírico de MHC, tal como, por ejemplo, UL18 (denominado NP_044619 en la base de datos de proteínas NCBI).

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

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

Expresión del ligando NKG2D

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

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

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

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

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

65 Receptores de antígeno quiméricos (CAR)

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

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

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

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

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

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

un receptor de antígeno quimérico particularmente preferido es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 o una variante de la misma que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, tal como al menos el 90 %, al menos el 95 % o al un menos el 99 %, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:7 sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 7. Dicha variante puede diferir del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO:7 en la sustitución de al menos uno, al menos dos o al menos tres restos de aminoácidos. Preferentemente, dicha variante es capaz de unirse a CD19.

De acuerdo con otras determinadas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico puede dirigirse contra otro antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada, tal como un grupo de moléculas de diferenciación, tal como CD16, CD64, CD78, CD96, CLL1, CD116, CD117, CD71, CD45, CD71, CD123 y CD138, un antígeno de superficie asociado a tumor, tal como ErbB2 (HER2/neu), antígeno carcinoembrionario (CEA), molécula de adhesión a células epiteliales (EpcAM), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante III de EGFR (EGFRvIII), CD19, CD20, CD30, CD40, disialogangliósido GD2, mucina ductal-epitelial, gp36, TAG-72, glucoesfingolípidos, antígeno asociado a glioma, gonadotropina coriónica humana β , alfafetoproteína (AFP), AFP sensible a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa inversa telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxilo esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno específico de prostasa (PSA), PAP, NY-ESO-

1, LAGA-1a, p53, prosteína, PSMA, supervivencia y telomerasa, antígeno 1 de tumor de carcinoma prostático (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrina B2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF1) -I, IGF-II, receptor del IGF1, mesotelina, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que presenta un epítipo peptídico específico de tumor, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, antígenos tumorales del estroma, el dominio extra A (EDA) y el dominio extra B (EDB) de fibronectina y el dominio A1 de tenascina C (TnC A1) y la proteína asociada a fibroblasto (fap); un antígeno específico de linaje o específico de tejido tal como CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD34, CD133, CD138, CTLA-4, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), GM-CSF, receptores de citocina, endoglina, una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), BCMA (CD269, TNFRSF 17), mieloma múltiple o antígeno de leucemia linfoblástica, tal como uno seleccionado de TNFRSF17 (UNIPROT Q02223), SLAMF7 (UNIPROT Q9NQ25), GPRC5D (UNIPROT Q9NZD1), FKBP11 (UNIPROT Q9NYL4), KAMP3, ITGA8 (UNIPROT P53708) y FCRL5 (UNIPROT Q68SN8). Un antígeno de superficie específico de virus, tal como un antígeno específico de VIH (tal como gp120 de VIH); un antígeno específico del VEB, un antígeno específico del CMV, un antígeno específico del VPH, un antígeno específico del virus Lasse, un antígeno específico del virus de la gripe, así como cualquier derivado o variante de estos antígenos de superficie.

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

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

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

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

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

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

El dominio de transducción de señal o dominio de señalización intracelular del CAR multicatenario de la invención es

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

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

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

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

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

Linfocitos T modificados por ingeniería

Como resultado de la presente invención, se obtienen linfocitos T modificados por ingeniería que tienen características mejoradas. En particular, la presente invención proporciona un linfocito T aislado modificado por ingeniería que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada que se caracteriza además porque i) la expresión de B2M y/o CIITA está inhibida; y ii) al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) está inactivo.

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

De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la presente invención proporciona un linfocito T aislado modificado por ingeniería que comprende una molécula de ácido nucleico exógeno que inhibe la expresión de B2M. De acuerdo con realizaciones particulares, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M. Según realizaciones más particulares, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M es un oligonucleótido antisentido, ribozima o molécula de ARN interferente (ARNi). Por lo tanto, de acuerdo con una realización específica, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M es un oligonucleótido antisentido. De acuerdo con otra realización específica, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M es una ribozima y, preferentemente, una ribozima en cabeza de martillo. De acuerdo con otra realización específica, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M es una molécula de ARN interferente.

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

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

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

Como se ha mencionado anteriormente, el linfocito T modificado por ingeniería de la presente invención expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada. De acuerdo con realizaciones particulares, dicho linfocito T comprende una molécula de ácido
 35 nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dicho CAR.

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

Se entiende que los detalles dados en el presente documento, en particular con respecto a la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN del gen que codifica B2M, la molécula de ácido nucleico que inhibe la expresión de B2M, la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivarse selectivamente por escisión de ADN al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR), y el receptor de antígeno quimérico también se aplican a este aspecto de la invención.
 50

Además, en el alcance de la presente invención también se incluye una célula o línea celular obtenida de un linfocito T modificado por ingeniería de acuerdo con la invención, preferentemente mostrando uno de estos fenotipos:
 55

[b2m]⁻[TCR]⁻

[b2m]⁻[TCR]⁻[PD1]⁻

[b2m]⁻[TCR]⁻[PD1]⁻[PDL-1]⁺

[b2m]⁻[TCR]⁻[homólogo vírico de MHC]⁺

[b2m]⁻[TCR]⁻[ligando de NKG2D]⁺

Los linfocitos T de acuerdo con la presente invención son [CAR]⁺, es decir, están armadas con un receptor de antígeno quimérico para dirigir el reconocimiento específico de las células tumorales.

Métodos de administración

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

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

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

40 Como una realización preferida de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican las endonucleasas de la presente invención se transfectan en forma de ARNm para obtener una expresión transitoria y evitar la integración cromosómica de ADN extraño, por ejemplo mediante electroporación. Los inventores han determinado diferentes condiciones óptimas para la electroporación de ARNm en linfocitos T que se muestran en la Tabla 1. El inventor utilizó la tecnología cytoPulse que permite, mediante el uso de campos eléctricos pulsados, permeabilizar transitoriamente células vivas para la administración de material a las células (patente de Estados Unidos 6.010.613 y documento WO 2004/083379). La duración del pulso, la intensidad y el intervalo entre pulsos pueden modificarse para alcanzar las mejores condiciones para una alta eficiencia de transfección con una mortalidad mínima. Básicamente, los primeros pulsos de alto campo eléctrico permiten la formación de poros, mientras que los pulsos posteriores de campo eléctrico inferior permiten mover el polinucleótido a la célula. En un aspecto de la presente invención, el inventor describe las etapas que condujeron al logro de una eficiencia de transfección > 95 % del ARNm en los linfocitos T y el uso del protocolo de electroporación para expresar transitoriamente diferentes tipos de proteínas en los linfocitos T. En particular, la invención se refiere a un método para transformar linfocitos T, que comprende poner en contacto dichos linfocitos T con ARN y aplicar a los linfocitos T una secuencia de pulso ágil que consiste en:

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

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

65 (a) un impulso eléctrico con un voltaje de 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600,

ES 2 782 125 T3

- 2700, 2800, 2900 o 3000V por centímetro, un ancho de pulso de 0,1 ms y un intervalo de pulso de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ms entre los pulsos eléctricos de la etapa (a) y (b);
- 5 (b) un impulso eléctrico con un intervalo de voltaje de 2250, de 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000V con un ancho de pulso de 100 ms y un intervalo de pulso de 100 ms entre el pulso eléctrico de la etapa (b) y el primer impulso eléctrico de la etapa (c); y
- (c) 4 pulsos eléctricos con un voltaje de 325 V con un ancho de pulso de 0,2 ms y un intervalo de pulso de 2 ms entre cada uno de los 4 pulsos eléctricos.
- 10 Cualquier valor incluido en el intervalo de valores descrito anteriormente se desvela en la presente solicitud. El medio de electroporación puede ser cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, el medio de electroporación tiene una conductividad en un intervalo que abarca de 0,01 a 1,0 miliSiemens.

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

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

Linfocitos T no alorreactivos:

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

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

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

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

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

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

(continuación)

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

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

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

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

Por lo tanto, de acuerdo con determinadas realizaciones, el método de la invención comprende además inactivar al

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

Activación y expansión de linfocitos T

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

En particular, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse *in vitro*, tal como mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se utiliza un ligando que une la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de linfocitos T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Como pueden apreciar fácilmente los expertos en la materia, La relación entre partículas y células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula objetivo. En algunas realizaciones adicionales de la presente invención, las células, tales como linfocitos T, se combinan con perlas recubiertas de agente, las perlas y las células se separan posteriormente, y luego las células se cultivan. En una realización alternativa, antes del cultivo, las células y las perlas recubiertas con agente no se separan sino que se cultivan juntas. Las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las perlas paramagnéticas a las que se unen anti-CD3 y anti-CD28 (perlas 3x28) entren en contacto con los linfocitos T. En una realización, las células (por ejemplo, de 4 a 10 linfocitos T) y las perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas T DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 en una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, preferentemente PBS (sin cationes divalentes, tales como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente que se puede usar cualquier concentración celular. La mezcla se puede cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a aproximadamente 14 días o cualquier valor entero por hora en el medio. En otra realización, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 5, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-g, 1L-4, 1L-7, GM-CSF, -10, -2, 1L-15, TGF β y TNF- o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de las células incluyen, pero sin limitación, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores, tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 1 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, libre de suero o suplementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de los linfocitos T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infunden en un sujeto. Las células objetivo se mantienen en condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (por ejemplo, 37 °C) y atmósfera (por ejemplo, aire más 5 % de CO₂). Los linfocitos T que han estado expuestos a tiempos de estimulación variados pueden presentar características diferentes

En otra realización particular, dichas células pueden expandirse cocultivando con tejido o células.

Aplicaciones terapéuticas

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

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

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

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

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

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

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

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

Dicha cantidad efectiva de células o composición que comprende esas células puede administrarse parenteralmente. Dicha administración puede ser una administración intravenosa. Dicha administración puede realizarse directamente mediante inyección dentro de un tumor.

En determinadas realizaciones, las células se usan en la administración a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o siguiendo) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluidos, aunque sin limitaciones, el tratamiento con agentes como terapia antiviral, cidofovir e interleucina-2, El tratamiento con citarabina (también conocido como ARA-C) o natalizimab para pacientes con EM o tratamiento con efalizimab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. En realizaciones adicionales, los linfocitos T de la invención pueden usarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tal como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoblivos como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micoplienólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos medicamentos inhiben la calcineurina fosfatasa dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu et al., Cell 66: 807-815, 1 1; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Citr. Opin. mm n. 5:763-773, 93). En una realización adicional, las

composiciones celulares de la presente invención son para su uso en la administración a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos T que utiliza agentes de quimioterapia, tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos, tales como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las composiciones celulares de la presente invención son para uso en la administración después de la terapia ablativa de linfocitos B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con dosis altas de quimioterapia seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En determinadas realizaciones, después del trasplante, los sujetos pueden recibir una infusión de los linfocitos T genéticamente expandidas de la presente invención. En un ejemplo adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

En el presente documento también se describen métodos para tratar a un paciente que lo necesita, que comprenden a) proporcionar al menos un linfocito T modificado por ingeniería de la presente invención, preferentemente una población de dicho linfocito T; y b) administrar dicho linfocito T o población a dicho paciente.

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

Otras definiciones

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

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

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

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

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

- por "ADN objetivo", "secuencia objetivo de ADN", "secuencia objetivo de ADN", "secuencia objetivo de ácido

nucleico", "secuencia objetivo" o "sitio de procesamiento" se entiende una secuencia de polinucleótidos a la que una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente puede dirigirse y procesar según la presente invención. Estos términos se refieren a una localización de ADN específica, preferentemente una localización genómica en una célula, pero también una porción de material genético que puede existir independientemente del cuerpo principal de material genético, tal como plásmidos, episomas, virus, transposones o en orgánulos tales como las mitocondrias, como ejemplo no limitante. Ejemplos no limitantes de secuencias objetivo guiadas por ARN, son las secuencias del genoma que pueden hibridar con el ARN guía que dirige la endonucleasa guiada por ARN a un locus deseado.

- 5
- 10 - Por "vector de liberación" o "vectores de liberación" se entiende cualquier vector de liberación que se puede usar en la presente invención para poner en contacto celular (es decir, "contactar") o liberar dentro de células o compartimentos subcelulares (es decir, "introducir") agentes/sustancias químicas y moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) necesarios en la presente invención. Incluye, pero no se limita a vectores de liberación liposomales, vectores de liberación víricos, vectores de liberación de fármacos, vehículos químicos, vehículos poliméricos, lipoplexos, poliplexos, dendrímeros, microburbujas (medios de contraste de ultrasonidos), nanopartículas, emulsiones u otros vectores de transferencia apropiados. Estos vectores de liberación permiten la liberación de moléculas, sustancias químicas, macromoléculas (genes, proteínas) u otros vectores, tales como plásmidos, o péptidos penetrantes. En estos últimos casos, los vectores de liberación son vehículos de moléculas.
- 15
- 20 - Los términos "vector" o "vectores" se refieren a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un "vector" en la presente invención incluye, aunque no de forma limitativa, un vector vírico, un plásmido, un vector de ARN o una molécula de ARN o ADN lineal o circular que puede consistir en ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos, semisintéticos o sintéticos. Los vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma (vector episomal) y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos (vectores de expresión). Los expertos en la materia conocen un gran número de vectores adecuados y
- 25
- están disponibles comercialmente.

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

- 30
- Por "vector lentiviral" se entiende vectores lentivirales basados en el VIH que son muy prometedores para la liberación de genes debido a su capacidad de empaquetamiento relativamente grande, inmunogenicidad reducida y su capacidad para transducir de manera estable con alta eficiencia una amplia gama de diferentes tipos de células. Los vectores lentivirales generalmente se generan después de la transfección transitoria de tres (empaquetamiento, envoltura y transferencia) o más plásmidos en las células productoras. Como el VIH, los vectores lentivirales entran en la célula objetivo a través de la interacción de las glucoproteínas de la superficie viral con los receptores en la superficie celular. Al entrar, el ARN del virus sufre transcripción inversa, que está mediada por el complejo de transcriptasa inversa del virus. El producto de la transcripción inversa es un ADN vírico lineal bicatenario, que es el sustrato para la integración viral en el ADN de las células infectadas. Por "vectores lentivirales integrativos (o VL)", se entiende vectores tales como ejemplo no limitante, que son capaces de integrarse en el genoma de una célula objetivo. Por el contrario, por "vectores lentivirales no integrativos (o NILV)" se entiende vectores de liberación de genes eficientes que no se integran el genoma de una célula objetivo a través de la acción de la integrasa del virus.
- 35
- 40
- 45
- 50
- Los vectores y vectores de liberación pueden asociarse o combinarse con cualquier técnica de permeabilización celular, tales como sonoporación o electroporación o derivados de estas técnicas.
- 55
- Por "célula" o "células" se entiende cualquier célula viva eucariota, células primarias y líneas celulares derivadas de estos organismos para cultivos *in vitro*.
- 60
- Por "célula primaria" o "células primarias" se entiende células tomadas directamente de tejido vivo (es decir, material de biopsia) y establecidas para el crecimiento *in vitro*, que han sufrido muy pocas duplicaciones de población y, por lo tanto, son más representativos de los principales componentes funcionales y características de los tejidos de los que derivan, en comparación con líneas celulares tumorigénicas continuas o inmortalizadas artificialmente.

65 Como ejemplos no limitantes, las líneas celulares pueden seleccionarse del grupo que consiste en células CHO-K1; células HEK293; células Caco2; células U2-OS; células NIH 3T3; células NSO; células SP2; células CHO-S; células

DG44; células K-562, células U-937; células MRC5; células IMR90; células Jurkat; células HepG2; células HeLa; células HT-1080; células HCT-116; células Hu-h7; células Huvec; células Molt 4.

- 5 Todas estas líneas celulares pueden modificarse mediante el método de la presente invención para proporcionar modelos de líneas celulares para producir, expresar, cuantificar, detectar, estudiar un gen o una proteína de interés; estos modelos también se pueden utilizar para detectar moléculas biológicamente activas de interés en investigación y producción, y en varios campos como el químico, biocombustibles, terapéutica y agronomía como ejemplos no limitantes.
- 10 - por "mutación" se entiende la sustitución, delección, inserción de hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta o más nucleótidos/aminoácidos en un polinucleótido (ADNc, gen) o una secuencia de polipéptidos. La mutación puede afectar a la secuencia de codificación de un gen o a su secuencia reguladora. También puede afectar a la estructura de la secuencia genómica o a la estructura/estabilidad del ARNm codificado.
- 15 - por "variante (s)", se entiende una variante repetida, una variante, una variante de unión al ADN, una variante de una nucleasa TALE, una variante de polipéptido obtenida por mutación o reemplazo de al menos un resto en la secuencia de aminoácidos de la molécula original.
- 20 - por "variante funcional" se entiende un mutante catalíticamente activo de una proteína o un dominio de proteína; dicho mutante puede tener la misma actividad en comparación con su proteína madre o dominio de proteína o propiedades adicionales, o actividad más alta o más baja.
- 25 - Por "gen" se entiende la unidad básica de la herencia, que consiste en un segmento de ADN dispuesto de manera lineal a lo largo de un cromosoma, que codifica una proteína específica o segmento de proteína. Un gen normalmente incluye un promotor, una región no traducida en 5', una o más secuencias de codificación (exones), opcionalmente intrones, una región no traducida en 3'. El gen puede comprender además un terminador, potenciadores y/o silenciadores.
- 30 - Como se usa en este documento, el término "locus" es la ubicación física específica de una secuencia de ADN (por ejemplo, de un gen) en un cromosoma. El término "locus" puede referirse a la ubicación física específica de una secuencia diana de endonucleasa de sitio de corte poco frecuente en un cromosoma. Tal locus puede comprender una secuencia diana que es reconocida y/o escindida por una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente según la invención. Se entiende que el lugar de interés de la presente invención no solo puede calificar
- 35 una secuencia de ácido nucleico que existe en el cuerpo principal del material genético (es decir, en un cromosoma) de una célula, sino también una porción de material genético que puede existir independientemente para dicho cuerpo principal de material genético como los plásmidos, episomas, virus, transposones o en orgánulos como las mitocondrias como ejemplos no limitantes.
- 40 - El término "escisión" se refiere a la rotura del esqueleto covalente de un polinucleótido. La escisión puede iniciarse mediante varios métodos que incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Es posible la escisión de cadena sencilla y la escisión de cadena doble y la división de cadena doble puede producirse como resultado de dos eventos de escisión de cadena sencilla. La escisión de doble cadena de ADN, ARN o ADN/ARN híbrido puede dar como resultado la producción de extremos romos o
- 45 extremos escalonados.
- 50 - Por "proteína de fusión" se entiende el resultado de un proceso bien conocido en la técnica que consiste en la unión de dos o más genes que originalmente codifican proteínas separadas o parte de ellas, la traducción de dicho "gen de fusión" da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales.
- 55 - "Identidad", se refiere a la identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico o polipéptidos. La identidad se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear a efectos de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de similitud o identidad entre las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos es una función del número de nucleótidos o aminoácidos idénticos o coincidentes en las posiciones compartidas por las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, respectivamente. Se pueden usar varios algoritmos y/o programas de alineación para calcular la identidad entre dos secuencias, incluidos FASTA o BLAST, que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencia GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y se pueden usar con,
- 60 por ejemplo, configuración predeterminada. Por ejemplo, se contemplan los polipéptidos que tienen al menos un 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98% o 99% de identidad con polipéptidos específicos descritos en el presente documento y que exhiben preferentemente las mismas funciones, así como el polinucleótido que codifica dichos polipéptidos.
- 65 - "inhibición" o "inhibir" la expresión de B2M significa que la expresión de B2M en la célula se reduce al menos en

- el 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 %. Más particularmente, "inhibir" o "inhibición" de la expresión de B2M significa que la cantidad de B2M en la célula se reduce al menos en un 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 %. La expresión o cantidad de proteína en una célula se puede determinar por cualquier medio adecuado conocido en la técnica, tales como ELISA, inmunohistoquímica, transferencia Western o citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos de B2M. Dichos anticuerpos están disponibles comercialmente de varias fuentes, tal como de Merck Millipore, Billerica, MA, USA; o Abcam plc, Cambridge, UK.
- "inhibir" o "inhibición" la expresión de CIITA significa que la expresión de CIITA en la célula se reduce al menos en un 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 %. Más particularmente, "inhibir" o "inhibición" de la expresión de CIITA significa que la cantidad de CIITA en la célula se reduce al menos en un 1 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 % o el 100 %. La expresión o cantidad de proteína en una célula se puede determinar por cualquier medio adecuado conocido en la técnica, tales como ELISA, inmunohistoquímica, transferencia Western o citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos de CIITA. Dichos anticuerpos están disponibles comercialmente de varias fuentes, tal como de Abcam pic, Cambridge, UK; o Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.
 - "dominio de transducción de señales" o "ligando coestimulador" se refiere a una molécula en una célula presentadora de antígeno que se une específicamente a una molécula coestimuladora relacionada en un linfocito T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, media en una respuesta de linfocitos T, incluyendo, aunque no de forma limitativa, activación de proliferación, la diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitaciones, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulante inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor de linfotóxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une con el receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulante también abarca, entre otras cosas, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimulante presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitaciones, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83.
 - Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afin en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo en una respuesta coestimulante por la célula, tal como, pero sin limitación, proliferación. Las moléculas coestimulantes incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y receptor de ligando Toll.
 - Una "señal coestimuladora" como se usa en el presente documento se refiere a una señal, que, en combinación con la señal primaria, tal como la ligadura TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o regulación por aumento o disminución de las moléculas clave.
 - "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene sitios de unión para dos antígenos diferentes dentro de una sola molécula de anticuerpo. Los expertos en la materia apreciarán que otras moléculas además de la estructura del anticuerpo canónico pueden construirse con dos especificidades de unión. Se apreciará además que la unión al antígeno por anticuerpos biespecíficos puede ser simultánea o secuencial. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante técnicas químicas (véase, por ejemplo, Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5807), por técnicas de "polidoma" (véase la patente de Estados Unidos n.º 4,474,893) o mediante técnicas de ADN recombinante, que todos son conocidos *per se*. Como ejemplo no limitante, cada dominio de unión comprende al menos una región variable de una cadena pesada de anticuerpo ("región VH o H"), en el que la región VH del primer dominio de unión se une específicamente al marcador de linfocitos tal como CD3, y la región VH del segundo dominio de unión se une específicamente al antígeno tumoral.
 - La expresión "dominio de unión a ligando extracelular" como se usa en el presente documento se define como un oligo o polipéptido que es capaz de unirse con un ligando. Preferentemente, el dominio será capaz de interactuar con una molécula de superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando extracelular puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana con una patología particular. Así, los ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar como ligandos incluyen aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.
 - El término "sujeto" o "paciente" como se usa en el presente documento incluye a todos los miembros del reino

animal, incluidos los primates no humanos y los humanos.

- La descripción escrita anterior de la invención proporciona una manera y proceso de hacerla y usarla de tal manera que cualquier persona experta en esta técnica esté habilitada para hacerla y usarla, estando esta habilitación proporcionada en particular para el objeto de las reivindicaciones adjuntas, que forman parte de la descripción original.

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

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

Ejemplos

Nucleasas TALE que escinden la CIITA humana

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

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

Nombre del objetivo	Secuencia objetivo
TALEN 1_Exón 2_CMH-II-TA	TTCCCTCCCAGGCAGCTC acagtgtgccacca TGGAGTTGGGGCCCCTA (SEQ ID NO: 55)
TALEN 2_Exón 2_CMH-II-TA	TGCCTCTACCACTTCTA Tgaccagatggacct GGCTGGAGAAGAAGAGA (SEQ ID NO: 56)
TALEN 1_Exon3_CMH-II-TA	5'TCTTCATCCAAGGGACT Ttcctcccagaacc CGACACAGACACCATCA (SEQ ID NO: 57)
TALEN 2_Exon3_CMH-II-TA	TGTTGTGTGACATGGAA Ggtgatgaagagacc AGGGAGGCTTATGCCAA (SEQ ID NO: 58)

Nucleasas TALE que escinden la β2m humana

El ARNm que codifica las nucleasas TALE dirigidas a los exones del gen de β2m humana se solicitó a Collectis Bioresearch (8, rue de la Croix Jarry, 75013 PARÍS). La Tabla 4 a continuación indica las secuencias objetivo escindidas por cada una de las dos entidades independientes (llamadas seminucleasas TALE), cada una de las cuales contiene una secuencia de repetición modificada por ingeniería para unirse y escindirse entre secuencias objetivo que consisten en dos secuencias largas de 17 pb (llamadas semiobjetivos) separadas por un espaciador de 15 pb.

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

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

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

- 5 El genoma humano contiene dos cadenas beta de receptor de linfocitos T funcionales (TRBC1 y TRBC2). Durante el desarrollo de linfocitos T alfa/beta, se selecciona una de estas dos cadenas constantes en cada célula para unirla a la región variable de TCR-beta y formar una cadena beta funcional de longitud completa. La Tabla 5 a continuación presenta una secuencia objetivo TRAC y 2 TRBC y sus secuencias TALEN correspondientes. Los 2 objetivos de TRBC se eligieron en secuencias conservadas entre TRBC1 y TRBC2 de modo que la nucleasa TALE correspondiente escindiría tanto TRBC1 como TRBC2 al mismo tiempo.
- 10

Tabla 5 Descripción de las nucleasas TALE TRAC y TRBC y secuencias de los sitios objetivo de las nucleasas TALE en los genes humanos correspondientes.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 8.

Tabla 8: Porcentajes de indeles para la nucleasa TALE dirigida a TRAC_T01, TRBC_T01 y TRBC_T02 objetivos.

Objetivo	% Indeles con transfección de nucleasa TALE	% Indeles con transfección de control de pUC
TRAC_T01	41,9	0,3
TRBC_T01 en la cadena constante 1	3,81	0
TRBC_T01 en la cadena constante 2	2,59	0
TRBC_T02 en la cadena constante 1	14,7	0
TRBC_T02 en la cadena constante 1	5,99	0

5 Actividad de β 2m y TRAC-nucleasa TALE en linfocitos T primarios

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

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

Análisis funcional de linfocitos T con gen TRAC dirigido

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

35

Análisis funcional de linfocitos T con gen β 2m dirigido

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

40

Seguridad genómica de la β 2m-nucleasa TALE y TRAC-nucleasa TALE en linfocitos T primarios

- 45 Como nuestras construcciones incluyen subunidades de nucleasa, Una pregunta importante es si la transfección múltiple de nucleasa de TALE puede conducir a la genotoxicidad y a la escisión fuera del objetivo en secuencias diana de "coincidencia estrecha" o al emparejar mal las seminucleasas TALE. Para estimar el impacto de TRAC-TALE-nucleasa y β 2m-TALE-nucleasa en la integridad de los genomas celulares, Enumeramos secuencias en el genoma humano que presentaban el potencial de escisión fuera del sitio. Para generar esta lista, identificamos todas
- 50 las secuencias en el genoma con hasta 4 sustituciones en comparación con los semiobjetivos originales y luego identificamos los pares de semiobjetivos potenciales en una orientación cabeza a cabeza con un espaciador de 9 a 30 pb entre sí. Este análisis incluyó sitios potencialmente dirigidos por homodímeros de una molécula de seminucleasa TALE o heterodímeros formados por una seminucleasa TALE β 2m y una seminucleasa TALE TRAC. Los inventores puntuaron los objetivos potenciales fuera del sitio en función de los datos de especificidad teniendo

en cuenta el costo de las sustituciones individuales y la posición de las sustituciones (donde los apareamientos erróneos se toleran mejor para las bases en el extremo 3' del semiobjetivo). Se obtuvieron 173 secuencias únicas con una puntuación que refleja una estimación de la probabilidad de escisión. Se seleccionaron las 15 puntuaciones más altas y se analizaron por secuenciación profunda la frecuencia de mutaciones encontradas en estos loci en linfocitos T transfectados simultáneamente con $\beta 2m$ y nucleasa TALE TRAC y se purificaron mediante separación magnética como negativos para $\beta 2m$, negativos para TCR $\alpha\beta$. Los resultados mostraron que la frecuencia más alta de inserción/delección es 7×10^{-4} . Estos resultados hacen que el supuesto objetivo fuera del sitio sea al menos 600 veces menos propenso a ser mutado que los objetivos previstos. Los reactivos de nucleasa TALE utilizados en este estudio, por lo tanto, parecen extremadamente específicos.

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

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

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

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

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

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

Se ha producido una TALEN específica dirigida a una secuencia (T01, SEQ ID NO:81) dentro del primer exón codificante del gen de B2M (número de acceso de GenBank NC_000015) (RVD de dominio de unión a ADN izquierda: NN-NN-HD-HD-NG-NG-NI-NN-HD-NG-NN-NG-NN-HD-NG-NG con SEQ ID NO: 82, y RVD del dominio de unión a ADN derecha: NI-NN-HD-HD-NG-HD-HD-NI-NN-NN-HD-HD-NI-NN-NI-NG con SEQ ID NO:83). La Tabla 9 a continuación informa las secuencias para la secuencia dirigida T01, así como para 2 objetivos adicionales T02 y T03 y sus correspondientes secuencias TALE izquierda y derecha.

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

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

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucleasa TALE
T01 TALEN Beta2M IZQUIERDA	81	<p>ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATA TCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTTCGTTTCGA CAGTGCGCAGCACACCAGAGGCACTGGTCGGCCACGGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCC AACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGA CACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCTTGTCTCACGG TGGCGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTG GCGCGGTGACCGCAGTGGAGGCGATGATGATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTTGA CCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGG CTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTG TTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGC GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCC CAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGT GCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGG CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGA GCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGGCGCTGTTGC CGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAG CAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCA GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCT GTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGCCGGCGC TGGAGAGCATTGTTGCCAGTTATCTGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGTTGACCAACGACCACCTCGTC GCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCTCCTGCGCTGGATGCAAGTGAAGGATTGGGGATCCTATCAGC CGTCCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTG CCCCCAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGAAGCAGCACCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAG GTGATGGAGTTCTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGAC GGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGACCAAGGCTACTCCGGCG GCTACAACCTGCCATCGCCAGGCGGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAAC AAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTG TGTCCGGCCACTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCATCACCAACTGCAACGG CGCCGTGTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGAGATGATCAAGGCCGACCCCTGACCCTGGA GGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTCGCGGCCACTGATAA</p>

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucleasa TALE
T01 TALEN Beta2M DERECHA	82	<p>ATGGGGGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAG CACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATC AAACCGAAGGTTCTGTCGACAGTGGCGCAGCACCAGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCG CACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCG CAGCGTTGCCAGAGGGCAGACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTC TGGAGGCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTC TCAAGATTGCAAAACGTGGCGCGTGACCGCAGTGGAGGCACTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACG GGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGC CAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCT GGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGG CCATCGCCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCC AGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTG GAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAG GCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGA GACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGG CCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCC ACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG GTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCA CGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TGCAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCA GCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACG GCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTG CAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC AATGGCGGCGGAGGCCGGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCC GCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCTTGGCTGCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGAAAA AGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGT TGAGGCCAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCC AGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACC TGGGCGCTCCAGGAAGCCCGACGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGT GGACACCAAGGCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGT GGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCCTCCAGCGT GACCGAGTTCAAGTTCCTGTTGTTGTCGGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTG AACCACATCAACCACTGCAACGCGCGCTGTCTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATC AAGGCCGGCACCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGGCGC CGACTGATAA</p>

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucléasa TALE
Objetivo T02 Beta2M	83	TCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAAGTCAA
T02 TALEN Beta2M IZQUIERDA	84	<p>ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATA TCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTGTTTCGA CAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACAGCGCACATCGTTGCGTTAAGCC AACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGA CACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCCTTGCTCACGG TGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAACCGTG GCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCGATGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTGA CCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCAGTGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGG CTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGAT GGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGAC CCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGC TGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTG TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGT GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCG GAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGG CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGCA GCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCG GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAG CAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCA GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGC TGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCGG CGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCTTGACCAACGACCACCT CGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCTCCTGCGCTGGATGCAGTAAAAAGGGATTGGGGATCCTAT CAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTA CGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGAT GAAGGTGATGGAGTTCTTATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGC CCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACCAAGGCTACTC CGGCGGCTACAACCTGCCATCGCCAGGCCAGCGAAATGAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCA GGAACAAGCACATCAACCCCAAGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCCTCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTT GTTGTTGCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGC AACGGCGCGGCTGTGCTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGCGCACCTGACC CTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTCGGCGCGACTGATAA</p>

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucleasa TALE
T02 TALEN Beta2M DERECHA	85	<p>ATGGGGGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAG CACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATC AAACCGAAGGTTCTGTTGACAGTGGCGCAGCACCAGGCACTGGTTCGGCCACGGGTTTACACACGG CACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCCGCTGCAAGTATCAGGACATGATCG CAGCGTTGCCAGAGGGCAGACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAACAGTGGTCCGGCGCACGGCGTCC TGGAGGCCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTC TCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCTGACCGCAGTGGAGGCACTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACG GGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGG GCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGTC CAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCT GGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGC CATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCA GGCCCCAGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCA TCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAG GCCCCAGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGA GACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGG CCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTGCAGGCGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCC CACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGAC GGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGC CAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCC ACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG GTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCCA CGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TCCAGCGGCTGTTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAG CAATGGCGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGC CGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCTTGGCCTGCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGATGCAGTGA AAGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGA GTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCGGAACAGCAC CCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCA CCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTGATC GTGGACACCAAGGCCACTCCGGCGGCTACAACCTGCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTAC GTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCCTCCAGC GTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTGTCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCGAGGC TGAACCAATCACAACCTGCAACCGGCGCGTGTGTCGGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGA TCAAGCCCGGACCCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGGC GCCGACTGATAA</p>

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucléasa TALE
Objetivo T03 Beta2M	86	TTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCTATCCA
T03 TALEN Beta2M IZQUIERDA	87	<p>ATGGGGGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATCGATA TCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGTTGGTTCGA CAGTGGCGCAGCACCCAGGCGACTGGTCCGGCCACGGTTTACACAGCGCACATCGTTGCGTTAAGCC AACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGA CACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCCAGCGCTCTGGAGGCCCTTGCTCACGG TGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAACGTTG GCGGCGTGACCGCAGTGGAGGCGATGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACTGA CCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCG CTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATG GTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCC CGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCAGATGGCGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTG TTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGT GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCC CAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTT GCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGCGGTG CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCA GCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGC CGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCA AGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCC GTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAG CAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGT GCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAG GGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGT GGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCT GTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGG CGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGG TGGCCATCGCCAGCAATAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCT GCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGCGGAGGCCGGCGC TGGAGAGCATTGTTGCCAGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGGTTGACCAACGACCACCTCGTC GCCTTGGCCTGCTCGGCGGGCTCCTGCGCTGGATGAGTAAAAAGGGATTGGGGATCCTATCAGC CGTTCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTACGTG CCCCAGGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAG GTGATGGAGTTCTCATGAAGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCCGAC GGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGCGGTGATCGTGGACACCAAGGCCACTCCTCCGGC GCTACAACTGCCATCGCCAGGCCAGCAAAATGAGAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAAC AAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCTGTTCC TGTCCGGCCACTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGG CGCCGTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCTGACCCTGGA GGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGGCGCGGACTGATAA</p>

(continuación)

Nombre del objetivo	SEQ ID NO:	Secuencia de la seminucleasa TALE
T03 TALEN Beta2M DERECHA	88	ATGGGGGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGACCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAG CACATGGACAGCATCGATATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATC AAACCGAAGGTTCTGTTGACAGTGGCGCAGCACACCAGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCG CACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCG CAGCGTTGCCAGAGGCGACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTC TGGAGGCCCTTGCTCAGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAACTTC TCAAGATTGCAAACGTGGCGCGTGACCGCAGTGGAGGCACTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACG GGTGCCCGCTCAACTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTG GCCATCGCCAGCAATAATGGTGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGC CAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTG GAGACGGTGCAGGCGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCC ATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCA GGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGA GACGGTGCAGGCGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGC CCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGA CGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCC ACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACG GTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCA CGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGG TCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCA GCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAGGCGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCAC GGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGT CAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGC AATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGG TTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCAGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCA GCGGCTGTGCCGGTGTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAA TGGCGGCGGAGGCGGCGCTGGAGAGCATTGTGCCAGTTATCTGCCCTGATCCGGCGTTGGCCG GTTGACCAACGACCACTCGTCCCTTGCCCTGCTCGCGGGCGTCTGCGTGGATGAGTGAATAAAG GGATTGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGCTGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTG AGGCACAAGCTGAAGTACGTGCCCCAGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAACAGCACCCAG GACCGTATCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGACGGTACAGGGGCAAGCACCTG GGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGACTACGGCGTATCGTG GACACCAAGGCTACTCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTG GAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCCTCCAGCGTG ACCGAGTTCAGTTCTGTTGTTGTTCCGCTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAGGCTGA ACCACATCACCAACTGCAACGGCGCGTGTGTCGTGGAGGAGCTCTGATCGGGCGGAGATGATCA AGGCCGGCACCTGACCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATCAACTTCGCGGCC GACTGATAA

Para probar la capacidad de esta TALEN específica de B2M para promover eventos de NHEJ propensos a errores en el locus de B2M, se electroporaron 2 o 10 µg de ARNm que codifica TALEN en linfocitos T primarios usando la

tecnología Pulse Agile de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tres días después de la transfección, las células se recuperaron y se marcaron con un anticuerpo específico de β 2-microglobulina acoplado al fluorocromo PhycoErythrin. A continuación, las células se analizan por citometría de flujo para determinar la viabilidad y la expresión de β 2-m. Los resultados se muestran en la Figura 10. En el panel superior, casi el 100 % de los linfocitos T no transfectados expresan β 2-m (panel superior derecho). La transfección de linfocitos T con la TALEN específica de B2M reduce drásticamente la expresión de β 2-m, ya que el 38 % (centro derecha) y el 80 % de los linfocitos T (panel inferior derecho) se vuelven negativos para β 2-m cuando se transfectan con 2 μ g o 10 μ g de ARNm de TALEN respectivamente. Estos datos indican que la eliminación de B2M en los linfocitos T se puede lograr con alta eficacia.

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

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

Producción y expresión de ligandos de NKG2D en linfocitos T

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

Los linfocitos T CAR deficientes en β 2-M no son reconocidos por los linfocitos T alogénicos.

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

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

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

Tabla 10: Secuencia de polipéptidos de un homólogo vírica de MHC (UL18) y un panel de ligandos de NKG2D que se expresarán de acuerdo con la presente invención.

	SEQ ID NO:	Secuencia polipeptídica
B2M-UL18 química	89	MALPVTALLPLALLHAARSRVALALLSLGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENKSNFLNCYVSGFHPSPDIEVDLLK NGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDRDMGGGGGGGGGGGGGGGG GSMTTAWCLTLFVLLWMLRVVGMHVRVGYTGIFDDTSHMTLTVGIDGQHFYTVHNSDDKASSRANGTISWMA NVSAAYPTYLDGERAKGLIFNQTEQNLELEIALGYRSQSVLTVTHECNITTEGNSFVAGYEGFWDGETLMEIKDNL TLWTGPNYEISWLKQNKTYIDGKIKNISEGDTTIQRNYLKGNCQWQSVIYSGFQTPVTHPVVKGGRNQNDNRAEAF CTSYGFFPGEINIFHYGNKAPDDSEPCNPLLPFDGTFHQGCYAFICNQNYTCRVTHIGNWTVPEIPISVTSPDDSSS GEVPDHPANKRYNTMTISSVLLALLCALLFAFLHYFTLLKQYLRNLFAFWRVRYKVRSS MGGVLLTQRTLLSLVLLFPMSMASMEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPLRCRQKRAKPPQQQWA EDVLGNKTDRETRDLTNGKDLRMTLAHIKQKQEGHLSLQEIIRVCEIHEIDNSTRSSHFYDGEFLSQNLTKQWT MQSSRAQTLAMNVRNFKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRLYKSGVVLRRTPPMVNVTRSEASEGNITVTCR ASGFYPWNITLSWRQDGVSLSDTQQWGDVLPDGNGTQWVATRICQEGEEQRFICYMEHSGNHSTHPVPSGKV VLQSHW
SP-MICAed	90	MGGVLLTQRTLLSLVLLFPMSMASMEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPLRCRQKRAKPPQQQWA EDVLGNKTDRETRDLTNGKDLRMTLAHIKQKQEGHLSLQEIIRVCEIHEIDNSTRSSHFYDGEFLSQNLTKQWT MQSSRAQTLAMNVRNFKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRLYKSGVVLRRTPPMVNVTRSEASEGNITVTCR ASGFYPWNITLSWRQDGVSLSDTQQWGDVLPDGNGTQWVATRICQEGEEQRFICYMEHSGNHSTHPVPSGKV VLQSHW
SP-MICBed	91	MGGVLLTQRTLLSLVLLFPMSMASMEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPLRCRQKRAKPPQQQWA AEDVLGAKTWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKDQKGLHLSLQEIIRVCEIHEIDNSTRSSHFYDGEFLSQNLTKQWT VPQSSRAQTLAMNVRNFKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRLYKSGVVLRRTPPMVNVTRSEASEGNITVTCR ASSFYPRNITLWTRQDGVSLSHNTQQWGDVLPDGNGTQWVATRICQEGEEQRFICYMEHSGNHSTHPVPSGKVL VLQSQRTD
SP-ULBP1ed	92	MGGVLLTQRTLLSLVLLFPMSMASMGWVDTHCLCYDFITPKSRPEPQWCEVQGLVDERPFLHYDCVNHKAKAFAS LGKKNVTKTWEEQTELRDVVDFLKGQLDIQVENLPIEPLTQARMSCEHEAHGHGRGSWQFLNKGKFLFDSN NRKWTALHPGAKKMTKEKNRBDVTMFFQKISLGDCKMWLEEFLLMYWEQMLDPT
SP-ULBP2ed	93	MGGVLLTQRTLLSLVLLFPMSMASMGADPHSLCYDITVIPKFRPGRWCAVQGVQVDEKTFLLHYDCGNKTVTPVSP GKKNVTTAWKAQNPVLRVVDILTEQLRDIQLENYTPKEPLTQARMSCEKAEHSGSSWQVDFDGGQIFLLFDSEK RMWTTVHPGARKMEKWKWVAMSFHYFSMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAG
SP-ULBP3ed	94	MGGVLLTQRTLLSLVLLFPMSMASMDAHLWYNFTIHLPRHGQQWCEVQSQVDQKNFLSYDCGSKVLSMGHLE EQLYATDAWGKQLEMLREVQGRLELADTELEDFTPSGPLTLQVRMSCEADAGYIRGSWQVDFDGRKFLFDSNN RKWTVVHAGARRMKEKWEKDSGLTFFKVMVSRDCKSWLRDFLMLHRKRLKLEPT

(continuación)

	SEQ ID NO:	Secuencia polipeptídica
SP-N2DL4ed	95	MGGVLLTQRTLLSLVLAALLFPSMASMHSLSFCNFTIKLSLRPGQPWCEAQVFLNKNLFLQYNSDNNMVKPLGLLGGKVVY ATSTWGELTQTLGEVGRDLRMLLCDIKPQIKTSDPSTLQVEMFCQREAEERCTGASWQFATNGEKSLLLFDAMINMTWT VINHEASKIKETWKKDRGLEKYFRKLSKGDCHWLRFLGHWEAMPEPTVSPVNASDIHWSSSLPD MGGVLLTQRTLLSLVLAALLFPSMASMGLADPHSLCYDITVPKFRPGPRWCVAQGGQVDEKTFLLHYDCGSKTVPVSP GKKLNVTAWKAQNPVLRVVDILTQQLDIQLENYIPKEPLTLQARMSCEQKAEHGGSGWQLSFDGQIFLLFDSEN RMWTTVHPGARKMKEKWENDKDMTMSFHYISMGDCTGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPPTMSSGTAQPR MGGVLLTQRTLLSLVLAALLFPSMASMRRDDPHSLCYDITVPKFRPGPRWCVAQGGQVDEKTFLLHYDCGSKTVPVSP GKKLNVTMAWKAQNPVLRVVDILTEQLLDIQLENYTPKEPLTLQARMSCEQKAEHGGSGWQFSIDGQTFLLFDSEK RMWTTVHPGARKMKEKWENDKDVAMSFHYISMGDCTGWLEDFLMGMDSTLEPSAG
SP-RET1Ged	96	
SP-RAET1Led	97	

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

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

- Ashwell, J. D. y R. D. Klusner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor". *Annu Rev Immunol* 8: 139-67.
- 20 Betts, M. R., J. M. Brenchley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation". *J Immunol Methods* 281(1-2): 65-78.
- Bierer B.E. et al. (1993) "Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology". *Curr Opin Immunol* 5(5): 763-73.
- 25 Bix M. et al (1991). "Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice". *Nature* 349(6307):329-31.
- Boch, J., H. Scholze, et al. (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors". *Science* 326 (5959): 1509-12.
- 30 Cambier, J. C. (1995). "Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)". *J Immunol* 155(7): 3281-5.
- Carter L, et al. (2002). "PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2". *Eur. J. Immunol.* 32 (3): 634-43.
- 35 Cong, L., F. A. Ran, et al. (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems". *Science* 339 (6121): 819-23.
- 40 Critchlow, S. E. y S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man". *Trends Biochem Sci* 23(10): 394-8.
- Deltcheva, E., K. Chylinski, et al. (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III". *Nature* 471(7340): 602-7.
- 45 Gasiunas, G. et al. (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria". *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(39): E2579-86.
- Haseloff y Gerlach (1988). "Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities". *Nature* 334: 585-591.
- 50 Jena, B., G. Dotti, et al. (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor". *Blood* 116(7): 1035-44.
- 55 Jinek, M., K. Chylinski, et al. (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity". *Science* 337 (6096): 816-21.
- Liu L. et al. (1991). "Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes". *Cell* 66(4): 807-15.
- 60 Ma, J. L., E. M. Kim, et al. (2003). "Yeast Mre11 and Rad51 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences". *Mol Cell Biol* 23(23): 8820-8.
- 65 Mach B., Steimle V, Reith W (1994). "MHC class II-deficient combined immunodeficiency: a disease of gene regulation". *Immunol. Rev.* 138 (1): 207-21.

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

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

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Collectis

<120> MÉTODO PARA GENERAR LINFOCITOS T COMPATIBLES PARA TRASPLANTE ALOGÉNICO

20 <130> P81400799PCT00

<150> PA 201470119

<151> 11/03/2014

25 <160> 97

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

30 <211> 119

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 1

ES 2 782 125 T3

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
 20 25 30

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

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
 50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
 65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
 85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
 100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
 115

<210> 2
 <211> 6673
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

10 aatataagtg gaggcgtcgc gctggcgggc attcctgaag ctgacagcat tcgggccgag 60

ES 2 782 125 T3

atgtctcgct ccgtggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggagget 120
 atccagcgtg agtctctcct accctcccgc tctggtcctt cctctcccgc tctgcaccct 180
 ctgtggccct cgctgtgctc tctcgctccg tgaactccct tctccaagtt ctcttgggtg 240
 gcccgccgtg gggctagtcc agggctggat ctccgggaag cggcgggggtg gcctgggagt 300
 ggggaagggg gtgcgcaccc gggacgcgcg ctacttgccc ctttcggcgg ggagcagggg 360
 agacctttgg cctacggcga cgggagggtc gggacaaagt ttagggcgtc gataagcgtc 420
 agagcgcgca ggttggggga gggtttctct tccgctcttt cgcggggcct ctggctcccc 480
 cagcgcagct ggagtggggg acgggtaggc tcgtcccaaa ggcgcggcgc tgaggtttgt 540
 gaacgcgtgg aggggcgctt ggggtctggg ggaggcgtcg cccgggtaag cctgtctgct 600
 gcggctctgc ttcccttaga ctggagagct gtggacttcg tctagggccc cgctaagttc 660
 gcatgtccta gcacctctgg gtctatgtgg ggccacaccg tggggaggaa acagcacgcg 720
 acgtttgtag aatgcttggc tgtgatacaa agcggtttcg aataattaac ttattgttc 780
 ccatcacatg tcacttttaa aaaattataa gaactaccgc ttattgacat ctttctgtgt 840
 gccaaggact ttatgtgctt tgcgtcattt aattttgaaa acagttatct tccgccatag 900
 ataactacta tggttatctt ctgcctctca cagatgaaga aactaaggca ccgagatttt 960
 aagaaactta attacacagg ggataaatgg cagcaatcga gattgaagtc aagcctaacc 1020
 agggcttttg cgggagcgcg tgccttttgg ctgtaattcg tgcatttttt ttaagaaaa 1080
 acgcctgcct tctgcgtgag attctccaga gcaactggg cggcatgggc cctgtggtct 1140
 tttcgtacag agggcttctt ctttggctct ttgcctgggt gtttccaaga tgtactgtgc 1200
 ctcttacttt cggttttgaa aacatgaggg ggttgggcgt ggttagcttac gcctgtaatc 1260
 ccagcactta gggaggccga ggcgggagga tggcttgagg tccgtagttg agaccagcct 1320
 ggccaacatg gtgaagcctg gtctctacaa aaaataataa caaaaattag ccgggtgtgg 1380
 tggctcgtgc ctgtggtccc agctgctccg gtggctgagg cgggaggatc tcttgagctt 1440
 aggcttttga gctatcatgg cgcagtgca ctccagcgtg ggcaacagag cgagaccctg 1500
 tctctcaaaa aagaaaaaaaa aaaaaaaga aagagaaaag aaaagaaaga aagaagtgaa 1560
 ggtttgtcag tcaggggagc tgtaaaacca ttaataaaga taatccaaga tggttaccaa 1620
 gactgttgag gacgccagag atcttgagca ctttctaagt acctggcaat aactaagcg 1680
 cgctcacctt ttcctctggc aaaacatgat cgaagcaga atgttttgat catgagaaaa 1740
 ttgcatttaa tttgaataca atttatttac aacataaagg ataatgtata taccaccacc 1800
 attactggta tttgctgggt atgttagatg tcattttaaa aaataacaat ctgatattta 1860
 aaaaaaaaaa ttattttgaa aatttccaaa gtaatacatg ccatgcatag accatttctg 1920
 gaagatacca caagaaacat gtaatgatga ttgcctctga aggtctattt tcctcctctg 1980

ES 2 782 125 T3

acctgtgtgt	gggttttgtt	tttgttttac	tgtgggcata	aattaatfff	tcagttaagt	2040
tttggagct	taaataactc	tccaaaagtc	ataaagccag	taactggttg	agcccaaatt	2100
caaaccagc	ctgtctgata	cttgtcctct	tcttagaaaa	gattacagtg	atgctctcac	2160
aaaatcttg	cgccttccct	caaacagaga	gttccaggca	ggatgaatct	gtgctctgat	2220
ccctgaggca	ttaatatgt	tcttattatt	agaagctcag	atgcaaagag	ctctcttagc	2280
ttttaatgtt	atgaaaaaaaa	tcaggtcttc	attagattcc	ccaatccacc	tcttgatggg	2340
gctagtagcc	tttccctaat	gataggggtg	ttctagagag	atatatctgg	tcaaggtggc	2400
ctggactacc	tccttctccc	cacagcctcc	cagacaagga	ggagtagctg	ccttttagtg	2460
atcatgtacc	ctgaatataa	gtgtatttaa	aagaatttta	tacacatata	tttagtgtca	2520
atctgtatat	ttagtagcac	taacacttct	cttcattttc	aatgaaaaat	atagagttta	2580
taatattttc	ttcccacttc	cccattggatg	gtctagtcot	gcctctcatt	ttggaaagta	2640
ctgtttctga	aacattaggc	aatatattcc	caacctggct	agtttacagc	aatcacctgt	2700
ggatgcta	taaaacgcaa	atcccactgt	cacatgcatt	actccatttg	atcataatgg	2760
aaagtatgtt	ctgtcccatt	tgccatagtc	ctcacctatc	cctggttgat	tttatcgggt	2820
ccaactcaac	catttaaggt	atgtgccagc	tcttgatgc	atthaggttt	tgtttctttg	2880
tttttagct	catgaaatta	ggtacaaaag	cagagagggg	tctggcatat	aaaacctcag	2940
cagaaataaa	gaggttttgt	tgtttggtaa	gaacatacct	tgggttggtt	gggcacggtg	3000
gctcgtgcct	gtaatcccaa	cactttggga	ggccaaggca	ggctgatcac	ttgaagttgg	3060
gagttcaaga	ccagcctggc	caacatggtg	aatcccgtc	tctactgaaa	atacaaaaat	3120
taaccaggca	tggtggtgtg	tgcctgtagt	cccaggaatc	acttgaacc	aggaggcgga	3180
ggttgacgtg	agctgagatc	tcaccactgc	acactgcact	ccagcctggg	caatggaatg	3240
agattccatc	caaaaaata	aaaaaataaa	aaaataaaga	acataccttg	ggttgatcca	3300
cttaggaacc	tcagataata	acatctgcca	cgtatagagc	aattgctatg	tcccaggcac	3360
tctactagac	acttcataca	gtttagaaaa	tcagatgggt	gtagatcaag	gcaggagcag	3420
gaaccaaaaa	gaaaggcata	aacataagaa	aaaaaatgga	aggggtggaa	acagagtaca	3480
ataacatgag	taatttgatg	ggggctatta	tgaactgaga	aatgaacttt	gaaaagtatc	3540
ttggggccaa	atcatgtaga	ctcttgagtg	atgtgttaag	gaatgctatg	agtgctgaga	3600
gggcatcaga	agtccttgag	agcctccaga	gaaaggctct	taaaaatgca	gcgcaatctc	3660
cagtacaga	agatactgct	agaaatctgc	tagaaaaaaa	acaaaaaagg	catgtataga	3720
ggaattatga	gggaaagata	ccaagtcacg	gtttattctt	caaaatggag	gtggcttgtt	3780
gggaaggtgg	aagctcattt	ggccagagtg	gaaatggaat	tgggagaaat	cgatgaccaa	3840

ES 2 782 125 T3

atgtaaacac ttggtgctg atatagcttg acaccaagtt agccccaagt gaaataccct 3900
ggcaatatta atgtgtcttt tcccgatatt cctcaggtac tccaaagatt caggtttact 3960
cacgtcatcc agcagagaat ggaaagtcaa atttcctgaa ttgctatgtg tctgggtttc 4020
atccatccga cattgaagtt gacttactga agaatggaga gagaattgaa aaagtggagc 4080
attcagactt gtctttcagc aaggactggg ctttctatct cttgtactac actgaattca 4140
ccccactga aaaagatgag tatgcctgcc gtgtgaacca tgtgactttg tcacagccca 4200
agatagttaa gtggggtaag tcttacattc ttttgtaagc tgctgaaagt tgtgtatgag 4260
tagtcatatc ataaagctgc tttgatataa aaaaggtcta tggccatact accctgaatg 4320
agtcccatcc catctgatat aaacaatctg catattggga ttgtcagga atgttcttaa 4380
agatcagatt agtggcacct gctgagatac tgatgcacag catggtttct gaaccagtag 4440
ttccctgca gttgagcagg gagcagcagc agcacttgca caaacata tacctctta 4500
acacttctta cctactggct tcctctagct tttgtggcag cttcaggtat atttagcact 4560
gaacgaacat ctcaagaagg tataggcctt tgtttgtaag tcctgctgtc ctagcatcct 4620
ataatcctgg acttctccag tactttctgg ctggattggg atctgaggct agtaggaagg 4680
gcttgttcct gctgggtagc tctaaacaat gtattcatgg gtaggaacag cagcctattc 4740
tgccagcctt atttctaacc attttagaca tttgttagta catggtattt taaaagtaaa 4800
acttaatgtc ttctttttt ttctccactg tctttttcat agatcgagac atgtaagcag 4860
catcatggag gtaagttttt gaccttgaga aaatgttttt gtttactgt cctgaggact 4920
atztatagac agctctaaca tgataaccct cactatgtgg agaacattga cagagtaaca 4980
ttttagcagg gaaagaagaa tcctacaggg tcatgttccc ttctcctgtg gagtggcatg 5040
aagaaggtgt atggccccag gtatggccat attactgacc ctctacagag agggcaaagg 5100
aactgccagt atggtattgc aggataaagg caggtggtta cccacattac ctgcaaggct 5160
ttgatctttc ttctgccatt tccacattgg acatctctgc tgaggagaga aaatgaacca 5220
ctcttttcct ttgtataatg ttgttttatt cttcagacag aagagaggag ttatacagct 5280
ctgcagacat cccattcctg tatggggact gtgtttgcct cttagagggt cccaggccac 5340
tagaggagat aaagggaaac agattgttat aacttgatat aatgatacta taatagatgt 5400
aactacaagg agctccagaa gcaagagaga gggaggaact tggacttctc tgcatcttta 5460
gttgaggtcc aaaggctttt caatgaaatt ctactgccca gggtaacttg atgctgaaac 5520
cccattcaaa tctcctgtta tattctagaa caggggaattg atttgggaga gcatcaggaa 5580
ggtggatgat ctgccagtc aactgttag taaattgtag agccaggacc tgaactctaa 5640
tatagtcatg tgttacttaa tgacggggac atgttctgag aatgcttac acaaacctag 5700
gtgttgtagc ctactacagc cataggctac atggtatagc ctattgctcc tagactacaa 5760

ES 2 782 125 T3

acctgtacag cctgttactg tactgaatac tgtgggcagt tgtaacacaa tggtaagtat 5820
 ttgtgtatct aaacatagaa gttgcagtaa aaatatgcta ttttaatctt atgagaccac 5880
 tgtcatatat acagtccatc attgaccaaa acatcatatc agcatttttt cttctaagat 5940
 tttgggagca ccaaagggat aactaacag gatatactct ttataatggg tttggagaac 6000
 tgtctgcagc tacttctttt aaaaaggtga tctacacagt agaaattaga caagtttggg 6060
 aatgagatct gcaatccaaa taaaataaat tcattgctaa cttttttctt ttcttttcag 6120
 gtttgaagat gccgcatttg gattggatga attccaaatt ctgcttgctt gctttttaat 6180
 attgatatgc ttatacactt aactttatg cacaaaatgt agggttataa taatgttaac 6240
 atggacatga tcttctttat aattctactt tgagtgtctgt ctccatgttt gatgtatctg 6300
 agcaggttgc tccacaggta gctctaggag ggctggcaac ttagaggtgg ggagcagaga 6360
 attctcttat ccaacatcaa catcttggtc agatttgaac tcttcaatct cttgcactca 6420
 aagcttgta agatagttaa gcgtgcataa gttaacttcc aattacata ctctgcttag 6480
 aatttggggg aaaatttaga aatataattg acaggattat tggaaatttg ttataatgaa 6540
 tgaaacattt tgtcatataa gattcatatt tacttcttat acatttgata aagtaaggca 6600
 tggttgtggg taatctgggt ttttttgggt ccacaagtta aataaatcat aaaacttgat 6660
 gtgttatctc tta 6673

<210> 3
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

5

ES 2 782 125 T3

aatataagtg gaggcgtcgc gctggcgggc attcctgaag ctgacagcat tcgggccgag 60
atgtctcgct ccgtggcctt agctgtgctc gcgctactct ctctttctgg cctggaggct 120
atccagcgta ctccaaagat tcaggtttac tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca 180
aatttcctga attgctatgt gtctggggtt catccatccg acattgaagt tgacttactg 240
aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtctttcag caaggactgg 300
tctttctatc tcttgtaacta cactgaattc acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc 360
cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatcg agacatgtaa 420
gcagcatcat ggaggtttga agatgccgca tttggattgg atgaattcca aattctgctt 480
gcttgctttt taatattgat atgcttatac acttacactt tatgcacaaa atgtagggtt 540
ataataatgt taacatggac atgatcttct ttataattct actttgagtg ctgtctccat 600
gtttgatgta tctgagcagg ttgctccaca ggtagctcta ggagggctgg caacttagag 660
gtggggagca gagaattctc ttatccaaca tcaacatctt ggtcagattt gaactcttca 720

atctcttgca ctcaaagctt gttaagatag ttaagcgtgc ataagttaac ttccaattta 780
catactctgc ttagaatttg ggggaaaatt tagaaatata attgacagga ttattggaaa 840
tttgttataa tgaatgaaac attttgtcat ataagattca tatttacttc ttatacattt 900
gataaagtaa ggcattggtt tggttaatct ggtttatfff tgttccacaa gttaaataaa 960
tcataaaact tgatgtgta tctctta 987

5 <210> 4
<211> 1130
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 4

ES 2 782 125 T3

Met Arg Cys Leu Ala Pro Arg Pro Ala Gly Ser Tyr Leu Ser Glu Pro
 1 5 10 15

Gln Gly Ser Ser Gln Cys Ala Thr Met Glu Leu Gly Pro Leu Glu Gly
 20 25 30

Gly Tyr Leu Glu Leu Leu Asn Ser Asp Ala Asp Pro Leu Cys Leu Tyr
 35 40 45

His Phe Tyr Asp Gln Met Asp Leu Ala Gly Glu Glu Glu Ile Glu Leu
 50 55 60

Tyr Ser Glu Pro Asp Thr Asp Thr Ile Asn Cys Asp Gln Phe Ser Arg
 65 70 75 80

Leu Leu Cys Asp Met Glu Gly Asp Glu Glu Thr Arg Glu Ala Tyr Ala
 85 90 95

Asn Ile Ala Glu Leu Asp Gln Tyr Val Phe Gln Asp Ser Gln Leu Glu
 100 105 110

Gly Leu Ser Lys Asp Ile Phe Lys His Ile Gly Pro Asp Glu Val Ile
 115 120 125

Gly Glu Ser Met Glu Met Pro Ala Glu Val Gly Gln Lys Ser Gln Lys
 130 135 140

Arg Pro Phe Pro Glu Glu Leu Pro Ala Asp Leu Lys His Trp Lys Pro
 145 150 155 160

Ala Glu Pro Pro Thr Val Val Thr Gly Ser Leu Leu Val Gly Pro Val
 165 170 175

ES 2 782 125 T3

Ser Asp Cys Ser Thr Leu Pro Cys Leu Pro Leu Pro Ala Leu Phe Asn
 180 185 190

Gln Glu Pro Ala Ser Gly Gln Met Arg Leu Glu Lys Thr Asp Gln Ile
 195 200 205

Pro Met Pro Phe Ser Ser Ser Ser Leu Ser Cys Leu Asn Leu Pro Glu
 210 215 220

Gly Pro Ile Gln Phe Val Pro Thr Ile Ser Thr Leu Pro His Gly Leu
 225 230 235 240

Trp Gln Ile Ser Glu Ala Gly Thr Gly Val Ser Ser Ile Phe Ile Tyr
 245 250 255

His Gly Glu Val Pro Gln Ala Ser Gln Val Pro Pro Pro Ser Gly Phe
 260 265 270

Thr Val His Gly Leu Pro Thr Ser Pro Asp Arg Pro Gly Ser Thr Ser
 275 280 285

Pro Phe Ala Pro Ser Ala Thr Asp Leu Pro Ser Met Pro Glu Pro Ala
 290 295 300

Leu Thr Ser Arg Ala Asn Met Thr Glu His Lys Thr Ser Pro Thr Gln
 305 310 315 320

Cys Pro Ala Ala Gly Glu Val Ser Asn Lys Leu Pro Lys Trp Pro Glu
 325 330 335

Pro Val Glu Gln Phe Tyr Arg Ser Leu Gln Asp Thr Tyr Gly Ala Glu
 340 345 350

Pro Ala Gly Pro Asp Gly Ile Leu Val Glu Val Asp Leu Val Gln Ala
 355 360 365

Arg Leu Glu Arg Ser Ser Ser Lys Ser Leu Glu Arg Glu Leu Ala Thr
 370 375 380

Pro Asp Trp Ala Glu Arg Gln Leu Ala Gln Gly Gly Leu Ala Glu Val
 385 390 395 400

Leu Leu Ala Ala Lys Glu His Arg Arg Pro Arg Glu Thr Arg Val Ile
 405 410 415

Ala Val Leu Gly Lys Ala Gly Gln Gly Lys Ser Tyr Trp Ala Gly Ala
 420 425 430

ES 2 782 125 T3

Val Ser Arg Ala Trp Ala Cys Gly Arg Leu Pro Gln Tyr Asp Phe Val
 435 440 445

Phe Ser Val Pro Cys His Cys Leu Asn Arg Pro Gly Asp Ala Tyr Gly
 450 455 460

Leu Gln Asp Leu Leu Phe Ser Leu Gly Pro Gln Pro Leu Val Ala Ala
 465 470 475 480

Asp Glu Val Phe Ser His Ile Leu Lys Arg Pro Asp Arg Val Leu Leu
 485 490 495

Ile Leu Asp Gly Phe Glu Glu Leu Glu Ala Gln Asp Gly Phe Leu His
 500 505 510

Ser Thr Cys Gly Pro Ala Pro Ala Glu Pro Cys Ser Leu Arg Gly Leu
 515 520 525

Leu Ala Gly Leu Phe Gln Lys Lys Leu Leu Arg Gly Cys Thr Leu Leu
 530 535 540

Leu Thr Ala Arg Pro Arg Gly Arg Leu Val Gln Ser Leu Ser Lys Ala
 545 550 555 560

Asp Ala Leu Phe Glu Leu Ser Gly Phe Ser Met Glu Gln Ala Gln Ala
 565 570 575

Tyr Val Met Arg Tyr Phe Glu Ser Ser Gly Met Thr Glu His Gln Asp
 580 585 590

Arg Ala Leu Thr Leu Leu Arg Asp Arg Pro Leu Leu Leu Ser His Ser
 595 600 605

His Ser Pro Thr Leu Cys Arg Ala Val Cys Gln Leu Ser Glu Ala Leu
 610 615 620

Leu Glu Leu Gly Glu Asp Ala Lys Leu Pro Ser Thr Leu Thr Gly Leu
 625 630 635 640

Tyr Val Gly Leu Leu Gly Arg Ala Ala Leu Asp Ser Pro Pro Gly Ala
 645 650 655

Leu Ala Glu Leu Ala Lys Leu Ala Trp Glu Leu Gly Arg Arg His Gln
 660 665 670

Ser Thr Leu Gln Glu Asp Gln Phe Pro Ser Ala Asp Val Arg Thr Trp
 675 680 685

ES 2 782 125 T3

Ala Met Ala Lys Gly Leu Val Gln His Pro Pro Arg Ala Ala Glu Ser
690 695 700

Glu Leu Ala Phe Pro Ser Phe Leu Leu Gln Cys Phe Leu Gly Ala Leu
705 710 715 720

Trp Leu Ala Leu Ser Gly Glu Ile Lys Asp Lys Glu Leu Pro Gln Tyr
725 730 735

Leu Ala Leu Thr Pro Arg Lys Lys Arg Pro Tyr Asp Asn Trp Leu Glu
740 745 750

Gly Val Pro Arg Phe Leu Ala Gly Leu Ile Phe Gln Pro Pro Ala Arg
755 760 765

Cys Leu Gly Ala Leu Leu Gly Pro Ser Ala Ala Ala Ser Val Asp Arg
770 775 780

Lys Gln Lys Val Leu Ala Arg Tyr Leu Lys Arg Leu Gln Pro Gly Thr
785 790 795 800

Leu Arg Ala Arg Gln Leu Leu Glu Leu Leu His Cys Ala His Glu Ala
805 810 815

Glu Glu Ala Gly Ile Trp Gln His Val Val Gln Glu Leu Pro Gly Arg
820 825 830

Leu Ser Phe Leu Gly Thr Arg Leu Thr Pro Pro Asp Ala His Val Leu
835 840 845

Gly Lys Ala Leu Glu Ala Ala Gly Gln Asp Phe Ser Leu Asp Leu Arg
850 855 860

Ser Thr Gly Ile Cys Pro Ser Gly Leu Gly Ser Leu Val Gly Leu Ser
865 870 875 880

Cys Val Thr Arg Phe Arg Ala Ala Leu Ser Asp Thr Val Ala Leu Trp
885 890 895

Glu Ser Leu Gln Gln His Gly Glu Thr Lys Leu Leu Gln Ala Ala Glu
900 905 910

Glu Lys Phe Thr Ile Glu Pro Phe Lys Ala Lys Ser Leu Lys Asp Val
915 920 925

Glu Asp Leu Gly Lys Leu Val Gln Thr Gln Arg Thr Arg Ser Ser Ser

ES 2 782 125 T3

cttggggaag ctgagggcac gaggaggggc tgccagactc cgggagctgc tgcttgctg 120
 ggattcctac acaatgcgtt gcctggctcc acgccctgct gggtcctacc tgtcagagcc 180
 ccaaggcagc tcacagtgtg ccacatgga gttggggccc ctagaagggtg gctacctgga 240
 gcttcttaac agcgatgctg accccctgtg cctctaccac ttctatgacc agatggacct 300
 ggctggagaa gaagagattg agctctactc agaaccggac acagacacca tcaactgcga 360
 ccagttcagc aggctgttgt gtgacatgga aggtgatgaa gagaccaggg aggcttatgc 420
 caatatcgcg gaactggacc agtatgtctt ccaggactcc cagctggagg gcctgagcaa 480
 ggacattttc aagcacatag gaccagatga agtgatcggg gagagtatgg agatgccagc 540
 agaagttggg cagaaaagtc agaaaagacc cttcccagag gagcttccgg cagacctgaa 600
 gcaactggaag ccagctgagc cccccactgt ggtgactggc agtctcctag tgggaccagt 660
 gagcgactgc tccaccctgc cctgcctgcc actgcctgcg ctgttcaacc aggagccagc 720
 ctccggccag atgcgcctgg agaaaaccga ccagattccc atgcctttct ccagttcctc 780
 gttgagctgc ctgaatctcc ctgagggacc catccagttt gtccccacca tctccactct 840
 gccccatggg ctctggcaaa tctctgaggc tggaacaggg gtctccagta tattcatcta 900
 ccatggtgag gtgccccagg ccagccaagt accccctccc agtggattca ctgtccacgg 960
 cctcccaaca tctccagacc ggcaggctc caccagcccc ttcgctccat cagccactga 1020
 cctgcccagc atgcctgaac ctgccctgac ctcccagca aacatgacag agcacaagac 1080
 gtccccacc caatgcccg gactggaga ggtctccaac aagcttcaa aatggcctga 1140
 gccggtggag cagttctacc gctcactgca ggacacgtat ggtgccgagc ccgcaggccc 1200
 ggatggcatc ctagtggagg tggatctggt gcaggccagg ctggagagga gcagcagcaa 1260
 gagcctggag cgggaactgg ccaccccgga ctgggcagaa cggcagctgg cccaaggagg 1320
 cctggctgag gtgctgttgg ctgccaagga gcaccggcgg ccgcgtgaga cacgagtgat 1380
 tgctgtgctg ggcaaagctg gtcagggcaa gagctattgg gctggggcag tgagccgggc 1440
 ctgggcttgt ggccggcttc cccagtacga ctttgtcttc tctgtcccct gccattgctt 1500
 gaaccgtccg ggggatgcct atggcctgca ggatctgctc ttctccctgg gccacagcc 1560
 actcgtggcg gccgatgagg ttttcagcca catcttgaag agacctgacc gcgttctgct 1620
 catcctagac ggcttcgagg agctggaagc gcaagatggc ttcttcgaca gcacgtgcgg 1680
 accggcaccg gcggagccct gtcacctccg ggggctgctg gccggccttt tccagaagaa 1740
 gctgctccga ggttgcaccc tcctcctcac agcccggccc cggggccgcc tgggtccagag 1800
 cctgagcaag gccgacgcc tatttgagct gtccggcttc tccatggagc aggcccaggc 1860
 atacgtgatg cgctactttg agagctcagg gatgacagag caccaagaca gagccctgac 1920
 gtcctccgg gaccggccac ttcttctcag tcacagccac agccctactt tgtgccgggc 1980

ES 2 782 125 T3

agtgtgccag ctctcagagg ccctgctgga gcttggggag gacgccaagc tgccctccac 2040
 gctcacggga ctctatgtcg gcctgctggg ccgtgcagcc ctcgacagcc cccccggggc 2100
 cctggcagag ctggccaagc tggcctggga gctgggccgc agacatcaaa gtaccctaca 2160
 ggaggaccag ttcccatccg cagacgtgag gacctgggcg atggccaaag gcttagtcca 2220
 acaccaccg cgggccgcag agtccgagct ggccttcccc agcttcctcc tgcaatgctt 2280
 cctggggggc ctgtggctgg ctctgagtgg cgaaatcaag gacaaggagc tcccgcagta 2340
 cctagcattg accccaagga agaagaggcc ctatgacaac tggctggagg gcgtgccacg 2400
 ctttctggct gggctgatct tccagcctcc cgcccgtgc ctgggagccc tactcgggcc 2460
 atcggcggct gcctcgggtg acaggaagca gaagtgctt gcgaggtacc tgaagcggct 2520
 gcagccgggg aactgcggg cgcggcagct gctggagctg ctgcactgcg cccacgaggc 2580
 cgaggaggct ggaatttggc agcacgtggt acaggagctc cccggccgcc tctcttttct 2640
 gggcaccgc ctcacgcctc ctgatgcaca tgtactgggc aaggccttgg aggcggcggg 2700
 ccaagacttc tccctggacc tccgcagcac tggcatttgc ccctctggat tggggagcct 2760
 cgtgggactc agctgtgtca cccgtttcag ggctgccttg agcgacacgg tggcgctgtg 2820
 ggagtccctg cagcagcatg gggagaccaa gctacttcag gcagcagagg agaagtccac 2880
 catcgagcct ttcaaagcca agtccctgaa ggatgtggaa gacctgggaa agcttgtgca 2940
 gactcagagg acgagaagtt cctcgggaaga cacagctggg gagctccctg ctgttcggga 3000
 cctaaagaaa ctggagtttg cgctggggcc tgtctcaggc cccagggctt tccccaaact 3060
 ggtgcgggatc ctcacggcct tttcctccct gcagcatctg gacctggatg cgctgagtga 3120
 gaacaagatc ggggacgagg gtgtctcgca gctctcagcc accttcccc agctgaagtc 3180
 cttggaaacc ctcaatctgt cccagaacaa catcaactgac ctgggtgcct acaaactcgc 3240
 cgaggccctg ccttcgctcg ctgcatccct gctcaggcta agcttgtaca ataactgcat 3300
 ctgcgacgtg ggagccgaga gcttggctcg tgtgcttccg gacatggtgt ccctccgggt 3360
 gatggacgtc cagtacaaca agttcacggc tgccggggcc cagcagctcg ctgccagcct 3420
 tcggaggtgt cctcatgtgg agacgctggc gatgtggacg cccaccatcc cattcagtgt 3480
 ccaggaacac ctgcaacaac aggattcacg gatcagcctg agatgatccc agctgtgctc 3540
 tggacaggca tgttctctga ggacactaac cacgctggac cttgaaactgg gtacttgtgg 3600
 acacagctct totccaggct gtatcccatg agcctcagca tcctggcacc cggcccctgc 3660
 tggttcaggg ttggcccctg cccggctgcg gaatgaacca catcttgctc tgctgacaga 3720
 cacaggcccc gctccaggct cctttagcgc ccagttgggt ggatgcctgg tggcagctgc 3780
 ggtccacca ggagccccga ggccttctct gaaggacatt gcggacagcc acggccaggg 3840

ES 2 782 125 T3

cagagggagt gacagaggca gcccattct gcctgccag gcccctgcca ccctggggag 3900
aaagtacttc tttttttta ttttagaca gagtctcact gttgccagag ctggcgtgca 3960
gtggtgcat ctgggtcac tgcaacctcc gcctcttggg ttcaagcagat tcttctgctt 4020
cagcctccc agtagctggg actacaggca cccaccatca tgtctggcta atttttcatt 4080
tttagtagag acagggtttt gccatgttgg ccaggctggg ctcaaactct tgacctcagg 4140
tgatccacc acctcagcct cccaaagtgc tgggattaca agcgtgagcc actgcaccgg 4200
gccacagaga aagtacttct ccacctgct ctccgaccag acacctgac agggcacacc 4260
gggcactcag aagacactga tgggcaacct ccagcctgct aattccccag attgcaacag 4320
gctgggcttc agtggcagct gcttttgtct atgggactca atgcactgac attgttggcc 4380
aaagccaaag ctaggcctgg ccagatgcac cagcccttag cagggaaca gctaattggga 4440
cactaatggg gcggtgagag gggaacagac tggaagcaca gtttcatttc ctgtgtcttt 4500
tttactaca ttataaatgt ctctttaatg tcacagggcag gtccagggtt tgagttcata 4560
ccctgttacc attttggggg acccactgct ctggttatct aatatgtaac aagccacccc 4620
aatcatagt ggcttaaac aacctcaca tttta 4654

<210> 6
<211> 495
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Receptor de antígeno quimérico anti-CD19

<400> 6

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile
20 25 30
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
35 40 45
Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly
50 55 60
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr
65 70 75 80
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser
85 90 95

ES 2 782 125 T3

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met
 145 150 155 160

Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser
 165 170 175

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr
 180 185 190

Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
 195 200 205

Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu
 225 230 235 240

Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro
 245 250 255

Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro
 260 265 270

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 275 280 285

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 290 295 300

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
 305 310 315 320

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
 325 330 335

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 340 345 350

ES 2 782 125 T3

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 355 360 365

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg
 370 375 380

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 385 390 395 400

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 405 410 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 420 425 430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 435 440 445

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 450 455 460

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

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485 490 495

5 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> CAR anti-CD19
 <400> 7

Ala
 1 5 10 15

Ala

15 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 8
 gagaatcaaa atcggatgaat agg 23

<210> 9
 <211> 23

ES 2 782 125 T3

	<212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 9 ttcaaacct gtcagtgatt ggg	23
10	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 10 tgtgctagac atgaggtcta tgg	23
20	<210> 11 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 11 cgtcattgagc agattaaacc cgg	23
30	<210> 12 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 12 tcagggttct ggatatctgt ggg	23
40	<210> 13 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 13 gtcagggttc tggatatctg tgg	23
50	<210> 14 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 14 ttcggaaacc aatcactgac agg	23
60	<210> 15 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 15 taaaccggc cactttcagg agg	23
70	<210> 16 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
75	<400> 16 aaagtcagat ttgtgctcc agg	23
80	<210> 17 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 782 125 T3

	<400> 17 aacaatgtg tcacaaagta agg	23
5	<210> 18 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 18 tggattaga gtctctcagc tgg	23
15	<210> 19 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 19 taggcagaca gactgtcac tgg	23
25	<210> 20 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 20 agctgtgaca cggcagggtc agg	23
35	<210> 21 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 21 gctggtacac ggcagggta ggg	23
45	<210> 22 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 22 tctctcagct ggtacacggc agg	23
55	<210> 23 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 23 ttcaaaacc tgcagtgat tgg	23
65	<210> 24 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 24 gattaaacc ggccacttc agg	23
	<210> 25 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 25	

ES 2 782 125 T3

	ctcgaccagc ttgacatcac agg	23
5	<210> 26 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 26 agagtctctc agctggtaca cgg	23
15	<210> 27 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 27 ctctcagctg gtacacggca ggg	23
20	<210> 28 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 28 aagttctctgt gatgtcaagc tgg	23
30	<210> 29 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 29 atcctcctcc tgaaagtggc cgg	23
40	<210> 30 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 30 tgctcatgac gctgcggtg tgg	23
45	<210> 31 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 31 acaaaactgt gctagacatg agg	23
55	<210> 32 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 32 attgtttga gaatcaaaat egg	23
60	<210> 33 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 33 catcacagga actttctaaa agg	23

ES 2 782 125 T3

	<210> 34	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 34	
	gtcgagaaaa gcttgaaac agg	23
	<210> 35	
10	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 35	
15	ccacttcag gaggaggatt egg	23
	<210> 36	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 36	
	ctgacagggtt ttgaaagttt agg	23
25	<210> 37	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 37	
30	agctttgaaa caggaagac agg	23
	<210> 38	
	<211> 23	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 38	
40	tggaataatg ctgtgttga agg	23
	<210> 39	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 39	
	agagcaacag tgctgtggcc tgg	23
	<210> 40	
50	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 40	
55	ctgtgtcca gctgaggta ggg	23
	<210> 41	
	<211> 23	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 41	
	ctgcggtgt ggtccagctg agg	23
65	<210> 42	
	<211> 23	

ES 2 782 125 T3

	<212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 42 tgtgtccag ctgaggtgag ggg	23
10	<210> 43 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 43 cttctcccc agcccaggta agg	23
20	<210> 44 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 44 acacggcagg gtcagggttc tgg	23
30	<210> 45 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 45 ctcaagagc aacagtgctg tgg	23
40	<210> 46 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 46 ctggggaaga aggtgtcttc tgg	23
50	<210> 47 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 47 tcctcctct gaaagtggcc ggg	23
60	<210> 48 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<400> 48 ttaatctgct catgacgctg egg	23
70	<210> 49 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
75	<400> 49 acccggccac tttcaggagg agg	23
80	<210> 50 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 782 125 T3

	<400> 50 ttctcccca gccaggtaa ggg	23
5	<210> 51 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 51 cttacctggg ctggggaaga agg	23
15	<210> 52 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 52 gacacctct tcccagccc agg	23
25	<210> 53 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 53 gctgtgtcc agctgagtg agg	23
35	<210> 54 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 54 ccgaatcctc ctctgaaag tgg	23
45	<210> 55 <211> 49 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 55 ttcctccca ggcagctcac agtgtgccac catggagtg gggccccta	49
55	<210> 56 <211> 49 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 56 tgctctacc acttctatga ccagatggac ctggctggag aagaagaga	49
65	<210> 57 <211> 49 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 57 tctcatcca agggactttt cctcccagaa cccgacacag acaccatca	49
	<210> 58 <211> 49 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 58	

ES 2 782 125 T3

	tgttgtgta catggaaggt gatgaagaga ccagggaggc ttatgccaa	49
	<210> 59	
	<211> 47	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 59	
10	ccaaagattc aggtttactc acgtcatcca gcagagaatg gaaagtc	47
	<210> 60	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 60	
	ttgtcccaca gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgaga	49
	<210> 61	
20	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 61	
25	tggtgtgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa aaggccaca	49
	<210> 62	
	<211> 50	
	<212> ADN	
30	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 62	
	ttcccaccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctcca	50
35	<210> 63	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 63	
40	tttagaaagt tcctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc ttgaaaca	49
	<210> 64	
	<211> 49	
45	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 64	
50	tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc gattttgatt ctcaaaca	49
	<210> 65	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 65	
	tatatcacag acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaaga	49
	<210> 66	
60	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 66	
65	tgaggctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaaca	49

ES 2 782 125 T3

<210> 67
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de nucleasa TALE

<400> 67

10

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac      60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc      120
aaaccgaagg ttcggttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt      180
acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa cccccggcag cgttagggac cgtcgcctgtc      240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc      300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg      360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggg caacttctca agattgcaaa acgtggcggc      420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac      480
ttgaccccgg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag      540
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg      600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcgctggtg      660
ccggtgctgt gccaggccca cggttgacc cgggagcagg tgggtggccat cgccagcaat      720
attggtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct gtgccaggcc      780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg      840
ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagc cccacggctt gaccccgag      900
caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg      960
ctggttgcgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc     1020
agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc     1080
    
```

ES 2 782 125 T3

caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag 1140
 caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
 ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260
 cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc 1320
 atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1380
 ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc 1440
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1500
 ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 1560
 acggtgcagg cgctggtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1620
 gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg 1680
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat 1740
 aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1800
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 1860
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1920
 caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980
 ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
 agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat 2100
 ccggcggttg ccgcttgac caacgaccac ctcgctgcct tggcctgcct cggcgggcgt 2160
 cctgcgctgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
 aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
 gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcacc ccaggaccgat cctggagatg 2340
 aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtccc 2400
 aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
 gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
 aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
 gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
 aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
 tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag 2760
 gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 68
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 782 125 T3

<220>

<223> Secuencia de nucleasa TALE

5 <400> 68

```

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc      60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag      120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca      180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg      240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac      300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc      360
acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag      420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcaactg      480
acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt      540
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc      600
ttgaccccgg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag      660
acggtgcagg cgctggtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg      720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggcca gcggctgttg      780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat      840
ggcggtgcca agcagggcgt ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgct gtgccaggcc      900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg      960
ctggagacgg tccagcggct gttgccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccccag      1020
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg      1080
ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccgg agcaggtggt ggccatcgcc      1140
agccacgatg ggggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggetggtgcc ggtgctgtgc      1200
caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag      1260
caggcgctgg agacggcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc      1320
ccggagcagg tggaggccat cgccagcaat attggtggca agcagggcgt ggagacgggtg      1380
caggcgctgt tgccgggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc      1440
atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccgggtg      1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg      1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc      1620
ttgaccccgg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg ggggcaagca ggcgctggag      1680
acggtccagc ggctggtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg      1740

```

ES 2 782 125 T3

gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtctgtg 1800
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagccac 1860
 gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgct gtgccaggcc 1920
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 1980
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccctcag 2040
 caggtggtgg ccatgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100
 cagttatctc gccctgatcc ggcgctggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg 2160
 gcctgcctcg gcgggctcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
 agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
 ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga togccccgaa cagcaccag 2340
 gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
 aagcacctgg gcggctccag gaagcccagc ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
 gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gccatcggc 2520
 caggccgacg aatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
 cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
 tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
 tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
 ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
 gccgactgat aa 2832

<210> 69
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleasa TALE

<400> 69

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atogattacc catacgtatgt tccagattac 60
 gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
 aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
 acacacggcg acatcgttgc gttaagccaa caccggcgag cgttagggac cgtcgctgtc 240
 aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
 ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
 agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420

ES 2 782 125 T3

gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtcaac	480
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	cccagcagc	tggtggccat	cgccagcaat	720
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccgag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctggtgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgacggcgct	gttgccggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgacccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccgag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgccctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtcgctt	tggcctgcct	cggcgggcgt	2160
cctgcgctgg	atgcagtgaa	aaagggattg	gggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgccccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340

ES 2 782 125 T3

aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc 2400
 aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
 gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
 aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
 gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
 aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
 tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag 2760
 gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

5 <210> 70
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleasa TALE

<400> 70

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccggcgc tgccaagttc 60
 gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
 cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca 180
 ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg 240
 ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgcag cgttgccaga ggcgacacac 300
 gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360
 acgggtggcg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
 attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgactg 480
 acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag cagggtggtg ccatcgccag ccacgatggc 540
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgcccg tgctgtgcca ggcccacggc 600
 ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 660
 acgggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720
 gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgtgag agacggcca gcggtgttg 780
 ccgggtgctg gccaggcca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cgccagcaat 840
 attggtggca agcagggcgt ggagacggtg caggcgtgtg tgccgggtgct gtgccagggc 900
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtg caagcagggc 960
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1020
 cagggtggtg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080

ES 2 782 125 T3

ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1140
 agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1200
 caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaataa tggaggcaag 1260
 caggcgctgg agacggtcca gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
 ccccagcagg tggaggccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1380
 cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc 1440
 atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1500
 ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag caggtggtgg ccatcgccag caatattggt 1560
 ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1620
 ttgaccccgg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 1680
 acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 1740
 gtggccatcg ccagcaatat tggaggcaag caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg 1800
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggaggccat cgccagccac 1860
 gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1920
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtg caagcaggcg 1980
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
 caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100
 cagttatctc gccctgatcc ggcgttgccc gcgttgacca acgaccacct cgtcgccttg 2160
 gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
 agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
 ctgaagtacg tgcccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag 2340
 gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
 aagcacctgg gcggctccag gaagcccgc ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
 gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
 caggccgacg aatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaaca gcacatcaac 2580
 cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
 tccggccact tcaaggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
 tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
 ggcaccctga cctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
 gccgactgat aa 2832

<210> 71
 <211> 2814
 <212> ADN

ES 2 782 125 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleasa TALE

5

<400> 71

atgggcatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgaatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggctcg	ccacgggttt	180
acacacgctc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccggcgag	cgtagggac	cgctcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgctc	300
ggcaaacagt	ggctcggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctggtgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcggtctgtg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	720
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	780
cacggttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atgccagca	atggcgggtg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcgg	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctggtgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	gcggtctgtg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	1200
ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	attggtggca	agcaggcgct	ggagacggtg	1260
caggcgctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	ggtgccggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccggag	caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccgg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gaggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtccagc	ggctggtgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctggtg	1680

ES 2 782 125 T3

ccggtgctgt gccaggcca eggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat 1740
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggctgt gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 1920
caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg 1980
ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattggtg cccagttatc tcgcctgat 2100
ccggcgttgg ccgcgttgac caacgaccac ctogtcgcct tggcctgcct cggcgggctg 2160
cctgcgctgg atgcagtga aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc 2400
aggaagccc acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaag cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgcctgctg 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 72
<211> 2832
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Secuencia de nucleasa TALE

10

<400> 72

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgccgc tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca 180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360
acgggtggcg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg 480

ES 2 782 125 T3

acgggtgccc cgctcaactt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 540
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 600
 ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag 660
 acggtccagc ggctggtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 720
 gtggccatcg ccagcaataa tggaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 780
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat 840
 aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 900
 cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 960
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccgag 1020
 caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
 ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1140
 agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctggtgcc ggtgctgtgc 1200
 caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg gtggccatcg ccagcaatgg cggaggcaag 1260
 caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
 cccagcagg tggaggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1380
 cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cagcgttga cccccagca ggtggtggcc 1440
 atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1500
 ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caataatggt 1560
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1620
 ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 1680
 acggtccagc ggctggtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1740
 gtggccatcg ccagcaataa tggaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 1800
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggaggccat cgccagcaat 1860
 ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1920
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg 1980
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccctcag 2040
 caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100
 cagttatctc gccctgatcc ggcggtggcc gcggtgacca acgaccacct cgtgccttg 2160
 gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
 agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
 ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag 2340

ES 2 782 125 T3

gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccgac ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
caggccgacg aatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaaca gcacatcaac 2580
ccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

5 <210> 73
<211> 2814
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de nucleasa TALE

<400> 73

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
acacacgcbc acatcgttgc gttaagcaa caccggcag cgtagggac cgtcgtgtc 240
aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgagc tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 540
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 600
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgtgag agacggtcca gcggctgtt 660
ccggtgctgt gccaggcca cggcttgacc ccggagcagg tggtaggcat cggcagccac 720
gatggcggca agcagggcgt ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgct gtgccaggcc 780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tgcagggcgt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 900
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960
ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1020
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080

ES 2 782 125 T3

caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag	1140
caggcgctgg agacgggtcca gcggtctgtg ccggtgctgt gccaggcca cggcttgacc	1200
ccccagcagg tggtagccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc	1260
cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cagggttga ccccgagca ggtggtggcc	1320
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgct gttgccggtg	1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag cagggtgtgg ccatcgccag caataatggt	1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
ttgaccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	1560
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg	1620
gtggccatcg ccagcaatgg cggtaggcaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtctgtg	1680
ccggtgctgt gccaggcca cggcttgacc ccggagcagg tggtagccat cgccagccac	1740
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc	1800
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccgag	1920
cagggtgtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcagggtgt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat	2100
ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctcgctgcct tggcctgcct cggcggcgct	2160
cctgcgctgg atgcagtgaa aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac	2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg	2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc	2400
aggaagccc acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggcca cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag	2580
gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgcctgctg	2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag	2760
gaggtagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814

<210> 74
 <211> 2832
 <212> ADN

ES 2 782 125 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleasa TALE

5

<400> 74

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccgc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgttcgacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgtag	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaac	gtggcggcgt	gaccgcagtg	gaggcagtgc	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgcc	cgctcaactt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acggtccagc	ggctggtgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcggctggtg	780
ccggtgctgt	gccaggcca	cgcttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	840
attggtggca	agcaggcgct	ggagacggtg	caggcgctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1080
ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctggtgcc	ggtgctgtgc	1200
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	1260
caggcgctgg	agacggtcca	gcggctggtg	ccggtgctgt	gccaggcca	cgcttgacc	1320
cccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcgggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acggtccagc	ggctggtgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	1740

ES 2 782 125 T3

gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggcca gcggtgttg 1800
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat 1860
 ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1920
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcgggtg caagcaggcg 1980
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccctcag 2040
 caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100
 cagttatctc gccctgatcc ggcggtggcc gcggtgacca acgaccacct cgtcgccttg 2160
 gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgctggat gcagtgaaa agggattggg ggatcctatc 2220
 agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
 ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag 2340
 gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
 aagcacctgg gcggtccag gaagcccagc ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
 gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gccatcggc 2520
 caggccgacg aatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
 cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
 tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
 tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
 ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
 gccgactgat aa 2832

5 <210> 75
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 75
 atcactggca tctggactcc a 21

15 <210> 76
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador de PCR

<400> 76
 agagccccta ccagaaccag ac 22

25 <210> 77
 <211> 22

ES 2 782 125 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 77 ggacctagta acataattgt gc	22
10	<210> 78 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador de PCR	
20	<400> 78 cctcatgtct agcacagttt	20
25	<210> 79 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 79 accagctcag ctccacgtgg t	21
35	<210> 80 <211> 58 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 80 tctcgctcgg tggccttagc tgtgctcgcg ctactctctc tttctggcct ggaggcta	58
45	<210> 81 <211> 2814 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Beta2M T01- TALEN - IZQUIERDA	
	<400> 81	
	atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
	gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
	aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgag caccacgagg cactggtcgg ccacggggtt	180
50	acacacgcgc acatcgttgc gttaagccaa caccggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240

ES 2 782 125 T3

aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcgtc 300
ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacggtggc gggagagttg 360
agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 540
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 600
gtggccatcg ccagcaataa tggtaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 660
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtaggcat cgccagccac 720
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 780
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 840
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 900
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960
ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1020
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080
caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggtaggcaag 1140
caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
ccccagcagg tggtaggcat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260
cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc 1320
atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1380
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg 1440
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1500
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 1560
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcaggtg 1620
gtggccatcg ccagcaatg cggtaggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtgttg 1680
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tggtaggcat cgccagcaat 1740
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1800
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1860
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1920
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980
ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcaggtggt ggccatcgcc 2040
agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg ccagttatc tcgccctgat 2100
ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctcgtcgcct tggcctgcct cggcggcgt 2160

ES 2 782 125 T3

cctgcgctgg atgcagtgaa aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
gagtacatcg agctgatcga gatcgccccg aacagcacc caggaccgtat cctggagatg 2340
aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc 2400
aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacatg gccaggccga cgaaatgcatg 2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttccctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgtgctg 2700
tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 82
<211> 2832
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Beta2M T01 TALEN -DERECHA

<400> 82
--- --
atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgcccgc tgccaagttc 60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca 180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg 240
ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgag cgttgccaga ggcgacacac 300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360
acgggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg 480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag cagggtgtgg ccatcgccag caatattggt 540
ggcaagcagc cgctggagac ggtgcaggcg ctggtgcccg tgctgtgcca ggcccacggc 600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 660
acgggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720
gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgttg agacggtcca gcggtctgtg 780
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tgggtggccat cggcagccac 840
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 900

ES 2 782 125 T3

cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcgggtgg caagcaggcg 960
ctggagacgg tccagcggct gttgccgggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccggag 1020
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1140
agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1200
caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag 1260
caggcgctgg agacgggtgca ggcgctggtg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1320
ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1380
cagcggctgt tgccgggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc 1440
atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccgggtg 1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc 1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1620
ttgacccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 1680
acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 1740
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag caggcgctgg agacgggtgca ggcgctggtg 1800
ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat 1860
aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgct gtgccaggcc 1920
cacggcttga ccccggagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tgcaggcgct gttgccgggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcggtggcc gcggtgacca acgaccacct cgtgccttg 2160
gcctgcctcg gcggcgctcc tgcgctggat gcagtaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccacg 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggctccag gaagcccagc ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
caggccgacg aatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820

ES 2 782 125 T3

gccgactgat aa 2832

5 <210> 83
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de B2M objetivo de T02-TALEN

<400> 83
 tccaaagatt caggtttact cacgctatcc agcagagaat ggaaagtcaa 50

15 <210> 84
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Beta2M T02-TALEN - IZQUIERDA

<400> 84

atgggcatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catac gatgt tccagattac 60

gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120

aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgcaag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180

acacacgcg acatcgttgc gttaagccaa caccocggcag cgttagggac cgtcgtctgc 240

aagtatcagg acatgatcgc agcgttgcca gagggcagac acgaagc gat cgttggcgctc 300

ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgctctg gaggccttgc tcacgggtggc gggagagttg 360

agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcggc 420

gtgaccgca tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac 480

ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg gcggcaagca ggcgctggag 540

acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 600

gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggecgtgg agacgggtcca gcggctgttg 660

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggggccat cgcagcaat 720

attggtggca agcaggcgtt ggagacggtg caggcgtctg tgccgggtgct gtgccaggcc 780

cacggcttga ccccggagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcagcgg 840

ctggagacgg tgcaggcgtt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccgag 900

caggtggtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgtggagac ggtgcagcgg 960

ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1020

agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1080

caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tggggcaag 1140

25

ES 2 782 125 T3

caggcgctgg agacgggtgca ggcgctggtg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc 1200
 ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc 1260
 cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga cccccagca ggtggtggcc 1320
 atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1380
 ctgtgccagg cccacggctt gaccccggag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc 1440
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1500
 ttgaccccgg agcagggtgt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 1560
 acggtgcagg cgctggtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ccagcagggtg 1620
 gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggtggtt 1680
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tgggtggccat cgccagcaat 1740
 aatggtggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1800
 cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 1860
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1920
 caggtggtgg ccatcgccag caatggcggg ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1980
 ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccctc agcagggtgt ggccatcgcc 2040
 agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattggtt cccagttatc tcgccctgat 2100
 ccggcgttgg ccgcttgac caacgaccac ctcgctgcct tggcctgcct cggcgggct 2160
 cctgcgctgg atgcagtgaa aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg 2220
 aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
 gagtacatcg agctgatcga gatcgcccgg aacagcacc aggaccgtat cctggagatg 2340
 aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc 2400
 aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
 gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacg gccaggccga cgaaatgcag 2520
 aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
 gtgtaccct ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttcg tgtccggcca cttcaagggc 2640
 aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
 tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctggag 2760
 gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 85
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 782 125 T3

<223> Beta2M T02-TALEN DERECHA

<400> 85

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccgc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgttcgacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcggcgt	gaccgcagtg	gaggcagtgc	atgcatggcg	caatgcaactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccccagggc	600
ttgacccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatattg	tgggcaagca	ggcgctggag	660
acggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtctgtg	780
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	cccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	840
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccagggc	900
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcgggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggg	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggccccagggc	ttgacccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agccacgatg	gcggaagca	ggcgtggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	1260
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtctgtg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	attggtggca	agcaggcgct	ggagacggtg	1380
caggcgctgt	tgccgggtgct	gtgccagggc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atggcgggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggg	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccccagggc	1620
ttgacccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggaagca	ggcgctggag	1680
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtctgtg	1800

ES 2 782 125 T3

ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cgggagcagg tgggtggccat cgccagccac 1860
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggctgt tgccgggtgct gtgccaggcc 1920
caoggcttga cccccagca ggtggtggcc atgccagca atggcggtgg caagcaggcg 1980
ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccctcag 2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattggtgcc 2100
cagttatctc gccctgatcc ggcgttgccc gcgttgacca acgaccacct cgtcgccttg 2160
gcctgcctcg gcgggcgctc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
agccggtccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccgaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggtcctcag gaagcccgc ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gccatcggc 2520
caggccgacg aatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaaca gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

5 <210> 86
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de B2M objetivo de T03-TALEN

<400> 86
ttagctgtgc tcgctact ctctttct ggctggagg ctatcca 47

15 <210> 87
<211> 2814
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Beta2M T03-TALEN - IZQUIERDA

<400> 87

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgattacc catac gatgt tccagattac 60
gctatcgata tcgccgatct acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
aaaccgaagg ttcggttcgac agtggcgcag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180

ES 2 782 125 T3

acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggac	cgtogetgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgtc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtcaac	480
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgtggag	540
acggtgcagg	cgctggtgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cgcttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	720
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcgggtg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgtggag	acggtccagc	ggctggtgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	1200
ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	atggcgggtg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccgag	caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtggag	1560
acggtccagc	ggctggtgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	cccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcgg	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040

ES 2 782 125 T3

agcaatggcg gcggcaggcc ggcgctggag agcattgttg cccagttatc tcgccctgat 2100
 ccggcggttg ccgcggtgac caacgaccac ctogtcgcct tggcctgcct cggcgggctg 2160
 cctgcgctgg atgcagtgaa aaagggattg ggggatccta tcagccgttc ccagctgggtg 2220
 aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac 2280
 gagtacatcg agctgatcga gatcgccccg aacagcacc caggaccgtat cctggagatg 2340
 aaggtgatgg agttcttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggctcc 2400
 aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtg ggctccccca tcgactacgg cgtgatcgtg 2460
 gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacatg gccaggccga cgaaatgcag 2520
 aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaag 2580
 gtgtaccctt ccagcgtgac cgagttcaag ttctgttctg tgtccggcca cttcaagggc 2640
 aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cgccgtgctg 2700
 tccgtggagg agctcctgat cggcggcgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag 2760
 gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 88

<211> 2832

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Beta2M T03-TALEN -DERECHA

<400> 88

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggtc atcgataagg agaccgcccg tgccaagttc 60
 gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag 120
 cagcaacagg agaagatcaa accgaaggtt cgttcgacag tggcgcagca ccacgaggca 180
 ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgcgt taagccaaca cccggcagcg 240
 ttagggaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgcag cgttgccaga ggcgacacac 300
 gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc 360
 acggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag 420
 attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcagtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgcactg 480
 acgggtgccc cgctcaactt gacccccag cagggtggtg ccatcgccag caataatggt 540
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgcggg tgctgtgcca ggcccacggc 600
 ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag 660
 acggtccagc ggctggtgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg 720
 gtggccatcg ccagcaatat tggtagcaag caggcgtcgg agacgggtgca ggcgctggtg 780
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtagccat cgccagcaat 840

ES 2 782 125 T3

ggcggtggca agcagggcgt ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 900
 cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg 960
 ctggagacgg tgcagggcgt gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag 1020
 caggtggtgg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
 ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccg agcaggtggt ggccatcgcc 1140
 agccacgatg gcggaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc 1200
 caggccccag gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag 1260
 caggcgtgag agacggcca ggcgctggtg ccggtgctgt gccaggccca cgcttgacc 1320
 cccagcagg tgggtggccat cgccagcaat ggcggtggca agcagggcgt ggagacggtc 1380
 cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc 1440
 atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg 1500
 ctgtgccagg cccacggctt gacccccgag caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc 1560
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgccgg tgctgtgcca ggcccacggc 1620
 ttgacccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag 1680
 acggtgcagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggccccag gcttgacccc ccagcaggtg 1740
 gtggccatcg ccagcaataa tgggtggcaag caggcgtgag agacggcca gcggtggtg 1800
 ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc cccagcagg tgggtggccat cgccagcaat 1860
 aatggtggca agcagggcgt ggagacggtc cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc 1920
 cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc acgatggcgg caagcaggcg 1980
 ctggagacgg tccagcggct gttgccggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
 caggtggtgg ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgcc 2100
 cagttatctc gccctgatcc ggcgttggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgccttg 2160
 gcctgcctcg gcgggcgtcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
 agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
 ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag 2340
 gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
 aagcacctgg gcggtccag gaagcccagc ggcgccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
 gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
 caggccgacg aatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
 cccaacgagt ggtggaaggt gtaccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg 2640
 tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700

ES 2 782 125 T3

tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
 ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
 gccgactgat aa 2832

5 <210> 89
 <211> 526
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> B2M-UL18 quimérica

<400> 89

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

His Ala Ala Arg Pro Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu
 20 25 30

Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln
 35 40 45

Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn
 50 55 60

Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu
 65 70 75 80

Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe
 85 90 95

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro
 100 105 110

Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser
 115 120 125

Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met
 145 150 155 160

Thr Met Trp Cys Leu Thr Leu Phe Val Leu Trp Met Leu Arg Val Val
 165 170 175

Gly Met His Val Leu Arg Tyr Gly Tyr Thr Gly Ile Phe Asp Asp Thr
 180 185 190

ES 2 782 125 T3

Ser His Met Thr Leu Thr Val Val Gly Ile Phe Asp Gly Gln His Phe
 195 200 205

Phe Thr Tyr His Val Asn Ser Ser Asp Lys Ala Ser Ser Arg Ala Asn
 210 215 220

Gly Thr Ile Ser Trp Met Ala Asn Val Ser Ala Ala Tyr Pro Thr Tyr
 225 230 235 240

Leu Asp Gly Glu Arg Ala Lys Gly Asp Leu Ile Phe Asn Gln Thr Glu
 245 250 255

Gln Asn Leu Leu Glu Leu Glu Ile Ala Leu Gly Tyr Arg Ser Gln Ser
 260 265 270

Val Leu Thr Trp Thr His Glu Cys Asn Thr Thr Glu Asn Gly Ser Phe
 275 280 285

Val Ala Gly Tyr Glu Gly Phe Gly Trp Asp Gly Glu Thr Leu Met Glu
 290 295 300

Leu Lys Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Gly Pro Asn Tyr Glu Ile Ser
 305 310 315 320

Trp Leu Lys Gln Asn Lys Thr Tyr Ile Asp Gly Lys Ile Lys Asn Ile
 325 330 335

Ser Glu Gly Asp Thr Thr Ile Gln Arg Asn Tyr Leu Lys Gly Asn Cys
 340 345 350

Thr Gln Trp Ser Val Ile Tyr Ser Gly Phe Gln Thr Pro Val Thr His
 355 360 365

Pro Val Val Lys Gly Gly Val Arg Asn Gln Asn Asp Asn Arg Ala Glu
 370 375 380

Ala Phe Cys Thr Ser Tyr Gly Phe Phe Pro Gly Glu Ile Asn Ile Thr
 385 390 395 400

Phe Ile His Tyr Gly Asn Lys Ala Pro Asp Asp Ser Glu Pro Gln Cys
 405 410 415

Asn Pro Leu Leu Pro Thr Phe Asp Gly Thr Phe His Gln Gly Cys Tyr
 420 425 430

Val Ala Ile Phe Cys Asn Gln Asn Tyr Thr Cys Arg Val Thr His Gly

ES 2 782 125 T3

435	440	445
Asn Trp Thr Val Glu Ile Pro Ile Ser Val Thr Ser Pro Asp Asp Ser		
450	455	460
Ser Ser Gly Glu Val Pro Asp His Pro Thr Ala Asn Lys Arg Tyr Asn		
465	470	475
Thr Met Thr Ile Ser Ser Val Leu Leu Ala Leu Leu Leu Cys Ala Leu		
485	490	495
Leu Phe Ala Phe Leu His Tyr Phe Thr Thr Leu Lys Gln Tyr Leu Arg		
500	505	510
Asn Leu Ala Phe Ala Trp Arg Tyr Arg Lys Val Arg Ser Ser		
515	520	525

<210> 90
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SP-MICAed

<400> 90

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

ES 2 782 125 T3

Ser Thr Arg Ser Ser Gln His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu
 130 135 140

Ser Gln Asn Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gln Ser Ser Arg
 145 150 155 160

Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala
 165 170 175

Met Lys Thr Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gln
 180 185 190

Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val
 195 200 205

Pro Pro Met Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn Ile
 210 215 220

Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn Ile Thr Leu
 225 230 235 240

Ser Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asp Thr Gln Gln Trp
 245 250 255

Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val Ala
 260 265 270

Thr Arg Ile Cys Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu
 275 280 285

His Ser Gly Asn His Ser Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val Leu
 290 295 300

Val Leu Gln Ser His Trp
 305 310

<210> 91
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> SP-MICBed

10

<400> 91

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
 1 5 10 15

ES 2 782 125 T3

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Glu Pro His Ser Leu
 20 25 30

Arg Tyr Asn Leu Met Val Leu Ser Gln Asp Glu Ser Val Gln Ser Gly
 35 40 45

Phe Leu Ala Glu Gly His Leu Asp Gly Gln Pro Phe Leu Arg Tyr Asp
 50 55 60

Arg Gln Lys Arg Arg Ala Lys Pro Gln Gly Gln Trp Ala Glu Asp Val
 65 70 75 80

Leu Gly Ala Lys Thr Trp Asp Thr Glu Thr Glu Asp Leu Thr Glu Asn
 85 90 95

Gly Gln Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His Ile Lys Asp Gln Lys Gly
 100 105 110

Gly Leu His Ser Leu Gln Glu Ile Arg Val Cys Glu Ile His Glu Asp
 115 120 125

Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe
 130 135 140

Leu Ser Gln Asn Leu Glu Thr Gln Glu Ser Thr Val Pro Gln Ser Ser
 145 150 155 160

Arg Ala Gln Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe Trp Lys Glu Asp
 165 170 175

Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gln Ala Asp Cys Leu
 180 185 190

Gln Lys Leu Gln Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Ala Ile Arg Arg Thr
 195 200 205

Val Pro Pro Met Val Asn Val Thr Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn
 210 215 220

Ile Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Ser Phe Tyr Pro Arg Asn Ile Thr
 225 230 235 240

Leu Thr Trp Arg Gln Asp Gly Val Ser Leu Ser His Asn Thr Gln Gln
 245 250 255

Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly Asn Gly Thr Tyr Gln Thr Trp Val
 260 265 270

ES 2 782 125 T3

Ala Thr Arg Ile Arg Gln Gly Glu Glu Gln Arg Phe Thr Cys Tyr Met
 275 280 285

Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr His Pro Val Pro Ser Gly Lys Val
 290 295 300

Leu Val Leu Gln Ser Gln Arg Thr Asp
 305 310

<210> 92
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SP-ULBPled

<400> 92

5

10

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Gly Trp Val Asp Thr His
 20 25 30

Cys Leu Cys Tyr Asp Phe Ile Ile Thr Pro Lys Ser Arg Pro Glu Pro
 35 40 45

Gln Trp Cys Glu Val Gln Gly Leu Val Asp Glu Arg Pro Phe Leu His
 50 55 60

Tyr Asp Cys Val Asn His Lys Ala Lys Ala Phe Ala Ser Leu Gly Lys
 65 70 75 80

Lys Val Asn Val Thr Lys Thr Trp Glu Glu Gln Thr Glu Thr Leu Arg
 85 90 95

Asp Val Val Asp Phe Leu Lys Gly Gln Leu Leu Asp Ile Gln Val Glu
 100 105 110

Asn Leu Ile Pro Ile Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys
 115 120 125

Glu His Glu Ala His Gly His Gly Arg Gly Ser Trp Gln Phe Leu Phe
 130 135 140

Asn Gly Gln Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg Lys Trp Thr
 145 150 155 160

ES 2 782 125 T3

Ala Leu His Pro Gly Ala Lys Lys Met Thr Glu Lys Trp Glu Lys Asn
 165 170 175

Arg Asp Val Thr Met Phe Phe Gln Lys Ile Ser Leu Gly Asp Cys Lys
 180 185 190

Met Trp Leu Glu Glu Phe Leu Met Tyr Trp Glu Gln Met Leu Asp Pro
 195 200 205

Thr

<210> 93
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SP-ULBP2ed

<400> 93

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Gly Arg Ala Asp Pro His
 20 25 30

Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro
 35 40 45

Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His
 50 55 60

Tyr Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg
 85 90 95

Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Arg Asp Ile Gln Leu Glu
 100 105 110

Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys
 115 120 125

Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe
 130 135 140

ES 2 782 125 T3

Asp Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr
145 150 155 160

Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp
165 170 175

Lys Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr Phe Ser Met Gly Asp Cys Ile
180 185 190

Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro
195 200 205

Ser Ala Gly
210

<210> 94
<211> 206
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> SP-ULBP3ed

<400> 94

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Asp Ala His Ser Leu Trp
20 25 30

Tyr Asn Phe Thr Ile Ile His Leu Pro Arg His Gly Gln Gln Trp Cys
35 40 45

Glu Val Gln Ser Gln Val Asp Gln Lys Asn Phe Leu Ser Tyr Asp Cys
50 55 60

Gly Ser Asp Lys Val Leu Ser Met Gly His Leu Glu Glu Gln Leu Tyr
65 70 75 80

Ala Thr Asp Ala Trp Gly Lys Gln Leu Glu Met Leu Arg Glu Val Gly
85 90 95

Gln Arg Leu Arg Leu Glu Leu Ala Asp Thr Glu Leu Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Pro Ser Gly Pro Leu Thr Leu Gln Val Arg Met Ser Cys Glu Cys Glu
115 120 125

Ala Asp Gly Tyr Ile Arg Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp Gly Arg

5

10

ES 2 782 125 T3

130

135

140

Lys Phe Leu Leu Phe Asp Ser Asn Asn Arg Lys Trp Thr Val Val His
 145 150 155 160

Ala Gly Ala Arg Arg Met Lys Glu Lys Trp Glu Lys Asp Ser Gly Leu
 165 170 175

Thr Thr Phe Phe Lys Met Val Ser Met Arg Asp Cys Lys Ser Trp Leu
 180 185 190

Arg Asp Phe Leu Met His Arg Lys Lys Arg Leu Glu Pro Thr
 195 200 205

<210> 95
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> SP-N2DL4ed

10

<400> 95

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met His Ser Leu Cys Phe Asn
 20 25 30

Phe Thr Ile Lys Ser Leu Ser Arg Pro Gly Gln Pro Trp Cys Glu Ala
 35 40 45

Gln Val Phe Leu Asn Lys Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Asn Ser Asp Asn
 50 55 60

Asn Met Val Lys Pro Leu Gly Leu Leu Gly Lys Lys Val Tyr Ala Thr
 65 70 75 80

Ser Thr Trp Gly Glu Leu Thr Gln Thr Leu Gly Glu Val Gly Arg Asp
 85 90 95

Leu Arg Met Leu Leu Cys Asp Ile Lys Pro Gln Ile Lys Thr Ser Asp
 100 105 110

Pro Ser Thr Leu Gln Val Glu Met Phe Cys Gln Arg Glu Ala Glu Arg
 115 120 125

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

ES 2 782 125 T3

Leu Phe Asp Ala Met Asn Met Thr Trp Thr Val Ile Asn His Glu Ala
 145 150 155 160

Ser Lys Ile Lys Glu Thr Trp Lys Lys Asp Arg Gly Leu Glu Lys Tyr
 165 170 175

Phe Arg Lys Leu Ser Lys Gly Asp Cys Asp His Trp Leu Arg Glu Phe
 180 185 190

Leu Gly His Trp Glu Ala Met Pro Glu Pro Thr Val Ser Pro Val Asn
 195 200 205

Ala Ser Asp Ile His Trp Ser Ser Ser Ser Leu Pro Asp
 210 215 220

<210> 96
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SP-RETIGed

<400> 96

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Gly Leu Ala Asp Pro His
 20 25 30

Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro
 35 40 45

Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His
 50 55 60

Tyr Asp Cys Gly Ser Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg
 85 90 95

Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Leu Asp Ile Gln Leu Glu
 100 105 110

Asn Tyr Ile Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys
 115 120 125

5

10

ES 2 782 125 T3

Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Gly Ser Gly Ser Trp Gln Leu Ser Phe
 130 135 140

Asp Gly Gln Ile Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Asn Arg Met Trp Thr
 145 150 155 160

Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp
 165 170 175

Lys Asp Met Thr Met Ser Phe His Tyr Ile Ser Met Gly Asp Cys Thr
 180 185 190

Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro
 195 200 205

Ser Ala Gly Ala Pro Pro Thr Met Ser Ser Gly Thr Ala Gln Pro Arg
 210 215 220

<210> 97
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> SP-RAETILed

<400> 97

Met Gly Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Arg Arg Asp Asp Pro His
 20 25 30

Ser Leu Cys Tyr Asp Ile Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro
 35 40 45

Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Thr Phe Leu His
 50 55 60

Tyr Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val Ser Pro Leu Gly Lys
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Val Thr Met Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val Leu Arg
 85 90 95

Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Leu Asp Ile Gln Leu Glu
 100 105 110

5

10

ES 2 782 125 T3

Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys
 115 120 125

Glu Gln Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Ile
 130 135 140

Asp Gly Gln Thr Phe Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr
 145 150 155 160

Thr Val His Pro Gly Ala Arg Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp
 165 170 175

Lys Asp Val Ala Met Ser Phe His Tyr Ile Ser Met Gly Asp Cys Ile
 180 185 190

Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp Ser Thr Leu Glu Pro
 195 200 205

Ser Ala Gly
 210

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un linfocito T modificado por ingeniería que comprende las etapas de:
 - 5 a) inhibir la expresión de beta 2-microglobulina (B2M) y/o transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CIITA) en un linfocito T que se ha proporcionado; y
 - b) inactivar al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) en dichos linfocitos T; y
 - 10 c) introducir en dicho linfocito T una molécula de ácido nucleico exógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la expresión de B2M y/o CIITA se inhibe mediante el uso de una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica B2M y/o CIITA.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la inactivación de dicho al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) se realiza usando una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica dicho componente TCR.
- 20 4. El método de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3, en el que la endonucleasa de sitio de corte poco frecuente es una nucleasa TAL, meganucleasa, nucleasa en dedo de cinc (ZFN) o endonucleasa guiada por ARN.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una etapa de alteración de PD1 (proteína 1 de muerte celular programada).
- 25 6. El método de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la etapa de expresar en dicho linfocito T al menos un polipéptido inmunosupresor no endógeno.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho polipéptido inmunosupresor no endógeno es un homólogo vírico de MHC o un ligando de NKG2D.
8. El método de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el linfocito T es un linfocito T citotóxico.
- 35 9. Un linfocito T aislado modificado por ingeniería que expresa un Receptor de Antígeno Quimérico (CAR) dirigido contra al menos un antígeno expresado en la superficie de una célula maligna o infectada, estando dicho linfocito T caracterizado además por que i) la expresión de transactivador del complejo de histocompatibilidad mayor de clase II (CIITA) y/o beta 2-microglobulina (B2M) está inhibida; y ii) al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) está inactivo.
- 40 10. El linfocito T modificado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el gen que codifica B2M se inactiva a través de la expresión en el linfocito T de una endonucleasa de sitio de corte poco frecuente capaz de inactivar selectivamente por escisión de ADN el gen que codifica B2M.
- 45 11. El linfocito T modificado por ingeniería de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, **caracterizado** además **por que** PD1 está alterada.
12. El linfocito T modificado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho linfocito T tiene el fenotipo [b2m]⁻[TCR]⁻[PD1]⁻[CAR]⁺.
- 50 13. El linfocito T modificado por ingeniería de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde dicho linfocito T expresa al menos un polipéptido inmunosupresor no endógeno.
14. El linfocito T modificado por ingeniería de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho polipéptido inmunosupresor no endógeno es un homólogo vírico de MHC o un ligando de NKG2D.
- 55 15. El linfocito T modificado por ingeniería de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en donde el linfocito T es un linfocito T citotóxico.
- 60 16. El linfocito T modificado por ingeniería de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 para su uso como medicamento.
17. Una composición que comprende al menos un linfocito T modificado por ingeniería de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15.
- 65

Nota:
El documento completo que incluye las tablas de referencia y el listado de secuencias puede descargarse de la página web de la OEP

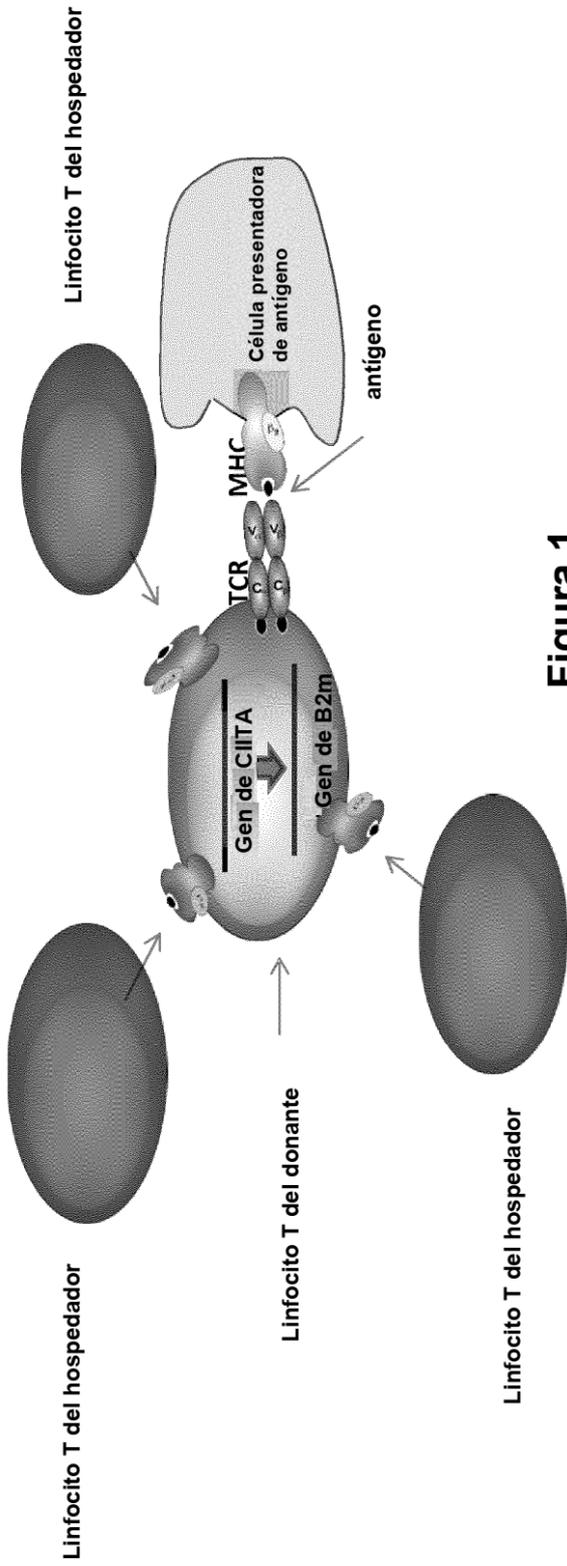


Figura 1

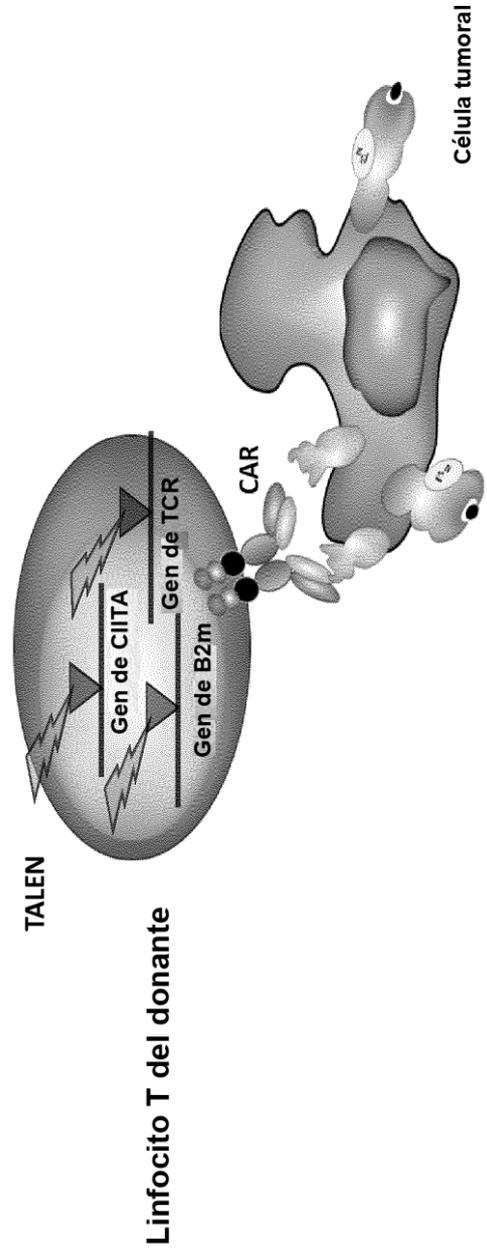


Figura 2

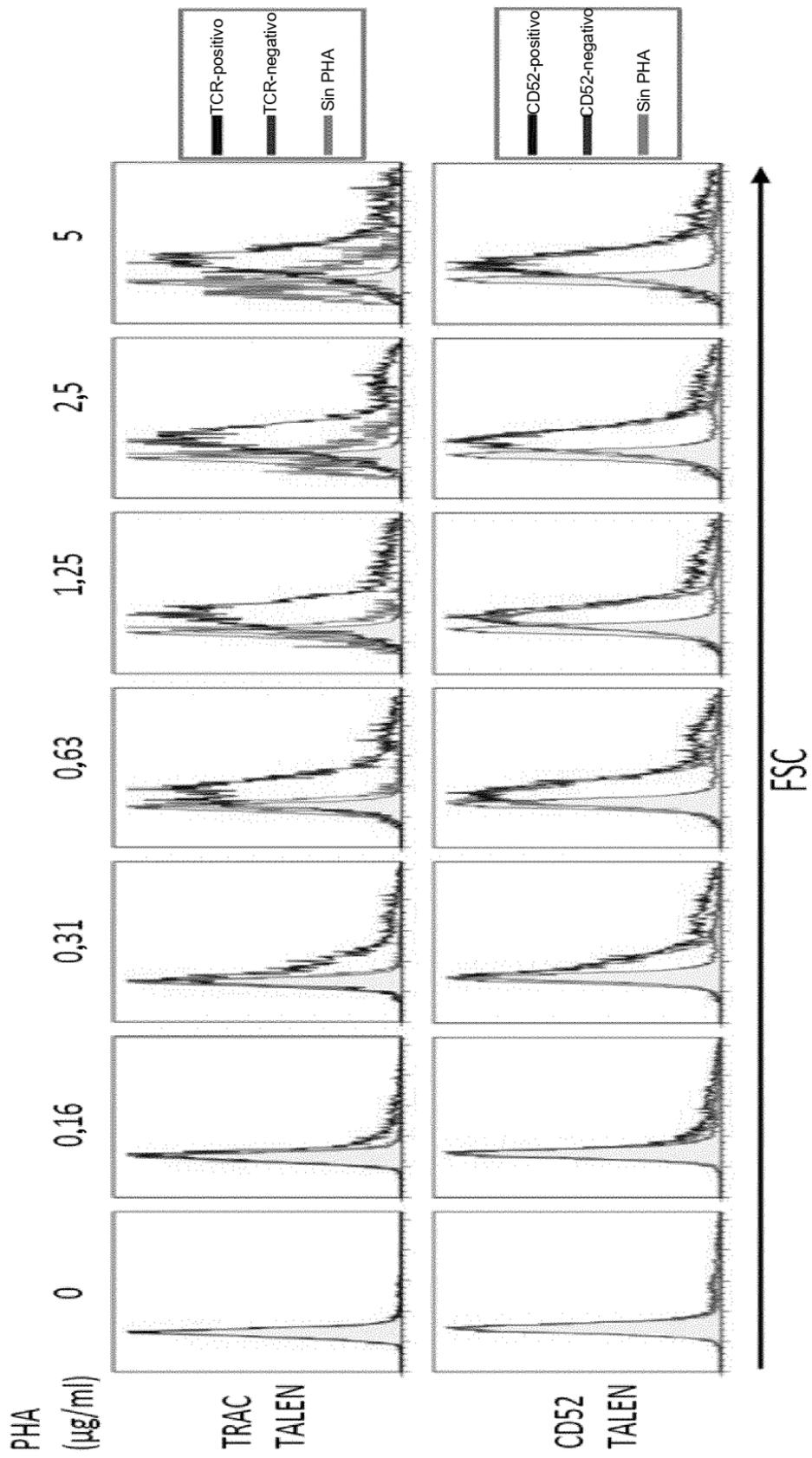


Figura 3

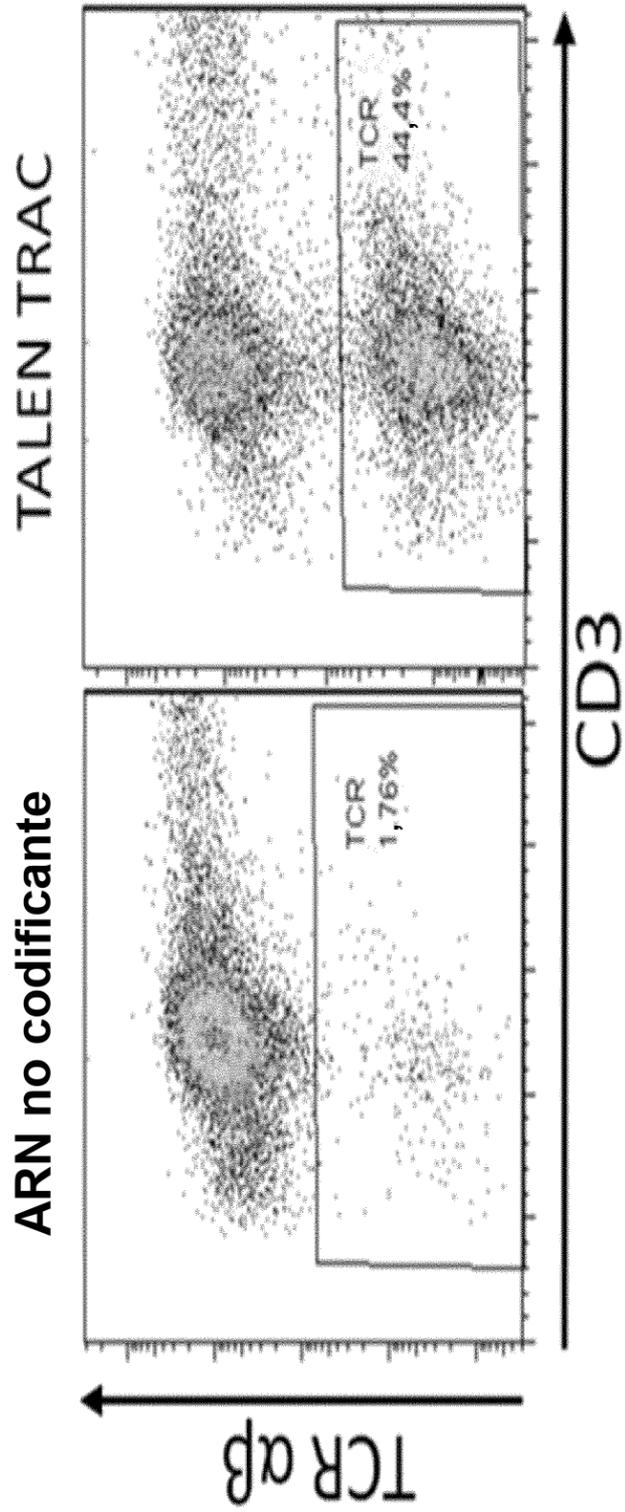


Figura 4

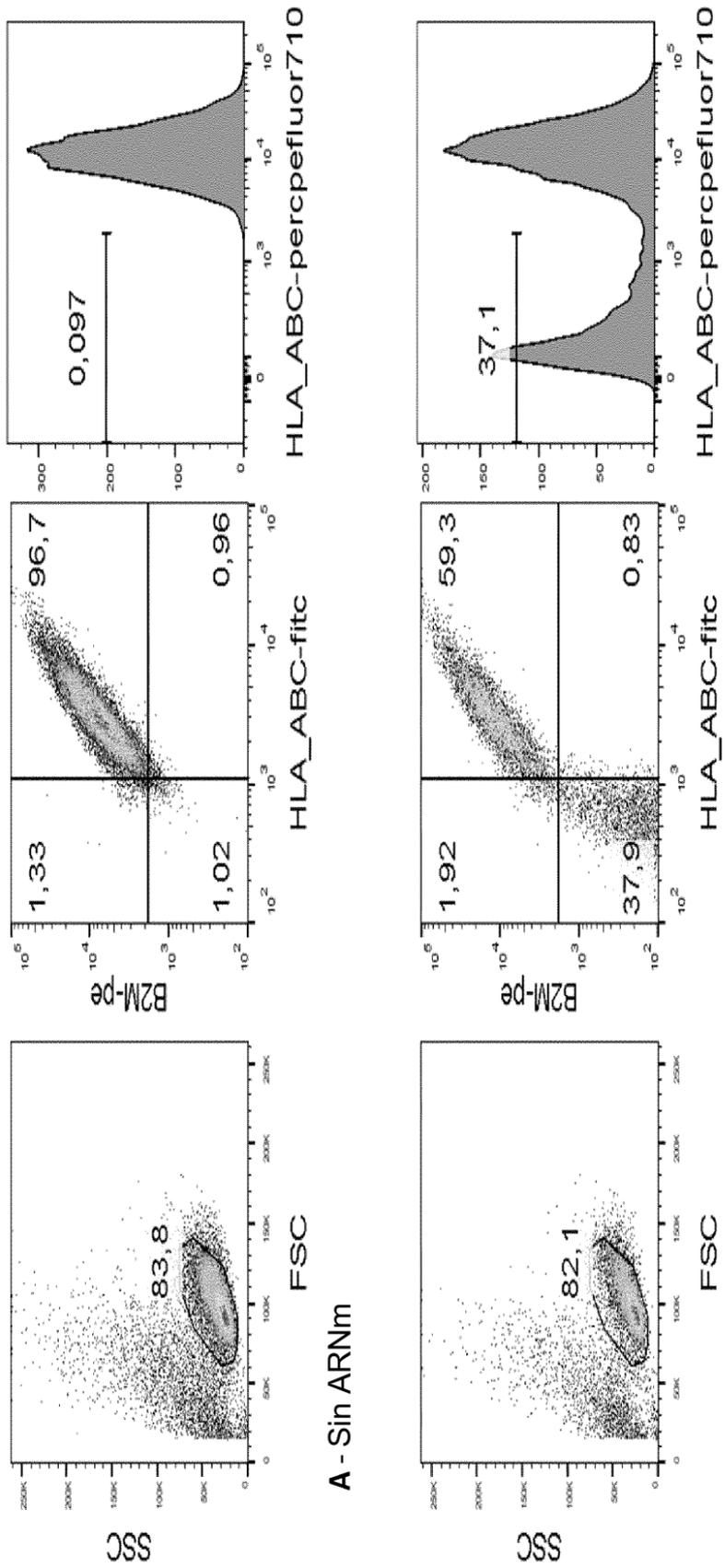


Figura 5

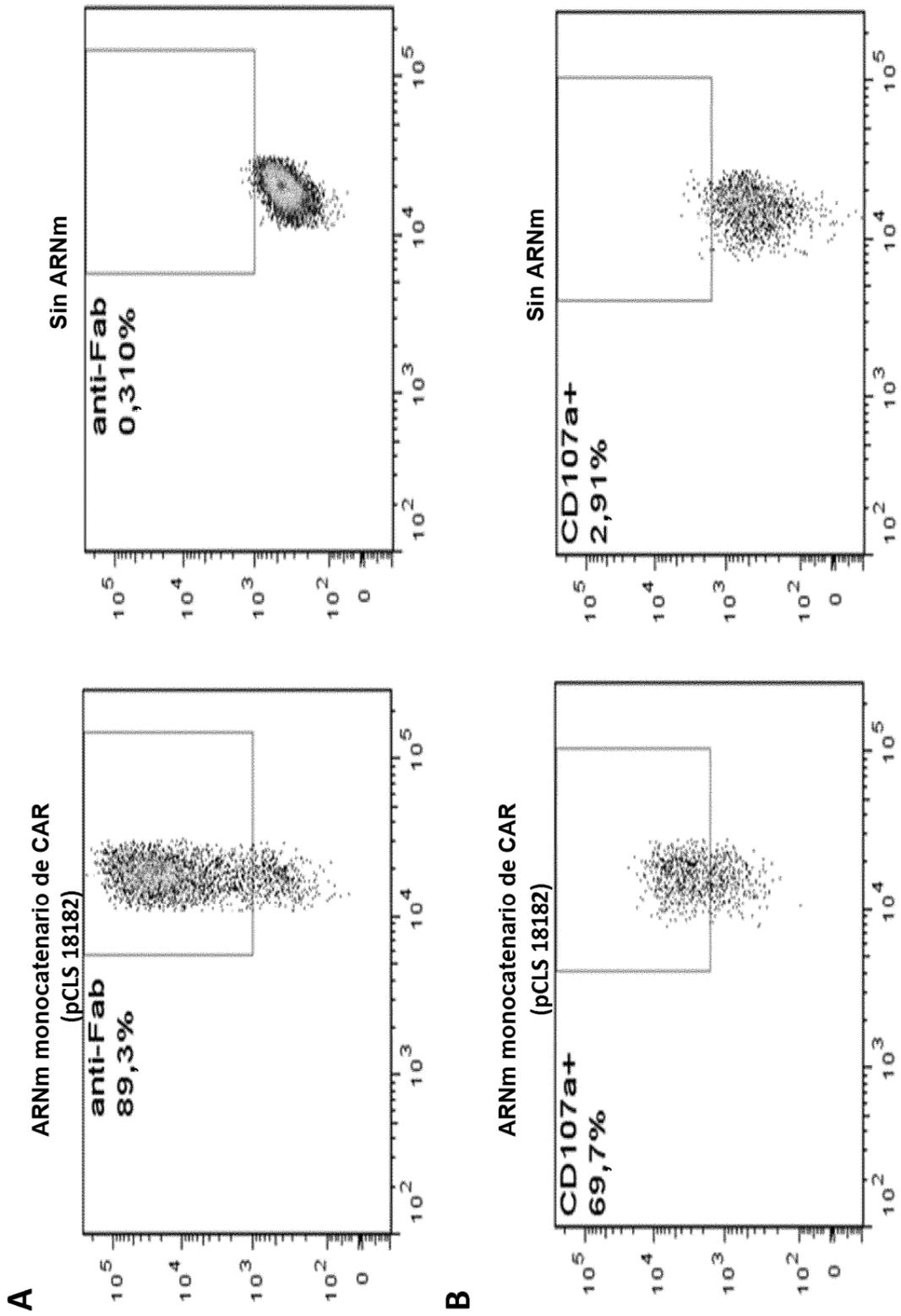


Figura 6

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

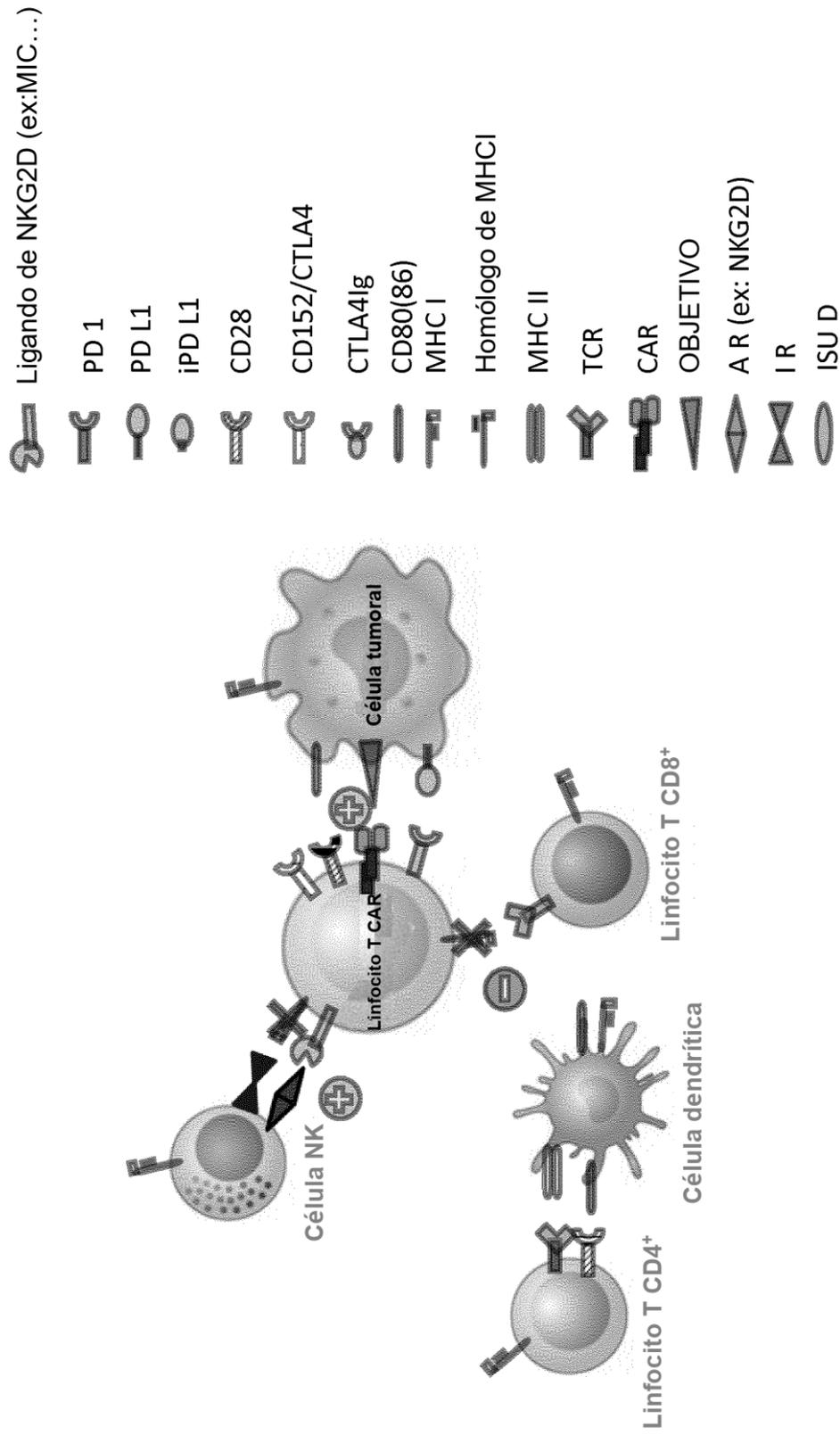


Figura 7

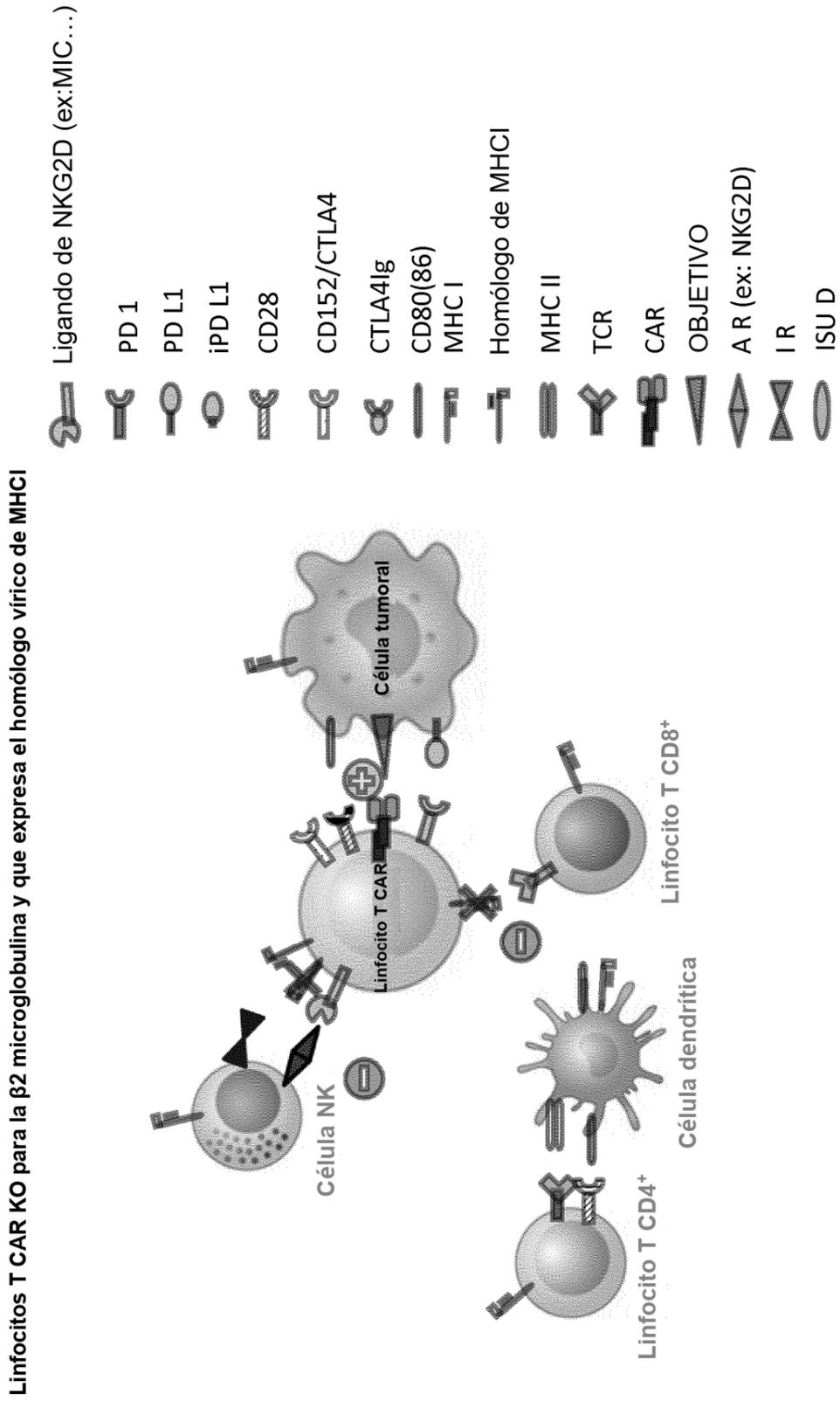


Figura 8

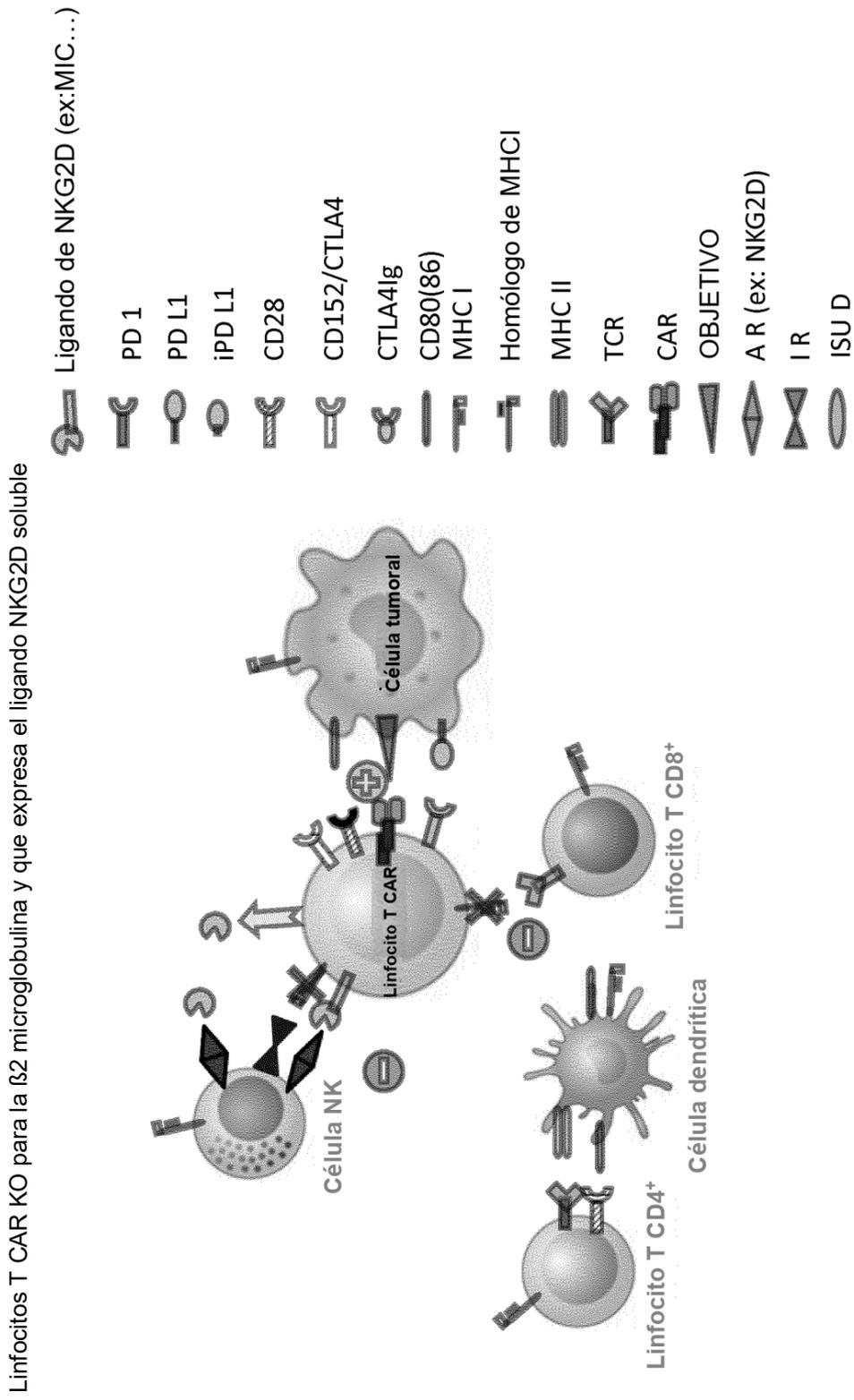


Figura 9

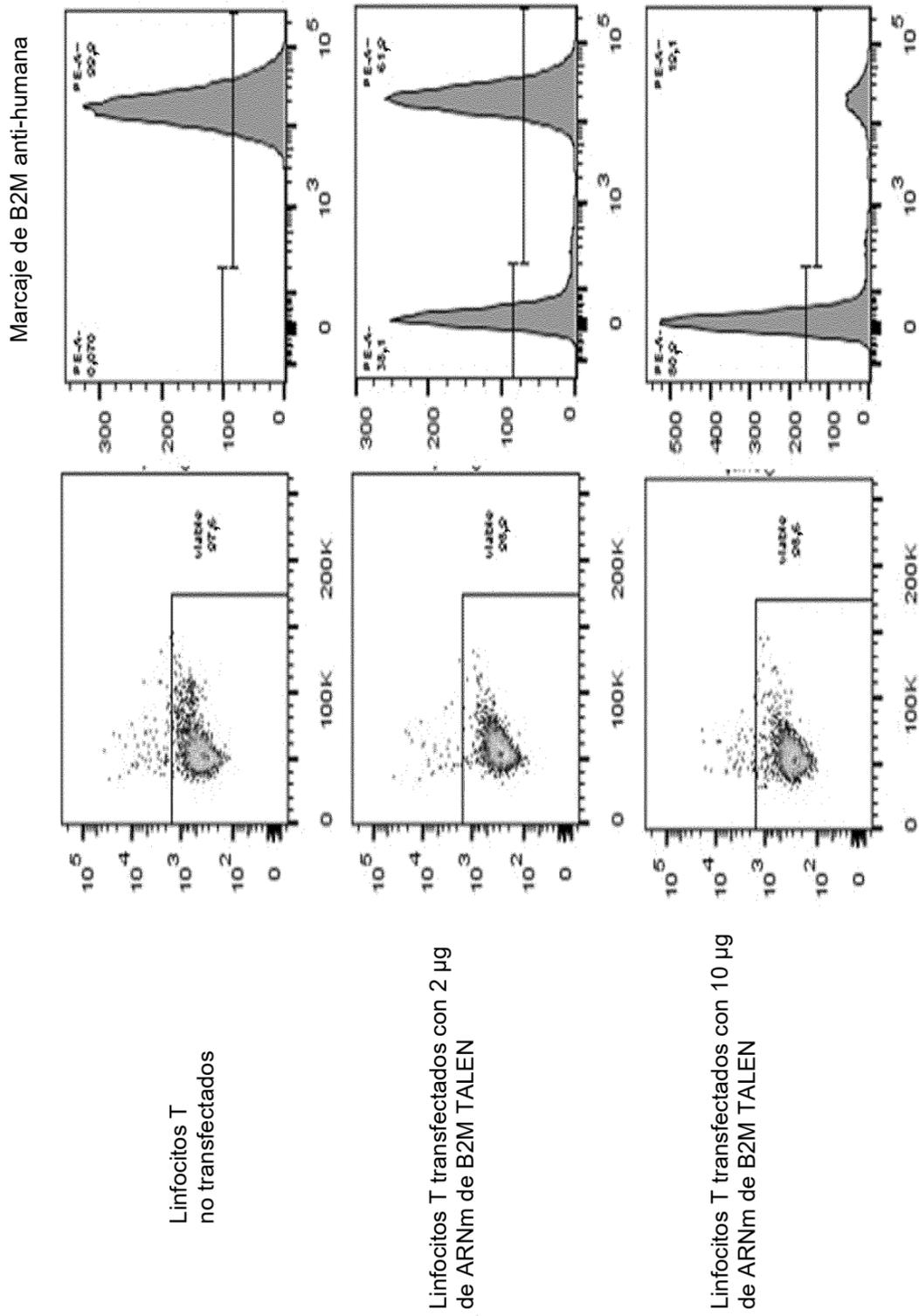


Figura 10