

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR EL CÁNCER**SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 62/670,417 presentada el 11 de mayo de 2018; la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 62/701,340 presentada el 20 de julio de 2018; la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 62/756,643 presentada el 7 de noviembre de 2018; la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 62/773,658 presentada el 30 de noviembre de 2018; y la solicitud de patente provisional estadounidense con número de serie 62/826,600 presentada el 29 de marzo de 2019. El contenido completo de las solicitudes de patente a las que se hizo referencia anteriormente se incorpora en el presente documento mediante esta referencia.

ANTECEDENTES

La terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) usa células T modificadas genéticamente para seleccionar como diana y destruir de manera más específica y eficiente células cancerosas. Después de que se hayan recogido células T de la sangre, las células se modifican por ingeniería genética para incluir CAR en su superficie. Los CAR pueden introducirse en las células T usando la tecnología de edición génica de CRISPR/Cas9. Cuando estas células CAR T alogénicas se inyectan en un paciente, los receptores permiten que las células T destruyan las células cancerosas.

SUMARIO

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona células inmunitarias modificadas por ingeniería

genética (por ejemplo, células T) y métodos de producción de células inmunitarias que se han editado usando la tecnología de edición génica de CRISPR/Cas9 para alterar la expresión endógena de CD70 (desactivación de CD70).

5 En algunos aspectos de la presente divulgación se proporciona una célula inmunitaria modificada por ingeniería genética (por ejemplo, célula T) que comprende una alteración en el gen *CD70*. En algunas realizaciones, las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética son células
10 T alogénicas que comprenden un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un CAR. En algunas realizaciones, las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética son células T alogénicas que comprenden un gen *TRAC* alterado mediante la inserción de un ácido nucleico que codifica para
15 un CAR, un gen $\beta 2M$ alterado y un gen *CD70* alterado. En algunas realizaciones, las células T son células T humanas. En algunas realizaciones, las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, células T) comprenden un gen *TRAC* alterado, un gen *B2M* alterado, un gen
20 *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un CAR. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* alterado comprende el ácido nucleico que codifica para el CAR. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética (por ejemplo, célula T) comprende además
25 un gen *PD-1* alterado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica para un CAR selecciona como diana un antígeno tumoral (por ejemplo, BCMA, CD19, CD33 o CD70).

 En algunos aspectos, la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética (por ejemplo, célula T)
30 proporcionada presenta una función de célula T mejorada incluyendo la prevención del agotamiento prematuro,

expansión de células CAR T potenciada y eficacia aumentada de destrucción de células cancerosas. En algunos aspectos, la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética (por ejemplo, célula T) proporcionada presenta un
5 crecimiento celular continuo, estacionario, en relación con células T no editadas o en relación con células T editadas que expresan CD70, así como muestra un aumento de la citotoxicidad y secreción de citocinas (por ejemplo, IL-2 y/o IFN-gamma).

10 En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula T modificada por ingeniería genética que comprende un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un CAR que no se une a CD70. En algunos aspectos, la célula T modificada por ingeniería genética comprende un gen de región
15 constante alfa de receptor de células T (TRAC) alterado. En algunos aspectos, el gen *TRAC* alterado comprende el ácido nucleico que codifica para el CAR que no se une a CD70. En algunos aspectos, la célula T modificada por ingeniería genética comprende un gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$)
20 alterado.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula T modificada por ingeniería genética que comprende:
(i) un gen *TRAC* alterado; (ii) un gen *B2M* alterado; (iii) un gen *CD70* alterado; y (iv) un ácido nucleico que codifica
25 para un CAR que no se une a CD70.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en la que las células T modificadas por ingeniería genética comprende un gen *CD70* alterado y un
30 ácido nucleico que codifica para un CAR que no se une a CD70.

En algunos aspectos, la célula T modificada por ingeniería genética en la población de células comprende un gen de región constante alfa de receptor de células T (TRAC) alterado. En algunos aspectos, el gen *TRAC* alterado comprende el ácido nucleico que codifica para el CAR que no se une a CD70. En algunos aspectos, la célula T modificada por ingeniería genética en la población de células comprende un gen de beta-2-microglobulina (β 2M) alterado.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en la que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden: (i) un gen *TRAC* alterado; (ii) un gen *B2M* alterado; (iii) un gen *CD70* alterado; y (iv) un ácido nucleico que codifica para un CAR que no se une a CD70.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende un ectodominio que se une a un antígeno de maduración de células i-B (BCMA). En algunos aspectos, el ectodominio comprende un anticuerpo anti-BCMA. En algunos aspectos, el ectodominio comprende un fragmento variable de cadena sencilla anti-BCMA (scFv). En algunos aspectos, el scFv anti-BCMA comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada variable (VH) y las mismas CDR de cadena ligera variable (VL) que un anticuerpo de referencia, en el que el anticuerpo de referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 60 y una VL expuesta como SEQ ID NO: 61. En algunos aspectos, el scFv anti-BCMA comprende cadenas VH y VL que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 60 y 61, respectivamente. En algunos aspectos, el scFv anti-BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59. En

algunos aspectos, el scFv anti-BCMA está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de identidad con SEQ ID NO: 57.

5 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el scFv anti-BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59. En algunas realizaciones, el scFv anti-BCMA comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60. En algunas realizaciones,
10 el scFv anti-BCMA comprende una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61. En algunas realizaciones, el scFv anti-BCMA comprende una VH que comprende secuencias de aminoácidos de CDR de (i) SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, y/o SEQ ID NO: 84 o (ii) SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, o SEQ
15 ID NO: 85; y/o el scFv anti-BCMA comprende una secuencia de VL que comprende secuencias de aminoácidos de CDR de (i) SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, y/o SEQ ID NO: 78.

 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende un ectodominio que se une a
20 CD33. En algunos, el ectodominio comprende un anticuerpo anti-CD33. En algunos aspectos, el ectodominio comprende un scFv anti-CD33. En algunos aspectos, el scFv anti-CD33 comprende las mismas CDR de VH y las mismas CDR de cadena VL que un anticuerpo de referencia, en el que el anticuerpo de
25 referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 140 y una VL expuesta como SEQ ID NO: 141. En algunos aspectos, el scFv anti-CD33 comprende cadenas VH y VL que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 140 y 141, respectivamente. En algunos aspectos, el scFv anti-CD33
30 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende un ectodominio que se une a CD19. En algunos aspectos, en los que el ectodominio comprende un anticuerpo anti-CD19. En algunos aspectos, el
5 ectodominio comprende un scFv anti-CD19. En algunos aspectos, el scFv anti-CD19 comprende las mismas CDR de VH y las mismas CDR de cadena VL que un anticuerpo de referencia, en el que el anticuerpo de referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 152 y una VL expuesta como
10 SEQ ID NO: 153. En algunos aspectos, el scFv anti-CD19 comprende cadenas VH y VL que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 152 y 153, respectivamente. En algunos aspectos, el scFv anti-CD19 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151.

15 En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula T modificada por ingeniería genética que comprende: (i) un gen *TRAC* alterado; (ii) un gen *B2M* alterado; (iii) un gen *CD70* alterado; y (iv) un ácido nucleico que codifica para un CAR que se une a CD70. En algunos aspectos, el gen
20 *TRAC* alterado comprende el ácido nucleico que codifica para el CAR.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en la que las células T modificadas
25 por ingeniería genética comprenden: (i) un gen *TRAC* alterado; (ii) un gen *B2M* alterado; (iii) un gen *CD70* alterado; y (iv) un ácido nucleico que codifica para un CAR que se une a CD70.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en la que las células T modificadas
30 por ingeniería genética comprenden:

(i) un gen *TRAC* alterado;

(ii) un gen $\beta 2M$ alterado;

(iii) un gen *CD70* alterado

(iv) un ácido nucleico que codifica para un CAR que
5 comprende (a) un ectodominio que comprende un scFv anti-
CD70, (b) un dominio transmembrana CD8 y (c) un endodominio
que comprende un dominio coestimulador 41BB y un dominio de
señalización CD3z.

En cualquiera de los aspectos anteriores o
10 relacionados, el CAR que se une a CD70 comprende un
ectodominio que comprende un anticuerpo anti-CD70. En
algunos aspectos, CAR comprende un ectodominio que comprende
un scFv anti-CD70. En algunos aspectos, el scFv anti-CD70
comprende las mismas CDR de VH y las mismas CDR de VL que un
15 anticuerpo de referencia, en el que el anticuerpo de
referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 51 y
una VL expuesta como SEQ ID NO: 52. En algunos aspectos, el
scFv anti-CD70 comprende cadenas VH y VL que comprenden las
secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 51 y 52,
20 respectivamente. En algunos aspectos, el scFv anti-CD70
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 o 50.
En algunos aspectos, el scFv anti-CD70 comprende la secuencia
de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

En cualquiera de los aspectos anteriores o
25 relacionados, el scFv anti-CD70 comprende una VH que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51. En
algunas realizaciones, el scFv anti-CD70 comprende una VL
que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52.
En algunas realizaciones, el scFv anti-CD70 comprende una VH
30 que comprende secuencias de aminoácidos de CDR de (i) SEQ ID
NO: 68, SEQ ID NO: 70, y/o SEQ ID NO: 72 o (ii) SEQ ID NO:

69, SEQ ID NO: 71, y/o SEQ ID NO: 73; y/o el scFv anti-CD70 comprende una secuencia de VL que comprende secuencias de aminoácidos de CDR de (i) SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, y/o SEQ ID NO: 66 o (ii) SEQ ID NO: la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 5 65, y/o SEQ ID NO: 67.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende un dominio coestimulador CD28 o 41BB. En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende un dominio de señalización 10 CD3ζ. En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, el CAR comprende un dominio transmembrana CD8.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, hay una delección en el gen *TRAC* en relación con células T no modificadas. En algunos aspectos, la 15 delección es de 15-30 pares de bases. En algunos aspectos, la delección es de 20 pares de bases. En algunos aspectos, la delección comprende SEQ ID NO: 86. En algunos aspectos, la delección es de SEQ ID NO: 86.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una 20 célula T modificada por ingeniería genética que comprende un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un CAR que se une a CD70, en el que el CAR comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46. En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula T modificada 25 por ingeniería genética que comprende un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un CAR que se une a CD70, en el que la secuencia de ácido nucleico es al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 45. En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula T modificada por 30 ingeniería genética que comprende un gen *CD70* alterado y un

ácido nucleico que codifica para un CAR que se une a CD70, en el que la secuencia de ácido nucleico es SEQ ID NO: 45.

En algunas realizaciones, el gen *CD70* se altera mediante edición génica por CRISPR/Cas9. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* se altera mediante edición génica por CRISPR/Cas9. En algunas realizaciones, el gen *B2M* se altera mediante edición génica por CRISPR/Cas9. En algunas realizaciones, el gen *PD-1* se altera mediante edición génica por CRISPR/Cas9.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula T modificada por ingeniería genética que comprende:

(i) un gen *TRAC* alterado, en el que el gen *TRAC* alterado comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46;

(ii) un gen *B2M* alterado; y

(iii) un gen *CD70* alterado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica para el CAR comprende una secuencia al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 45.

En otros aspectos, la divulgación proporciona una célula T modificada por ingeniería genética que comprende:

(i) un gen *TRAC* alterado, en el que el gen *TRAC* alterado comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR, en el que la secuencia de ácido nucleico es al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 45;

(ii) un gen *B2M* alterado; y

(iii) un gen *CD70* alterado. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* alterado comprende una secuencia donadora que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 44.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula T modificada por ingeniería genética que comprende:

(i) un gen TRAC alterado que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 44;

5 (ii) un gen B2M alterado; y

(iii) un gen CD70 alterado.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una célula T modificada por ingeniería genética que comprende:

10 (i) un gen TRAC alterado que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 44;

(ii) un gen B2M alterado; y

(iii) un gen CD70 alterado.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la célula T modificada por ingeniería genética comprende un gen *PD-1* alterado. En algunos aspectos, las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética son células T alogénicas que comprenden un gen *TRAC* alterado mediante la inserción de un ácido nucleico que codifica para un CAR, un gen β 2M alterado y un gen *PD-1* alterado. En algunas realizaciones, la célula inmunitaria modificada por ingeniería genética (por ejemplo, célula T) comprende además un gen *CD70* alterado.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la célula T modificada por ingeniería genética mantiene la citotoxicidad después de 5 reexposiciones con una célula diana, en el que la célula diana expresa un antígeno específico para el CAR. En algunos aspectos, la célula T modificada por ingeniería genética mantiene la citotoxicidad después de 10 reexposiciones con la célula diana. En algunos aspectos, la célula diana es una célula

cancerosa. En algunos aspectos, la célula diana es una célula cancerosa de un cáncer hematológico o un tumor sólido.

5 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la célula T modificada por ingeniería genética o población de células comprende un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57. En algunos aspectos, el CAR está codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 90% de identidad con SEQ ID NO: 56.

10 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la célula T manipulada o la población de células comprende un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139. En algunos aspectos, el CAR está codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene
15 al menos el 90% de identidad con SEQ ID NO: 136.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la célula T manipulada o la población de células comprende un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149. En algunos aspectos, el CAR
20 está codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 90% de identidad con SEQ ID NO: 148.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, la célula T manipulada o la población de células comprende un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46. En algunos aspectos, el CAR
25 está codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 90% de identidad con SEQ ID NO: 45.

Otros aspectos de la presente divulgación proporcionan una población de células que comprenden cualquiera de las
30 células inmunitarias modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, células T) descritas en la presente. En algunas

realizaciones, una población de células comprenden células T que comprenden un gen *TRAC* alterado por la inserción de un ácido nucleico que codifica para un CAR, un gen β 2M alterado y un gen *CD70* alterado. En algunas realizaciones, una población de células comprenden células T que comprenden un gen *TRAC* alterado, un gen *B2M* alterado, un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un CAR. En algunas realizaciones, una población de células comprenden células T que comprenden un gen *TRAC* alterado, en el que el gen *TRAC* alterado comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR, un gen *B2M* alterado y un gen *CD70* alterado.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en la que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden:

(i) un gen *TRAC* alterado, en el que el gen *TRAC* alterado comprende un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende (a) un ectodominio que comprende un fragmento de unión a antígeno anti-CD70, (b) un dominio transmembrana CD8 y (c) un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB y un dominio de señalización CD3z;

(ii) un gen de beta-2-microglobulina (*B2M*) alterado; y
(iii) un gen *CD70* alterado.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en la que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden:

(i) un gen *TRAC* alterado, en el que el gen *TRAC* alterado comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46;

(ii) un gen $\beta 2M$ alterado; y

(iii) un gen *CD70* alterado.

5 En otros aspectos, la divulgación proporciona una población de células que comprende células T modificadas por ingeniería genética, en la que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden:

(i) un gen *TRAC* alterado, en el que el gen *TRAC* alterado comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR, en el que la secuencia de ácido nucleico es al menos el 90%
10 idéntica a SEQ ID NO: 45;

(ii) un gen $\beta 2M$ alterado; y

(iii) un gen *CD70* alterado. En algunos aspectos, el gen *TRAC* alterado comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 45.

15 En algunos aspectos, la divulgación proporciona una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en la que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden:

(i) un gen *TRAC* alterado que comprende una secuencia de
20 ácido nucleico al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 44;

(ii) un gen $\beta 2M$ alterado; y

(iii) un gen *CD70* alterado. En algunos aspectos, el gen *TRAC* alterado comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 44.

25 En algunas realizaciones, el CAR comprende un dominio de señalización CD3z. En algunas realizaciones, el CAR comprende un dominio transmembrana CD8. En algunas realizaciones, el CAR comprende un dominio coestimulador CD28 o 41BB.

30 En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados de la población de células, el gen $\beta 2M$ alterado comprende al

menos una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 9-14. En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados de la población de células, el gen *CD70* alterado comprende al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 129-134.

En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 45 y/o el ácido nucleico que codifica para el CAR anti-*CD70* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 45. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 45. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 44. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 56 y/o el ácido nucleico que codifica para el CAR anti-*BCMA* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 56. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 56. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 55.

En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 156 y/o el ácido nucleico que codifica para el CAR anti-*CD19* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 148. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 148. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 156. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 135 y/o el ácido nucleico que codifica para el CAR anti-*CD33* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 136. En algunas

realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 136. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 135.

5 En cualquiera de los aspectos anteriores, las células T modificadas por ingeniería genética: (a) presentan una capacidad proliferativa celular aumentada;

 (b) presentan una lisis celular aumentada;

 (c) presentan un agotamiento celular reducido;

10 (d) mantienen la proliferación dependiente de citocinas;

 (e) mantienen una secreción de citocinas aumentada; o

 (f) cualquier combinación de (a) - (e),

 en relación con células T de control, en las que las
15 células T de control expresan proteína CD70 endógena.

 En algunas realizaciones, al menos el 50%, opcionalmente el 50%-65%, de las células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable de proteína de superficie TCR, no expresan un nivel detectable
20 de proteína de superficie β 2M, no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70 y/o expresan un nivel detectable del CAR.

 En algunas realizaciones, al menos el 90%, opcionalmente el 90%-100%, de las células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable de
25 proteína de superficie TCR. En algunas realizaciones, más del 99.5% de las células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable de proteína de superficie TCR.

30 En algunas realizaciones, al menos el 60%, opcionalmente el 60%-75%, de las células inmunitarias

modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, células T) no expresan un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$.

5 En algunas realizaciones, al menos el 80%, opcionalmente el 80%-100%, de las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, células T) no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70.

10 En algunas realizaciones, al menos el 80%, opcionalmente el 80%-95%, de las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, células T) expresan un nivel detectable del CAR (por ejemplo, un CAR anti-CD70 o un CAR anti-BCMA).

15 En algunas realizaciones, las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, células T) comprenden además un gen *PD-1* alterado.

20 En algunas realizaciones, al menos el 50%, opcionalmente el 50%-70%, de las células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable de proteína de superficie TCR, no expresan un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$, no expresan un nivel detectable de proteína de superficie PD-1, no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70 y/o expresan un nivel detectable del CAR.

25 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para producir una célula T modificada por ingeniería genética, comprendiendo el método:

(a) suministrar a una célula T
una nucleasa guiada por ARN,
30 un ARNg que selecciona como diana un gen *CD70*, y

un vector que comprende un molde donador que comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR; y

- 5 (b) producir una célula T modificada por ingeniería genética que comprende un gen CD70 alterado y que expresa el CAR.

En algunos aspectos, el método comprende además suministrar a la célula T un ARNg que selecciona como diana un gen *TRAC*; en el que la célula T modificada por ingeniería genética comprende además un gen *TRAC* alterado. En algunos
10 aspectos, el ácido nucleico que codifica para el CAR está flanqueado por brazos de homología izquierdo y derecho al gen *TRAC*; y en el que la célula T modificada por ingeniería genética comprende el ácido nucleico que codifica para el
15 CAR en el gen *TRAC*. En algunos aspectos, el método comprende además suministrar a la célula T un ARNg que selecciona como diana un gen $\beta 2M$; en el que la célula T modificada por ingeniería genética comprende además un gen $\beta 2M$ alterado.

También se proporcionan en el presente documento
20 métodos para producir una célula T modificada por ingeniería genética, comprendiendo el método (a) suministrar a una célula T una nucleasa guiada por ARN, un ARNg que selecciona como diana un gen *TRAC* , un ARNg que selecciona como diana un gen $\beta 2M$, un ARNg que selecciona como diana un gen *CD70*
25 y un vector que comprende un molde donador que comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR, opcionalmente en el que el ácido nucleico que codifica para el CAR está flanqueado por brazos de homología izquierdo y derecho al locus del gen *TRAC* , y (b) producir una célula T modificada
30 por ingeniería genética.

En algunas realizaciones, la nucleasa guiada por ARN es una nucleasa Cas9, opcionalmente una nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Pueden usarse otras nucleasas guiadas por ARN y se describen a continuación.

5 En algunas realizaciones, en las que el ARNg que selecciona como diana el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 98 o selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 118, y opcionalmente en las que el ARNg que selecciona como diana el gen *TRAC*
10 comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30. En algunas realizaciones, el ARNg que selecciona como diana el gen $\beta 2M$ comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 99 o selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 119, y opcionalmente en las que el ARNg que
15 selecciona como diana el gen $\beta 2M$ comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el ARNg que selecciona como diana el gen *CD70* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 94 o 95 o selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 114 o
20 115, y opcionalmente en las que el ARNg que selecciona como diana el gen *CD70* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26 o 27.

En cualquiera de los aspectos anteriores, la nucleasa guiada por ARN y el ARNg se complejan en una partícula de
25 ribonucleoproteína (RNP).

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además suministrar a la célula T un ARNg que selecciona como diana un gen *PD-1*.

En algunas realizaciones, el ARNg que selecciona como
30 diana el gen *PD-1* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 100 o selecciona como diana la secuencia de

nucleótidos de SEQ ID NO: 120, y opcionalmente en las que el ARNg que selecciona como diana el gen *PD-1* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 32.

5 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para producir una célula T modificada por ingeniería genética para inmunoterapia contra una célula diana, que comprende:

(a) alterar un gen *CD70* en una célula T, y
(b) expresar un CAR que se une a un antígeno expresado sobre
10 la célula diana, en el que el antígeno no es *CD70*. En algunos aspectos, la célula diana es una célula cancerosa. En algunos aspectos, el método es *ex vivo*. En algunos aspectos, el método comprende además alterar un gen *TRAC* en la célula T. En algunos aspectos, el método comprende además alterar un
15 gen $\beta 2M$ en la célula T. En algunos aspectos, el CAR está codificado por un ácido nucleico en el gen *TRAC* alterado. En algunos aspectos, el CAR es uno cualquiera de los CAR descritos en el presente documento.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una
20 población de células T modificadas por ingeniería genética producidas mediante uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documentp.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método de aumento de la proliferación de células T, que
25 comprende alterar el gen *CD70* en las células T. En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método de reducción del agotamiento de células T, que comprende alterar el gen *CD70* en las células T. En cualquiera de los aspectos anteriores, el gen *CD70* se altera mediante edición génica
30 por CRISPR/Cas. En algunos aspectos, el método comprende además alterar el gen *TRAC*, el gen $\beta 2M$ o tanto el gen *TRAC*

como el $\beta 2M$ en las células T. En algunos aspectos, el gen *TRAC*, gen $\beta 2M$ o tanto el gen *TRAC* como el $\beta 2M$ se altera mediante edición génica por CRISPR/Cas.

5 En algunas realizaciones, el vector comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46. En algunas realizaciones, el vector comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57. En algunas realizaciones, el vector comprende un ácido
10 nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149. En algunas realizaciones, el vector comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139.

15 En algunos aspectos, la divulgación proporciona métodos para administrar la población de células o células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento a un sujeto. En algunos aspectos, las células T modificadas por ingeniería genética son células T humanas
20 modificadas por ingeniería genética. En algunos aspectos, el sujeto tiene cáncer. En algunos aspectos, el cáncer expresa CD70, BMCA, CD19, CD33 o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, la población de células se administra al sujeto en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. En
25 algunos aspectos, el cáncer es un tumor maligno sólido o un tumor maligno hematológico. En algunos aspectos, el tumor maligno sólido se selecciona del grupo que consiste en: tumor de ovario, tumor pancreático, tumor de riñón, tumor de pulmón y tumor intestinal. En algunos aspectos, la población de
30 células se administra al sujeto en una cantidad eficaz para reducir el volumen de un tumor en el sujeto.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar la población de células o células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento a un sujeto.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al paciente una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden un gen CD70 alterado y un ácido nucleico que codifica para un CAR, tratando de ese modo el cáncer en el sujeto. En algunas realizaciones, el CAR se une a CD70. En algunas realizaciones, el CAR no se une a CD70.

En otros aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al paciente una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden:

- (i) un gen TRAC alterado;;
 - (ii) un gen B2M alterado;
 - (iii) un gen CD70 alterado; y
 - (iv) un ácido nucleico que codifica para un CAR;
- tratando de ese modo el cáncer en el sujeto.

En aún otros aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al paciente una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden:

- (i) un gen TRAC alterado;

(ii) un gen *B2M* alterado;

(iii) un gen *CD70* alterado; y

(iv) un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende (a) un ectodominio que comprende un fragmento de unión a antígeno anti-*CD70*, (b) un dominio transmembrana *CD8* y (c) un endodominio que comprende un dominio coestimulador *41BB* y un dominio de señalización *CD3z*,

tratando de ese modo el cáncer en el sujeto. En algunas realizaciones, el CAR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica para el CAR comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 45. En algunas realizaciones, el gen *TRAC* alterado comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 44.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden:

(i) un gen *TRAC* alterado, en el que el gen *TRAC* alterado comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46;

(ii) un gen $\beta 2M$ alterado; y

(iii) un gen *CD70* alterado,

tratando de ese modo el cáncer en el sujeto.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden:

(i) un gen *TRAC* alterado, en el que el gen *TRAC* alterado comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR, en el que la secuencia de ácido nucleico es al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 45;

5 (ii) un gen $\beta 2M$ alterado; y

(iii) un gen *CD70* alterado,

tratando de ese modo el cáncer en el sujeto. En algunos aspectos, el gen *TRAC* alterado comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 45.

10 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden:

15 (i) un gen *TRAC* alterado que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 44;

(ii) un gen $\beta 2M$ alterado; y

(iii) un gen *CD70* alterado,

20 tratando de ese modo el cáncer en el sujeto. En algunos aspectos, el gen *TRAC* alterado comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 44.

En cualquiera de los aspectos anteriores o relacionados, las células T modificadas por ingeniería genética son células T humanas modificadas por ingeniería genética. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética son células T alogénicas modificadas por ingeniería genética.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 La **FIG. 1** incluye un gráfico que muestra una edición génica múltiple altamente eficaz en células T *TRAC*-/ $\beta 2M$ -/*PD-1*-/*CD70*- (desactivación cuádruple).

La **FIG. 2** incluye un gráfico que muestra una expansión similar entre células sometidas a múltiples ediciones génicas.

La **FIG. 3** incluye gráficos que muestran una edición
5 génica múltiple eficaz en células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺
anti-CD70 (es decir, 3X KO (CD70), CD70 CAR⁺).

La **FIG. 4** incluye un gráfico que muestra que se
mantienen proporciones normales de células T CD4⁺ y CD8⁺ T
entre la población de células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-
10 CD70.

La **FIG. 5** incluye un gráfico que muestra una edición
génica múltiple eficaz en células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻
/CAR⁺ anti-CD70.

La **FIG. 6** incluye un gráfico que muestra que se
15 mantienen proporciones normales de células T CD4⁺ y CD8⁺ T
entre la población de células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺
anti-CD70 (es decir, 4X KO, CD70 CAR⁺).

Las **FIG. 7A-7C** incluyen gráficos que muestran datos
relacionados con la caracterización de células T CAR⁺ anti-
20 BCMA con múltiples ediciones génicas. Se tiñeron células T
TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-BCMA con desactivación doble y células
T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-BCMA con desactivación
cuádruple para detectar la expresión de TRAC y β2M (**FIG.**
7A), PD-1 y CD70 (**FIG. 7B**), y CAR para BCMA (**FIG. 7C**). El
25 CAR anti-BCMA se expresó a aproximadamente el 80% en las
células CAR T tanto con desactivación doble como cuádruple.

La **FIG. 8** incluye gráficos de citometría de flujo que
muestran la prevención de la pérdida de células CD4⁺ en
células CAR T 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) anti-CD33 en
30 comparación con células CAR T 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) anti-CD33
a lo largo de tres semanas.

La **FIG. 9** incluye un gráfico que muestra la proliferación celular potenciada por CD70 KO en células CAR T anti-CD33 a lo largo de dos semanas. Se cuantificó el número total de células viables en células CAR T 3X KO (TRAC-
5 / β 2M-/CD70-) y 2X KO (TRAC-/ β 2M-) anti-CD33.

La **FIG. 10** incluye un gráfico que muestra la proliferación celular potenciada por CD70 KO en células CAR T anti-CD19 a lo largo de dos semanas. Se cuantificó el número total de células viables en células CAR T 3X KO (TRAC-
10 / β 2M-/CD70-) y 2X KO (TRAC-/ β 2M-) anti-CD33.

La **FIG. 11** incluye gráficos que muestran la proliferación celular potenciada por CD70 KO en células CAR T anti-BCMA y rescataron el efecto perjudicial de PD1 KO sobre la proliferación de células CAR para BCMA. Se
15 cuantificó el número total de células viables en células CAR T 4X KO (TRAC-/ β 2M-/CD70-/PD1-), 3X KO (CD70) (TRAC-/ β 2M-/CD70-), 3X KO (PD1) (TRAC-/ β 2M-/PD1-) y 2X KO (TRAC-/ β 2M-) anti-CD33.

La **FIG. 12** incluye gráficos que muestran la proliferación celular potenciada por CD70 KO en células CAR T anti-BCMA y rescataron el efecto perjudicial de PD1 KO sobre la proliferación de células CAR para BCMA. Se
20 cuantificó el número total de células viables en células CAR T 4X KO (TRAC-/ β 2M-/CD70-/PD1-), 3X KO (CD70) (TRAC-/ β 2M-/CD70-), 3X KO (PD1) (TRAC-/ β 2M-/PD1-) y 2X KO (TRAC-/ β 2M-) anti-CD33. Las células CAR T anti-BCMA se derivaron de células T de un donante diferente que las células CAR T mostradas en la FIG. 11.

La **FIG. 13** incluye un gráfico que muestra una
30 comparación de la muerte celular apoptótica debida a exposición a antígeno en células T 2X KO (TRAC-/ β 2M-) CAR+

anti-BCMA y células T 3X KO (TRAC-/B2M-/CD70-) CAR+ anti-BCMA. Se expusieron células T CAR+ a antígeno BCMA unido a placa durante 24 horas con una reexposición cada 24 horas y se evaluó la apoptosis después de cada exposición a antígeno mediante citometría de flujo. La inducción de apoptosis debido a exposición a antígeno era menor en células T CAR+ anti-BCMA con un CD70 KO en comparación con las que no lo tenían.

La **FIG. 14** incluye un gráfico que muestra una comparación de la expansión de células CAR T tras la exposición a antígeno en células T 2X KO (TRAC-/B2M-) CAR+ anti-BCMA y células T 3X KO (TRAC-/B2M-/CD70-) CAR + anti-BCMA. Se expusieron células T CAR+ a antígeno BCMA unido a placa durante 24 horas con una reexposición cada 24 horas y se evaluó la expansión celular después de cada exposición a antígeno y se normalizó a la población en el momento 0 h. La expansión de la población después de la exposición a antígeno era mayor en células T CAR+ anti-BCMA con un CD70 KO en comparación con las que no lo tenían.

La **FIG. 15** incluye un gráfico que muestra una expansión celular robusta en células T TRAC-/β2M-/CD70-/CAR+ anti-CD70. Se cuantificó el número total de células viables en células CAR T 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) y 2X KO (TRAC-/β2M-) anti-CD70. Se generaron células 3X KO con ARNsg de CD70 o bien T7 o bien T8.

La **FIG. 16** incluye un gráfico que muestra una expansión celular robusta de células T TRAC-/β2M-/PD-1-/CD70-/CAR+ anti-CD70. Se cuantificó el número total de células viables en células CAR T 4X KO (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-), 3X KO (TRAC-/β2M-/PD1-) y 2X KO (TRAC-/β2M-) anti-CD70 .

La **FIG. 17** incluye gráficos que muestran una destrucción celular robusta de tanto células Nalm6 (panel superior) como células Raji (panel inferior) mediante células CAR T anti-CD19 (células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD19 o TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD19).

La **FIG. 18** incluye un gráfico que muestra una destrucción celular robusta de células MV411 mediante células CAR T anti-CD33 (células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD33 o TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD33).

La **FIG. 19** incluye un gráfico que muestra una destrucción celular robusta de células A498 mediante células T 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) CAR⁺ anti-CD70 en comparación con células T 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CAR⁺ anti-CD70.

La **FIG. 20** incluye un gráfico que muestra la expansión celular de células CAR T 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) o 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) anti-CD33 tras la exposición con células diana MV411.

La **FIG. 21** incluye un gráfico que muestra la expansión celular de células CAR T 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) o 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) anti-CD70 tras la exposición con células diana Nalm6.

La **FIG. 22A** incluye un gráfico que muestra la destrucción de células A498 mediante células CAR T anti-CD70 tras la reexposición en serie. Se utilizaron células T 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD1⁻), 3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), 3X KO (PD1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻) y 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CAR⁺ anti-CD70. Las células T 3X KO (CD70), CD70 CAR⁺ y las células T 4X KO, CD70 CAR⁺ fueron las más eficaces. La **FIG. 22B** incluye un gráfico que muestra la destrucción de células ACHN mediante células CAR T anti-CD70 tras la reexposición en serie. Se utilizaron las mismas células que en la FIG. 22A.

Las células T 3X KO (CD70), CD70 CAR⁺ y las células T 4X KO, CD70 CAR⁺ fueron las más eficaces.

La **FIG. 23A** incluye un gráfico que muestra la destrucción de células ACHN mediante células CAR T anti-CD70 a diversas razones de efector:diana. Se utilizaron células T 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD1⁻), 3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), 3X KO (PD1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻) y 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CAR⁺ anti-CD70. Las células T 3X KO (CD70), CD70 CAR⁺ y las células T 4X KO, CD70 CAR⁺ fueron superiores en destrucción después de múltiples reexposiciones en serie. La **FIG. 23B** incluye un gráfico que muestra la expresión de LAG3 (izquierda) y PD1 (derecha) en las células de la FIG. 23A después de ocho reexposiciones.

Las **FIG. 24A-24C** incluyen gráficos que muestran que la desactivación de PD-1 y CD70 potencia la actividad de destrucción celular de las células T CAR⁺ anti-BCMA tal como se mide a través de reexposiciones en serie con una línea celular de mieloma múltiple (MM.1S). Células T (2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CAR⁺ anti-BCMA con desactivación doble (círculos) comenzaron a perder su potencia hacia células MM.1S tras aproximadamente 4 reexposiciones, mientras que células T (4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD1⁻) CAR⁺ anti-BCMA con desactivación cuádruple (cuadrados) eran capaces de destruir el 100% de las células MM.1S tras 10 reexposiciones (**FIG. 24A**). Consecuente con esto, las células T CAR⁺ anti-BCMA con desactivación cuádruple continuaron secretando IFN-γ en respuesta las células diana tras 10 reexposiciones, mientras que las células T CAR⁺ anti-BCMA con desactivación doble mostraron secreción de IFN-γ reducida tras la tercera reexposición (**FIG. 24B**). Las células T CAR⁺ anti-BCMA con desactivación cuádruple también mostraron mayor

proliferación en respuesta a células diana que las células T CAR⁺ anti-BCMA con desactivación doble (**FIG. 24C**).

Las **FIG. 25A-25C** incluyen gráficos que muestran la mayor actividad de destrucción celular en células de cáncer de riñón A498 PD-L1 (que sobreexpresan PD-L1) usando células T (4X KO) TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple y células T (3X KO (CD70)) TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple, en relación con células T (2X KO) TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble y células T (3X KO (PD1) TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple. Se usó una razón de células CAR T:células A498-PD-L1 de 2:1 en la **FIG. 25A**, se usó una razón de células CAR T:células A498-PD-L1 de 1:1 en la **FIG. 25B** y se usó una razón de células CAR T:células A498-PD-L1 de 0.5:1 en la **FIG. 25C**.

La **FIG. 26A** y **FIG. 26B** incluyen gráficos que muestran que células T (4X KO) TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple secretan los niveles más altos de citocinas IFN-gamma (**FIG. 26A**) e IL-2 (**FIG. 26B**), en relación con células T (3X KO (CD70) TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple, células T (2X KO) TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble y células T (3X KO (PD1) TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple. Se usó una razón de células CAR T:células A498-PD-L1 de 1:1.

La **FIG. 27A** incluye un gráfico que muestra los resultados de un experimento diseñado para evaluar la reducción del volumen tumoral en un modelo de carcinoma de células renales A498 subcutáneo expuesto a: células T 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻), CD70 CAR⁺; células T 3X KO (PD-1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻), CD70 CAR⁺; células T 3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻),

CD70 CAR⁺; o células T 4X KO (PD-1, CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻/CD70⁻), CD70 CAR⁺. La **FIG. 27B** incluye un gráfico que muestra los resultados de un experimento diseñado para evaluar la prevención del crecimiento tumoral en un modelo de reexposición de carcinoma de células renales A498 subcutáneo. Se reexpusieron ratones de la FIG. 27A a células tumorales A498 el día 25 y se evaluó el volumen tumoral a lo largo del tiempo. La **FIG. 27C** incluye un gráfico que muestra los resultados de un experimento diseñado para evaluar la reducción del volumen tumoral en un modelo de carcinoma de células renales A498 subcutáneo (tumor grande de ~150 mm³ en el momento de la inyección de CAR-T) expuesto a: células T 3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), CD70 CAR⁺; células T 4X KO (PD-1, CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻/CD70⁻), CD70 CAR⁺; células T 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻), CD70 CAR⁺; o células T 3X KO (PD-1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻), CD70 CAR⁺.

La **FIG. 28A** incluye un gráfico que muestra la reducción del volumen tumoral en un modelo de MM.1S subcutáneo expuesto a: células T 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻), BCMA CAR⁺; células T 3X KO (PD-1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻), BCMA CAR⁺; células T 3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), BCMA CAR⁺; o células T 4X KO (PD-1, CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻/CD70⁻), BCMA CAR⁺.

La **FIG. 28B** incluye un gráfico que muestra la reducción del volumen tumoral en un modelo de MM.1S subcutáneo después de una reexposición a células tumorales. Se reexpusieron ratones de la FIG. 28A con una segunda inoculación de células MM.1S el día 45 y se evaluó el volumen tumoral a lo largo del tiempo.

La **FIG. 29** incluye gráficos que muestran el número de células T CD45⁺ 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻), BCMA CAR⁺ humanas; células T CD45⁺ 3X KO (PD-1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻), BCMA CAR⁺ humanas;

células T CD45⁺ 3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), BCMA CAR⁺ humanas; y células T CD45⁺ 4X KO (PD-1, CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻/CD70⁻), BCMA CAR⁺ humanas 1 semana (gráfico derecho), 2 semanas (gráfico central) y 3 semanas (gráfico izquierdo) tras la dosificación.

La **FIG. 30** incluye gráficos que muestran los resultados de un experimento diseñado para evaluar la reducción del volumen tumoral en un modelo de xenoinjerto de tumor RPMI-8226 subcutáneo expuesto a: células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-BCMA (células T 2X KO, BCMA CAR⁺); células T TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻/CAR⁺ anti-BCMA (células T 3X KO (PD-1), BCMA CAR⁺); células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-BCMA (células T 3X KO (CD70), BCMA CAR⁺); o células T TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-BCMA (células T 4X KO (PD-1, CD70), BCMA CAR⁺), a dosis de 1x10⁵, 3x10⁵, 1x10⁶ o 3x10⁶ células/ratón.

La **FIG. 31** incluye un gráfico que muestra que las células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 mantienen la proliferación dependiente de citocinas.

La **FIG. 32** muestra el crecimiento dependiente de citocinas de las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70.

La **FIG. 33** incluye un gráfico que muestra que las células T 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻), BCMA CAR⁺ mantienen la dependencia de citocinas.

La **FIG. 34** incluye un gráfico que muestra la liberación de citocinas (IL-2) potenciada por células T 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻) CAR⁺ anti-CD70 en comparación con células T 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CAR + anti-CD70 cuando se cocultivan con células de cáncer de riñón A498 a diversas razones durante 24 horas.

La **FIG. 35** incluye un gráfico que muestra una destrucción celular robusta de células A498 por células CAR T anti-CD70 (2X KO (TRAC⁻/β2M⁻), CD70 CAR+; 3X KO (PD-1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻), CD70 CAR+; y 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) CD70 CAR+) en relación con células T TCR+. Se cocultivaron células T con células A498 a diversas razones durante 24 horas y se midió el porcentaje de lisis celular.

La **FIG. 36** incluye un gráfico que muestra la actividad de destrucción celular más alta en células de cáncer de riñón A498 usando células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple (4X KO, CD70 CAR+) y células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple (3X KO (CD70), CD70 CAR+), en relación con células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble (es decir, 2X KO, CD70 CAR+) y células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple (es decir, 3X KO (PD-1), CD70 CAR+). Se usó una razón de células CAR T:células A498 de 0.25:1. Se midió el porcentaje de lisis celular de células A498 24 horas después del cocultivo.

Las **FIG. 37A** y **37B** incluyen gráficos que muestran que células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple (4X KO, CD70 CAR+) y células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple (3X KO (CD70), CD70 CAR+) secretan los niveles más altos de citocinas IFN-gamma (**FIG. 37A**) e IL-2 (**FIG. 37B**), en relación con células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble (2X KO, CD70 CAR+) y células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple (3X KO (PD-1), CD70 CAR+). Se usó una razón de células CAR T:células A498 de 0.25:1. Se midió la secreción de IFN-gamma e IL-2 24 horas tras el cocultivo.

La **FIG. 38** incluye un gráfico que muestra que la desactivación de CD70 en células CAR T anti-CD70 (3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), CD70 CAR+; 3X KO (PD-1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻), CD70 CAR+; y 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD-1⁻), CD70 CAR+) disminuyó los niveles de expresión de PD-1 en células T CD4⁺ en relación con células CAR T anti-CD70 que expresan CD70 endógeno (2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CD70 CAR+).

Las **FIG. 39A** y **FIG. 39B** incluyen gráficos que muestran que la desactivación de CD70 en células CAR T anti-CD70 (3X KO (CD70) (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), CD70 CAR+; 3X KO (PD-1) (TRAC⁻/β2M⁻/PD1⁻), CD70 CAR+; y 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD-1⁻), CD70 CAR+) disminuyó los niveles de agotamiento del marcador LAG3 en células T CD8⁺ (**FIG. 39A**) y células T CD4⁺ (**FIG. 39B**) en relación con células CAR T anti-CD70 que expresan CD70 endógeno (2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) CD70 CAR+).

La **FIG. 40A** incluye gráficos que muestran la expresión de CD70 relativa en cinco líneas de células cancerosas diferentes (panel izquierdo) y la expresión de CD70 relativa en tres líneas de células cancerosas diferentes (panel derecho). La **FIG. 40B** incluye gráficos que muestran la expresión de CD70 relativa en nueve líneas de células cancerosas diferentes. Las **FIG. 40C-40D** incluyen gráficos que muestran la actividad de destrucción celular más alta en células de cáncer de riñón ACHN (ATCC® CRL-1611™) (que expresan bajos niveles de CD70) usando células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple (4X KO, CD70 CAR+) y células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple (3X KO (CD70), CD70 CAR+), en relación con células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble (2X KO, CD70 CAR+) y células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple (3X KO (PD-

1), CD70 CAR+). Se usó una razón de células CAR T:células ACHN de 0.5:1 en la **FIG. 40C** y se usó una razón de células CAR T:células ACHN de 0.25:1 en la **FIG. 40D**. Las **FIG. 40E** y **FIG. 40F** incluyen gráficos que muestran la actividad de destrucción celular usando células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple (**FIG. 40E**) y células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple (**FIG. 40F**) frente a líneas celulares de tumores sólidos adicionales con niveles variables de expresión de CD70 (razón de células efectoras/diana de 4:1, 1:1 o 0.25:1). La **FIG. 40G** incluye un gráfico que muestra la actividad de destrucción celular usando las células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple frente a líneas celulares de tumores sólidos después de un período de cocultivo de 24 horas o 96 horas. Las **FIG. 40H-40J** incluyen gráficos que muestran la actividad de destrucción celular usando las células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple (3KO (CD70), CD70 CAR+) frente a células de leucemia mielógena crónica deficientes en CD70 (K562) (**FIG. 40H**), células de mieloma múltiple que expresan CD70 (MM.1S) (**FIG. 40I**) y células de linfoma de células T que expresan CD70 (HuT78) (**FIG. 40J**) a diversas razones de efector:diana.

La **FIG. 41A** y **Fig. 41B** incluyen gráficos que muestran que células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple (4X KO, CD70 CAR+) y células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple (3X KO (CD70), CD70 CAR+) secretan los niveles más altos de citocinas IFN-gamma (**FIG. 41A**) e IL-2 (**FIG. 41B**), en relación con células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble (2X KO, CD70 CAR+) y células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺

anti-CD70 con desactivación triple (3X KO (PD-1), CD70 CAR+). Se usó una razón de células CAR T:células ACHN de 0.25:1.

La **FIG. 42A** incluye un gráfico que muestra los resultados de un experimento diseñado para evaluar la reducción del volumen tumoral en un modelo de xenoinjerto de tumor de ovario humano (por ejemplo, células tumorales SKOV-3) expuestas a células CAR T 3X KO (TRAC-/B2M-/CD70-) anti-CD70. La **FIG. 42B** incluye un gráfico que muestra los resultados de un experimento diseñado para evaluar la reducción del volumen tumoral en un modelo de xenoinjerto de tumor de pulmón de células no pequeñas humano (por ejemplo, células tumorales NCI-H1975) expuestas a células CAR T 3X KO (TRAC-/B2M-/CD70-) anti-CD70. La **FIG. 42C** incluye un gráfico que muestra los resultados de un experimento diseñado para evaluar la reducción del volumen tumoral en un modelo de xenoinjerto de tumor pancreático humano (por ejemplo, células tumorales Hs766T) expuestas a células CAR T 3X KO (TRAC-/B2M-/CD70-) anti-CD70. La **FIG. 42D** incluye gráficos que muestran los resultados de un experimento diseñado para evaluar la reducción del volumen tumoral en un modelo de xenoinjerto de linfoma de células T humano (por ejemplo, células tumorales HuT78) expuestas a células CAR T 3X KO (TRAC-/B2M-/CD70-) anti-CD70. Se muestran los volúmenes tumorales de ratones individuales (izquierda) y los volúmenes tumorales medios (derecha).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la alteración del gen CD70 en células inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar un resto que selecciona como diana un antígeno (por ejemplo, un CAR) potencia varias características

importantes para la inmunoterapia basada en células, incluyendo la eficacia antitumoral. Específicamente, tales células inmunitarias modificadas por ingeniería genética mostraron características superiores inesperadas, incluyendo persistencia *in vivo* y proliferación prolongadas dando como resultado eficacia antitumoral potenciada, a largo plazo. Notablemente, estas características inesperadas se han demostrado con restos de selección como diana específicos para diversos antígenos, incluyendo BCMA, CD19, CD33 y CD70.

Tal como se demuestra en la presente, la alteración del gen CD70 dio como resultado el mantenimiento de la citotoxicidad de células inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar un resto que selecciona como diana un antígeno después de múltiples rondas de exposiciones mediante células cancerosas *in vitro*. Sin querer restringirse a la teoría, este mantenimiento de la citotoxicidad indica que la alteración del gen CD70 hace que las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética sean resistentes al agotamiento y puede dar como resultado células que viven más tiempo.

Se encontró también que la alteración del gen CD70 en células inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar un resto que selecciona como diana un antígeno potenciaba la eficacia antitumoral contra tumores grandes e inducía una respuesta de memoria anticancerígena duradera. Específicamente, la respuesta de memoria anticancerígena prevenía el crecimiento tumoral tras la reexposición. Además, se ha demostrado que la alteración del gen CD70 da como resultado una citotoxicidad potenciada de las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar un resto que selecciona como diana un antígeno a

razones inferiores de células inmunitarias modificadas por ingeniería genética con respecto a células diana, lo que indica la eficacia potencial de dosis bajas de células inmunitarias modificadas por ingeniería genética.

5 Se ha mostrado también que la alteración del gen CD70 potencia la proliferación celular y la persistencia *in vivo* de células inmunitarias modificadas por ingeniería genética. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que las características superiores de las células inmunitarias
10 modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento permiten poblaciones de células más constantes, una producción a una mayor escala debido a la capacidad de las células para sobrevivir a más divisiones celulares y que se requieran menos células de partida para producir las
15 células modificadas por ingeniería genética. Tales características puede resultar también beneficiosas en un entorno clínico. Por ejemplo, el aumento de la expansión y la disminución del agotamiento indican un aumento de la eficacia por dosis y la capacidad de obtener eficacia con
20 dosis más bajas.

 Se ha demostrado también que la alteración del gen CD70 en células inmunitarias modificadas por ingeniería genética para expresar un resto que selecciona como diana un antígeno mantiene la citotoxicidad contra células cancerosas que
25 expresan moléculas supresoras altamente inmunitarias, es decir, PD-L1. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que la señal negativa interna de PD-1 expresada en células inmunitarias cuando se une a PD-L1 expresada sobre células cancerosas, se supera alterando CD70.

30 Por consiguiente, se proporcionan en la presente métodos y composiciones (por ejemplo, composiciones

celulares) para el tratamiento del cáncer, tales como tumores malignos BCMA⁺, CD19⁺, CD33⁺ y CD70⁺, que implican el uso de las células inmunitarias modificadas por ingeniería genética con eficacia y persistencia aumentadas.

5 **Edición del gen CD70**

La agrupación de diferenciación 70 (CD70) es un miembro de la superfamilia de factores de necrosis tumoral y su expresión está restringida a linfocitos T y B activados y células dendríticas maduras. CD70 está implicado en la supervivencia de células T reguladoras y células tumorales a través de la interacción con su ligando, CD27. CD70 y su receptor CD27 tienen múltiples papeles en la función inmunitaria en múltiples tipos de células incluyendo células T (activadas y T reg) y células B. No está claro exactamente cómo funciona CD70 en todos estos tipos de células para controlar funciones tales como la apoptosis, con publicaciones que indican papeles contradictorios. Por ejemplo, se ha notificado que CD70 induce apoptosis o supervivencia de células T dependiendo de la carga antigénica (Wensveen, F., et al. J. Immunol, Vol 188: 4256-4267, 2012).

Aunque las células CAR T han demostrado ser un producto inmunoterapéutico eficaz, sigue habiendo diversos desafíos. Por ejemplo, a lo largo del tiempo las células CAR T se agotan y se vuelven ineficaces *in vivo*. Con respecto a su fabricación, se tarda un tiempo significativo en producir suficientes células para dosificar a un paciente. Para abordar estas limitaciones, la presente divulgación proporciona células CAR T que se han modificado por ingeniería genética para alterar la expresión de CD70 endógena mientras que al mismo tiempo expresan un resto que selecciona como diana un antígeno (por ejemplo, un scFv).

Sorprendentemente, la presente divulgación muestra que la alteración del gen CD70 permite una salud y función de CAR T aumentadas (por ejemplo, proliferación prolongada, agotamiento reducido) independientemente del antígeno que selecciona como diana el scFv en el CAR T. Esto se aplica incluso a antígenos expresados en células T tales como CD33 y CD70, donde los efectos del gen CD70 alterado retienen la función de CAR T incluso cuando puede esperarse un fratricidio. Es decir, estas células con desactivación de CD70 (por ejemplo, en las que el gen *CD70* se ha editado usando la tecnología de edición génica de CRISPR/Cas9), independientemente de la inserción del CAR, presentan un crecimiento celular continuo, estacionario en relación con células T no modificadas (o células T editadas que expresan CD70) y expresan niveles inferiores de marcadores de agotamiento, tales como LAG3. Las células CAR T de la presente divulgación pueden incluir cualquier anticuerpo (incluyendo anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpos) u otra molécula (por ejemplo, receptor o ligando) que se una específicamente a un antígeno de cáncer para guiar a la célula CAR T hasta una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD70 (por ejemplo, un scFv anti-CD70). En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, un scFv anti-CD19). En aún otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-BCMA (por ejemplo, un scFv anti-BCMA). En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo, un scFv anti-CD33). Otros antígenos de cáncer se abarcan por la presente divulgación.

Debe entenderse que la alteración génica abarca la modificación génica a través de edición génica (por ejemplo,

usando edición génica por CRISPR/Cas para insertar o delecionar uno o más nucleótidos). En algunas realizaciones, un gen alterado es un gen que no codifica para una proteína funcional. En algunas realizaciones, una célula que comprende un gen alterado no expresa (por ejemplo, en la superficie celular) un nivel detectable (por ejemplo, mediante anticuerpo, por ejemplo, mediante citometría de flujo) de la proteína codificada por el gen. Una célula que no expresa un nivel detectable de la proteína puede denominarse célula con desactivación. Por ejemplo, una célula que tiene un gen *CD70* editado puede considerarse un célula con desactivación de CD70 si no puede detectarse proteína CD70 en la superficie celular usando un anticuerpo que se une específicamente a la proteína CD70.

Se proporcionan en el presente documento, en algunas realizaciones, poblaciones de células en las que un cierto porcentaje de las células se han editado (por ejemplo, gen *CD70* editado), dando como resultado un cierto porcentaje de células que no expresan un gen y/o proteína particular. En algunas realizaciones, al menos el 50% (por ejemplo, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95%) de las células de una población de células con genes editados son células con desactivación de CD70. En algunas realizaciones, al menos el 50% de las células (por ejemplo, células T) de la población no expresan niveles detectables de proteína CD70. En algunas realizaciones, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% de las células de una población de células con genes editados pueden ser células con desactivación de CD70.

En algunas realizaciones, el 10%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35% o el 40% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70. En algunas realizaciones, el porcentaje de células T modificadas por ingeniería genética que no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70 aumenta a lo largo del tiempo. Por tanto, en algunas realizaciones, al menos el 50% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población de células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70. Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70. En algunas realizaciones, el 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70.

Los ejemplos no limitativos de secuencias de ARNg de CD70 modificadas y no modificadas que pueden usarse tal como se proporciona en la presente para crear una alteración genómica (por ejemplo, alteración, por ejemplo, delección, inserción, sustitución) en el gen *CD70* se enumeran en la **Tabla 5** (por ejemplo, SEQ ID NO: 23-29 y 33-39). Pueden diseñarse otras secuencias de ARNg usando la secuencia del gen CD70 ubicado en el cromosoma 19 (coordenada de GRCh38: Cromosoma 19: 6,583,183-6,604,103; Ensembl: ENSG00000125726). En ciertas realizaciones, ARNg que

seleccionan como diana la región genómica de CD70 crean Indels (por ejemplo: inserciones, deleciones o sustituciones) en, o alrededor de, el gen CD70 alterando la expresión del ARNm y/o proteína de CD70.

5 En algunas realizaciones, una partícula de ribonucleoproteína (RNP) que contiene una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas9) y un ARNg que selecciona como diana el gen *CD70* (o cualquier otro gen de interés) se suministran a células T
10 (por ejemplo, células T primarias). En otras realizaciones, la nucleasa guiada por ARN y el ARNg se suministran por separado a células T. Una partícula de ribonucleoproteína (RNP) es simplemente una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, Cas9) precomplejada/complejada con (unida) a ARNg.

15 En algunas realizaciones, el ARNg que selecciona como diana el gen *CD70* es un ARNg modificado sintético tal como pero sin limitarse a uno cualquiera de los ARNg que comprenden SEQ ID NO: 33-39. En algunas realizaciones, el ARNg que selecciona como diana el gen *CD70* es un ARNg no
20 modificado sintético tal como pero sin limitarse a uno cualquiera de los ARNg que comprenden SEQ ID NO: 23-29.

 En algunas realizaciones, ARNg que seleccionan como diana la región genómica de *CD70* y nucleasa guiada por ARN crean roturas bicatenarias en el gen *CD70*. La reparación
25 de la rotura da como resultado Indels en el gen *CD70* en el que la secuencia del gen *CD70* puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 129-134.

Edición génica múltiple

30 Las células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación, en algunas realizaciones, incluyen más

de un gen alterado (por ejemplo: más de una edición génica), por ejemplo, en más de un gen. Por ejemplo, una célula T modificada por ingeniería genética puede comprender un gen *CD70* alterado, un gen de región constante de cadena alfa de receptor de células T alterado (*TRAC*), un gen de beta-2-microglobulina alterado ($\beta 2M$), un gen de muerte celular programada-1 alterado (*PD-1* o *PDCD1*), o cualquier combinación de dos o más de los genes alterados anteriores. En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende un gen *TRAC* alterado, un gen $\beta 2M$ alterado y un gen *CD70* alterado. En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende un gen *TRAC* alterado, un gen $\beta 2M$ alterado y un gen *PD-1* alterado. En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende un gen *TRAC* alterado, un gen $\beta 2M$ alterado, un gen *CD70* alterado y un gen *PD-1* alterado.

Edición del gen *TRAC*

En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende un gen *TRAC* alterado. Esta alteración conduce a la pérdida de función del TCR y hace que la célula T modificada por ingeniería genética no sea alorreactiva y sea adecuada para trasplante alogénico, minimizando el riesgo de enfermedad de injerto contra huésped. En algunas realizaciones, la expresión del gen *TRAC* endógeno se elimina para prevenir una respuesta de injerto contra huésped.

En algunas realizaciones, se crea una alteración en la expresión del gen *TRAC* insertando un receptor de antígeno quimérico (CAR) en el gen *TRAC* (por ejemplo, usando un vector viral adenoasociado (AAV) y molde donador). En algunas

realizaciones, se crea una alteración en la expresión del gen *TRAC* con una nucleasa y ARNg que seleccionan como diana la región genómica de *TRAC*. En algunas realizaciones, se crea una delección genómica en el gen *TRAC* mediante HDR, en la que un receptor de antígeno quimérico (CAR) reemplaza a un segmento del gen *TRAC* (por ejemplo, usando un vector de virus adenoasociado (AAV) y molde donador). En algunas realizaciones, se crea una alteración en la expresión del gen *TRAC* con una nucleasa y ARNg que seleccionan como diana la región genómica de *TRAC*, e insertando un receptor de antígeno quimérico (CAR) en el gen *TRAC*.

Se enumeran ejemplos no limitativos de secuencias de ARNg de *TRAC* modificadas y no modificadas que pueden usarse tal como se proporciona en el presente documento para crear una alteración genómica en el gen *TRAC* en la **Tabla 7** (por ejemplo, SEQ ID NO: 30 y 40). Véase también la solicitud internacional n.º PCT/US2018/032334, presentada el 11 de mayo de 2018, incorporada en el presente documento como referencia. Pueden diseñarse otras secuencias de ARNg usando la secuencia del gen *TRAC* ubicada en el cromosoma 14 (GRCh38: cromosoma 14: 22,547,506-22,552,154;. Ensembl; ENSG00000277734). En algunas realizaciones, ARNg que seleccionan como diana la región genómica de *TRAC* y nucleasa guiada por ARN crean roturas en la región genómica de *TRAC* dando como resultado Indels en el gen *TRAC* que alteran la expresión del ARNm o proteína.

En algunas realizaciones, al menos el 50% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población no expresan un nivel detectable de proteína de superficie de receptor de células T (TCR). Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos

el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población pueden no expresar un nivel detectable de proteína de superficie TCR. En algunas realizaciones, el 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población no expresan un nivel detectable de proteína de superficie TCR.

En algunas realizaciones, una partícula de ribonucleoproteína (RNP) que contiene una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas9) y un ARNg que selecciona como diana el gen *TRAC* (o cualquier otro gen de interés) se suministran a células T (por ejemplo, células T primarias). En otras realizaciones, la nucleasa guiada por ARN y el ARNg se suministran por separado a células T. Una partícula de ribonucleoproteína (RNP) es simplemente una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, Cas9) precomplejada/complejada con un ARNg.

En algunas realizaciones, ARNg y nucleasa guiada por ARN que selecciona como diana la región genómica de *TRAC* dan como resultado Indels en el gen *TRAC* que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las siguientes secuencias en la **Tabla 1**:

Tabla 1.

Secuencia	SEQ ID NO:
AAGAGCAACAAATCTGACT	1
AAGAGCAACAGTGCTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT	2
AAGAGCAACAAATCTGACT	

5	AAGAGCAACAGTGCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	3
	AAGAGCAACAGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	4
	AAGAGCAACAGTGCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT	5
	AAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	6
	AAGAGCAACAGTGCTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	7
10	AAGAGCAACAGTGCTGTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACT AAGAGCAACAAATCTGACT	8

En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende una delección en el gen *TRAC* en relación con células T no modificadas. En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende una delección de 15-30 pares de bases en el gen *TRAC* en relación con células T no modificadas. En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende una delección de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 pares de bases en el gen *TRAC* en relación con células T no modificadas. En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende una delección de más de 30 pares de bases en el gen *TRAC* en relación con células T no modificadas. En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende una delección de 20 pares de bases en el gen *TRAC* en relación con células T no modificadas. En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende una delección de SEQ ID NO: 86 en el gen *TRAC* en relación con células T no modificadas. En algunas realizaciones, una

célula T modificada por ingeniería genética comprende una
delección que comprende SEQ ID NO: 86 en el gen *TRAC* en
relación con células T no modificadas. En algunas
realizaciones, una célula T modificada por ingeniería
5 genética comprende una delección de SEQ ID NO: 118 en el gen
TRAC en relación con células T no modificadas. En algunas
realizaciones, una célula T modificada por ingeniería
genética comprende una delección que comprende SEQ ID NO: 118
en el gen *TRAC* en relación con células T no modificadas.

10 Edición del gen $\beta 2M$

En algunas realizaciones, una célula T modificada por
ingeniería genética comprende un gen $\beta 2M$ alterado. $\beta 2M$ es un
componente común (invariante) de complejos de MHC I. La
alteración de su expresión mediante edición génica impedirá
15 respuestas del huésped frente a células T alogénicas
terapéuticas conduciendo a una persistencia aumentada de
células T alogénicas. En algunas realizaciones, se elimina
la expresión del gen $\beta 2M$ endógeno para impedir una respuesta
de huésped contra injerto.

20 Se enumeran ejemplos no limitativos de secuencias de
ARNg de $\beta 2M$ modificadas y no modificadas que pueden usarse
tal como se proporciona en el presente documento para crear
una delección genómica en el gen $\beta 2M$ en la **Tabla 7** (por
ejemplo, SEQ ID NO: 31 y 41). Véase también la solicitud
25 internacional n.º PCT/US2018/032334, presentada el 11 de
mayo de 2018, incorporada en la presente como referencia.
Pueden diseñarse otras secuencias de ARNg usando la secuencia
del gen $\beta 2M$ ubicada en el cromosoma 15 (coordenadas de
GRCh38: Cromosoma 15: 44,711,477-44,718,877 ; Ensembl:
30 ENSG00000166710).

En algunas realizaciones, ARNg que seleccionan como diana la región genómica de $\beta 2M$ y nucleasa guiada por ARN crean roturas en la región genómica de $\beta 2M$ dando como resultado Indels en el gen $\beta 2M$ que alteran la expresión del ARNm o la proteína.

En algunas realizaciones, al menos el 50% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población no expresan un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90% o al menos el 95% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población pueden no expresar un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. En algunas realizaciones, el 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población no expresan un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$.

En algunas realizaciones, menos del 50% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población de células expresan un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. En algunas realizaciones, menos del 30% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población de células expresan un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. Por ejemplo, menos del 50%, menos del 30%, menos del 25%, menos del 20%, menos del 15%, menos del 10% o menos del 5% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población de células expresan un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$. En algunas realizaciones, el 40% - 30%, el 40%-20%, el 40% - 10%, el 40%-5%, el 30%-20%, el 30%-10%, el 30%-5%, el 20%-10%, el

20%-5% o el 10%-5% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población de células expresan un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$.

En algunas realizaciones, una partícula de
 5 ribonucleoproteína (RNP) que contiene una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas9) y un ARNg que selecciona como diana el gen *B2M* (o cualquier otro gen de interés) se suministran a células T (por ejemplo, células T primarias). En otras realizaciones,
 10 la nucleasa guiada por ARN y el ARNg se suministran por separado a células T. Una partícula de ribonucleoproteína (RNP) es simplemente una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, Cas9) precomplejada/complejada con un ARNg.

En algunas realizaciones, un gen $\beta 2M$ editado comprende
 15 una secuencia de nucleótidos seleccionada de las siguientes secuencias en la **Tabla 2**.

Tabla 2.

	Secuencias	SEQ ID NO:
20	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCCTGGAGGCTA TCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	9
	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCCTGGAGGCTAT CCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	10
	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGAGGCTATCCA GCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	11
25	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGATAGCCTGGA GGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	12
	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCT CCCGCT	13
30	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGTGGCCTGGAGG CTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT	14

Edición del gen *PD-1*

PD-1 es una molécula de punto de control inmunitario que está regulada por incremento en células T activadas y sirve para amortiguar o detener respuestas de células T. La alteración de PD-1 mediante edición génica podría conducir a respuestas de células T más persistentes y/o potentes y/o reducir la supresión inmunitaria en un sujeto. En algunas realizaciones, una célula T modificada por ingeniería genética comprende un gen *PD-1* alterado. En algunas realizaciones, la expresión del gen *PD-1* endógeno se elimina para potenciar la eficacia antitumoral de las células CAR T de la presente divulgación.

Se enumeran ejemplos no limitativos de secuencias de ARNg de PD-1 modificadas y no modificadas que pueden usarse tal como se proporciona en la presente para crear una delección genómica en el gen *PD-1* en la **Tabla 5** (por ejemplo, SEQ ID NO: 32 y 42). Véase también la solicitud internacional n.º PCT/US2018/032334, presentada el 11 de mayo de 2018, incorporada en la presente como referencia. Otras secuencias de ARNg pueden diseñarse usando la secuencia del gen *PD-1* ubicado en el cromosoma 2 (coordenadas de GRCh38: Cromosoma 2: 241,849,881-241,858,908; Ensembl: ENSG00000188389).

En algunas realizaciones, ARNg que seleccionan como diana y nucleasa guiada por ARN la región genómica de PD-1 crean roturas en la región genómica de TRAC dando como resultado Indels en el gen *PD-1* que alteran la expresión del ARNm o proteína de PD-1.

En algunas realizaciones, al menos el 50% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población no expresan un nivel detectable de proteína de superficie PD-1. Por ejemplo, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al

menos el 90% o al menos el 95% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población pueden no expresar un nivel detectable de proteína de superficie PD-1 . En algunas realizaciones, el 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, 50%-60%, 60%-100%, 60%-90%, 60%-80%, 60%-70%, 70%-100%, 70%-90%, 70%-80%, 80%-100%, 80%-90%, o 90%-100% de las células T modificadas por ingeniería genética de una población no expresan un nivel detectable de proteína de superficie PD-1 .

En algunas realizaciones, una partícula de ribonucleoproteína (RNP) que contiene una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas9) y un ARNg que selecciona como diana el gen *PD-1* (o cualquier otro gen de interés) se suministran a células T (por ejemplo, células T primarias). En otras realizaciones, la nucleasa guiada por ARN y el ARNg se suministran por separado a células T. Una partícula de ribonucleoproteína (RNP) es simplemente una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, Cas9) precomplejada/complejada con un ARNg.

Fenotipos celulares

En algunas realizaciones, una o más ediciones génicas dentro de una población de células dan como resultado un fenotipo asociado con cambios en la capacidad proliferativa celular, agotamiento celular, viabilidad celular, capacidad de lisis celular (por ejemplo, aumento de la producción y/o liberación de citocinas), o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de una población comprenden un CAR que incluye un ectodominio de scFv anti-CD70. En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética

de anti-CD70 comprenden un CAR que incluye un ectodominio de scFv anti-BCMA. En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de una población comprenden un CAR que incluye un ectodominio de scFv anti-CD19. En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de una población comprenden un CAR que incluye un ectodominio de scFv anti-CD33. Cualquiera de las células T modificadas por ingeniería genética anteriores pueden comprender también una alteración en uno o más de los siguientes genes: TRAC, β 2M, PD-1 y/o CD70 (por ejemplo, TRAC-/ β 2M-/CD70-; TRAC-/ β 2M-/PD-1-; o TRAC-/ β 2M-/PD-1-/CD70-).

En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan una capacidad proliferativa celular aumentada en relación con células de control. En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan al menos el 20% más de capacidad proliferativa celular, en relación con células T de control. Por ejemplo, células T modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, TRAC-/ β 2M-/CD70-; TRAC-/ β 2M-/PD-1-; o TRAC-/ β 2M-/PD-1-/CD70-; con o sin un CAR) pueden presentar al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80% o al menos el 90% más de capacidad proliferativa celular, en relación con células T de control. En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan el 20%-100%, 20%-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-

70%, o 50%-60% más de capacidad proliferativa celular, en relación con células T de control. Los expertos en la técnica conocen métodos de medición de la proliferación celular y se describen en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan un agotamiento reducido, en relación con células T de control. Por ejemplo, las células T modificadas por ingeniería genética pueden expresar niveles reducidos de LAG3 (u otros
10 marcadores de agotamiento), en relación con células T de control. En algunas realizaciones, los niveles de expresión de LAG3 se reducen en al menos el 20%, en relación con células T de control. Por ejemplo, los niveles de expresión de LAG3 pueden reducirse en al menos el 25%, al menos el
15 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80% o al menos el 90%, en relación con células T de control. En algunas realizaciones, los niveles de expresión de LAG3 se
20 reducen en el 20%-100%, 20%-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, o 50%-60%, en relación con células T de control. En algunas realizaciones, se
25 determina el agotamiento reducido midiendo la expresión de superficie disminuida de marcadores de agotamiento, incluyendo TIGIT, PD-1, LAG-3 o combinaciones de los mismos. Los expertos en la técnica conocen métodos para medir la expresión de superficie y se describen en la presente.

30 En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan una

viabilidad celular aumentada en relación con células de control. En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan un aumento de al menos el 20% en la viabilidad celular, en
5 relación con células de control. Por ejemplo, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación pueden presentar al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el
10 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80% o al menos el 90% de aumento en la viabilidad celular, en relación con células de control. En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan un aumento del 20%-100%, 20%-90%, 20%-
15 80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, o 50%-60% en la viabilidad celular, en relación con células de control. Los expertos en la técnica conocen métodos de
20 medición de la viabilidad celular y se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan una capacidad de lisis celular aumentada en relación con células
25 de control. En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan un aumento de al menos el 20% en la capacidad de lisis celular (destruyen al menos el 20% más de células diana), en relación con células de control. Por ejemplo, células T
30 modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación pueden presentar un aumento de al menos el 25%,

al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80% o al menos el 90% en la capacidad de lisis celular, en relación con células de control. En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan un aumento del 20%-100%, 20%-90%, 20%-80%, 20%-70%, 20%-60%, 20%-50%, 30%-100%, 30%-90%, 30%-80%, 30%-70%, 30%-60%, 30%-50%, 40%-100%, 40%-90%, 40%-80%, 40%-70%, 40%-60%, 40%-50%, 50%-100%, 50%-90%, 50%-80%, 50%-70%, o 50%-60% en la capacidad de lisis celular, en relación con células de control.

En algunas realizaciones, células T modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación presentan una secreción de citocinas aumentada en relación con células de control. Por ejemplo, en algunas realizaciones el nivel de citocinas (por ejemplo, IL-2 y/o IFN-gamma) secretadas por las células T modificadas por ingeniería genética es al menos 2 veces (por ejemplo, al menos 3 veces, al menos 4 veces o al menos 5 veces) mayor que el nivel de citocinas secretadas por células T de control.

Las células T de control, en algunas realizaciones, son células T modificadas por ingeniería genética (por ejemplo, células T sometidas a edición génica) que expresan proteína CD70 endógena (CD70 normalmente expresado por células T). En algunas realizaciones, las células T de control son células T modificadas por ingeniería genética que expresan proteína CD70 endógena y comprenden un gen *TRAC* alterado mediante la inserción de un ácido nucleico que codifica para un CAR (por ejemplo, un CAR anti-CD70 o CAR anti-BCMA), un gen $\beta 2M$ alterado, un gen *PD-1* alterado o cualquier combinación de

los genes alterados anteriores. En algunas realizaciones, las células T de control son células T no editadas.

Sorprendentemente, las células CAR T sometidas a múltiples ediciones génicas de la presente divulgación (por ejemplo, células TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) mantienen la citotoxicidad (capacidad para destruir células cancerosas), después de múltiples exposiciones (también denominadas reexposición/reexposiciones) con células cancerosas. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de al menos 1 reexposición con una célula diana, en donde la célula diana expresa un antígeno reconocido por las células CAR T. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de al menos 2 reexposiciones con una célula diana, en donde la célula diana expresa un antígeno reconocido por las células CAR T. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de al menos 1 reexposición con una célula cancerosa. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de al menos 2 reexposiciones con una célula cancerosa. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 reexposiciones con una célula diana, en donde la célula diana expresa un antígeno reconocido por las células CAR T. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 reexposiciones con una célula diana, en donde la célula diana expresa un antígeno reconocido por las células CAR T. En

algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 reexposiciones con una célula cancerosa. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de 10 o más reexposiciones con una célula diana, en donde la célula diana expresa un antígeno reconocido por las células CAR T. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de 10 o más reexposiciones con una célula cancerosa. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética expresan un CAR específico para CD70 y la célula diana (por ejemplo, célula cancerosa) expresa CD70. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética expresan un CAR específico para CD19 y la célula diana (por ejemplo, célula cancerosa) expresa CD19. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética expresan un CAR específico para CD33 y la célula diana (por ejemplo, célula cancerosa) expresa CD33. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética expresan un CAR específico para BCMA y la célula diana (por ejemplo, célula cancerosa) expresa BCMA.

Métodos de edición génica

La edición génica (incluyendo edición genómica) es un tipo de ingeniería genética en la que se inserta(n), deletiona(n) y/o sustituye(n) nucleótido(s)/ácido(s) nucleico(s) en una secuencia de ADN, tal como en el genoma de una célula seleccionada como diana. La edición génica dirigida permite la inserción, delección y/o sustitución en sitios preseleccionados en el genoma de una célula

seleccionada como diana (por ejemplo, en un gen seleccionado como diana o ADN seleccionado como diana). Cuando se edita una secuencia de un gen endógeno, por ejemplo mediante delección, inserción o sustitución de nucleótido(s)/ácido(s) nucleico(s), el gen endógeno que comprende la secuencia afectada puede desactivarse o inactivarse debido a la alteración de la secuencia. Por tanto, puede usarse la edición dirigida para alterar la expresión génica endógena. "Integración dirigida" se refiere a un procedimiento que implica la inserción de una o más secuencias exógenas, con o sin delección de una secuencia endógena en el sitio de inserción. La integración dirigida puede resultar de la edición génica dirigida cuando está presente un molde donador que contiene una secuencia exógena. Tal como se usa en el presente documento, un "gen alterado" se refiere a un gen que comprende una inserción, delección o sustitución en relación con un gen endógeno de manera que la expresión de una proteína funcional a partir del gen endógeno se reduce o se inhibe. Tal como se usa en la presente, "alterar un gen" se refiere a un método de inserción, delección o sustitución de al menos un nucleótido/ácido nucleico en un gen endógeno de manera que la expresión de una proteína funcional a partir del gen endógeno se reduce o se inhibe. Los expertos en la técnica conocen métodos de alteración de un gen y se describen en la presente.

Puede lograrse una edición dirigida o bien a través de un enfoque independiente de nucleasa o bien a través de un enfoque dependiente de nucleasa. En el enfoque de edición dirigida independiente de nucleasa, la recombinación homóloga está guiada por secuencias homólogas que flanquean un polinucleótido exógeno que va a introducirse en una

secuencia endógena a través de la maquinaria enzimática de la célula huésped. El polinucleótido exógeno puede introducir deleciones, inserciones o reemplazos de nucleótidos en la secuencia endógena.

5 Alternativamente, el enfoque dependiente de nucleasa puede lograr la edición dirigida con mayor frecuencia a través de la introducción específica de roturas bicatenarias (DSB) mediante nucleasas de corte raro específicas (por ejemplo, endonucleasas). Tal edición dirigida dependiente de
10 nucleasa también utiliza mecanismos de reparación del ADN, por ejemplo, unión de extremos no homólogos (NHEJ), que se produce en respuesta a DSB. La reparación del ADN mediante NHEJ conduce a menudo a inserciones o deleciones al azar (indels) de un pequeño número de nucleótidos endógenos. En
15 contraposición a la reparación mediada por NHEJ, la reparación también puede producirse mediante una reparación dirigida por homología (HDR). Cuando está presente un molde donador que contiene material genético exógeno flanqueado por un par de brazos de homología, el material genético
20 exógeno puede introducirse en el genoma mediante HDR, lo que da como resultado la integración dirigida del material genético exógeno.

Las endonucleasas disponibles capaces de introducir DSB específicas y dirigidas incluyen, pero no se limitan a,
25 nucleasas de dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) y CRISPR-nucleasa Cas9 guiada por ARN (CRISPR/Cas9; repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas y agrupadas regularmente asociadas
9). Adicionalmente, puede usarse también el sistema DICE
30 (intercambio de casetes por integrasa doble) que utiliza las integrasas phiC31 y Bxb1 para la integración dirigida.

Las ZFN son nucleasas dirigidas que comprenden una nucleasa fusionada a un dominio de unión a ADN de dedos de zinc (ZFBD), que es un dominio polipeptídico que se une al ADN de una manera específica de secuencia a través de uno o
5 más dedos de zinc. Un dedo de zinc es un dominio de aproximadamente 30 aminoácidos dentro del dominio de unión de dedos de zinc cuya estructura se estabiliza mediante la coordinación de un ión de zinc. Los ejemplos de dedos de zinc incluyen, pero no se limitan a, dedos de zinc C2H2,
10 dedos de zinc C3H y dedos de zinc C4. Un dominio de dedos de zinc diseñado es un dominio que no se produce en la naturaleza cuyo diseño/composición resulta principalmente de criterios racionales, por ejemplo, aplicación de reglas de sustitución y algoritmos computarizados para procesar
15 información en una base de datos que almacena información de diseños de ZFP existentes y datos de unión. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6,140,081; 6,453,242; y 6,534,261; véanse también los documentos WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 y WO
20 03/016496. Un dominio de dedo de zinc seleccionado es un dominio que no se encuentra en la naturaleza cuya producción resulta principalmente de un proceso empírico tal como presentación en fagos, trampa de interacción o selección de híbridos. Los ZFN se describen en mayor detalle en la patente estadounidense n.º 7,888,121 y la patente estadounidense n.º
25 7,972,854. El ejemplo más reconocido de ZFN es una fusión de la nucleasa FokI con un dominio de unión a ADN de dedos de zinc.

Una TALEN es una nucleasa dirigida que comprende una
30 nucleasa fusionada a un dominio de unión a ADN de efector TAL. Un "dominio de unión a ADN de tipo activador de la

transcripción", "dominio de unión a ADN de efector TAL" o "dominio de unión a ADN de TALE" es un dominio polipeptídico de proteínas efectoras TAL que es responsable de la unión de la proteína efectora TAL al ADN. Las proteínas efectoras TAL se secretan por patógenos vegetales de género *Xanthomonas* durante la infección. Estas proteínas entran en el núcleo de la célula vegetal, se unen a secuencias de ADN específicas del efector por medio de su dominio de unión a ADN y activan la transcripción génica en estas secuencias a través de sus dominios de transactivación. La especificidad del dominio de unión a ADN del efector de TAL depende de un número variable de efector de repeticiones imperfectas de 34 aminoácidos, que comprenden polimorfismos en posiciones de repetición seleccionadas denominadas dirresiduos variables de repetición (RVD). Las TALEN se describen en mayor detalle en la solicitud de patente estadounidense n.º 2011/0145940. El ejemplo más reconocido de una TALEN en la técnica es un polipéptido de fusión de la nucleasa FokI a un dominio de unión a ADN de efector TAL.

Los ejemplos adicionales de nucleasas dirigidas adecuadas para su uso tal como se proporcionan en la presente incluyen, pero no se limitan a, Bxb1, phiC31, R4, PhiBT1 y Wβ/SPBc/TP901-1, ya se usen individualmente o en combinación.

Otros ejemplos no limitativos de nucleasas dirigidas incluyen nucleasas recombinantes y que se producen de manera natural, por ejemplo, CRISPR/Cas9, endonucleasas de restricción, meganucleasas, endonucleasas de asentamiento y similares.

Edición génica por CRISPR-Cas9

El sistema de CRISPR-Cas9 es un mecanismo de defensa que se produce de manera natural en procariotas que se ha readaptado como plataforma de selección como diana de ADN guiada por ARN usada para la edición génica. Se basa en la nucleasa de ADN Cas9, y dos ARN no codificantes, ARNcrispr (ARNcr) y ARN de transactivación (ARNtracr), para seleccionar como diana la escisión del ADN. CRISPR es una abreviatura de Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas y agrupadas regularmente), una familia de secuencias de ADN que se encuentran en los genomas de bacterias y arqueas que contienen fragmentos de ADN (ADN espaciador) con similitud con ADN foráneo previamente expuesto a la célula, mediante virus que han infectado o atacado al procariota. Estos fragmentos de ADN los usa el procariota para detectar y destruir ADN foráneo similar tras su reintroducción, por ejemplo, a partir de virus similares durante ataques posteriores. La transcripción del locus de CRISPR da como resultado la formación de una molécula de ARN que comprende la secuencia espaciadora, que se asocia con y se dirige a proteínas Cas (asociadas a CRISPR) capaces de reconocer y cortar el ADN exógeno foráneo. Se han descrito numerosos tipos y clases de sistemas de CRISPR/Cas (véase, por ejemplo, Koonin et al., (2017) Curr Opin Microbiol 37: 67-78).

El ARNcr dirige el reconocimiento de la secuencia y la especificidad del complejo de CRISPR-Cas9 a través de apareamiento de bases de Watson-Crick normalmente con una secuencia de 20 nucleótidos (nt) en el ADN diana. El cambio de la secuencia de los 20 nt en 5' en el ARNcr permite el direccionamiento del complejo de CRISPR-Cas9 a locus

específicos. El complejo de CRISPR-Cas9 se une solo a secuencias de ADN que contienen una coincidencia de secuencia con los primeros 20 nt del ARNcr, ARN guía individual (ARNsg), si la secuencia diana va seguida por un motivo de ADN corto específico (con la secuencia NGG) denominado motivo
5 adyacente de protoespaciador (PAM).

El ARNtracr se hibrida con el extremo 3' del ARNcr para formar una estructura de dúplex de ARN a la que se une la endonucleasa Cas9 para formar el complejo de CRISPR-Cas9
10 catalíticamente activo, que entonces puede escindir el ADN diana.

Una vez que el complejo de CRISPR-Cas9 se une a ADN en un sitio diana, dos dominios nucleasa independientes dentro de la enzima Cas9 escinden cada uno una de las hebras de ADN
15 en el sentido de 5' del sitio de PAM, dejando una rotura bicatenaria (DSB) donde ambas hebras del ADN terminan en un par de bases (un extremo romo).

Tras la unión del complejo de CRISPR-Cas9 a ADN en un sitio diana específico y la formación de la DSB específica
20 de sitio, la siguiente etapa clave es la reparación de la DSB. Las células usan dos rutas de reparación del ADN principales para reparar la DSB: unión de extremos no homólogos (NHEJ) y reparación dirigida por homología (HDR).

NHEJ es un mecanismo de reparación robusto que parece
25 ser altamente activo en la mayoría de los tipos de células, incluyendo células que no se dividen. NHEJ es propensa a errores y a menudo puede dar como resultado la eliminación o adición de entre uno y varios cientos de nucleótidos en el sitio de la DSB, aunque tales modificaciones son normalmente
30 de < 20 nt. Las inserciones y deleciones (indels) resultantes pueden alterar regiones codificantes o no codificantes de

genes. Alternativamente, HDR usa un tramo largo de ADN donador homólogo, proporcionado de manera endógena o exógena, para reparar la DSB con alta fidelidad. HDR es activa en células que se dividen, y se produce a una frecuencia relativamente baja en la mayoría de los tipos de células. En muchas realizaciones de la presente divulgación, se utiliza NHEJ como operante de reparación.

En algunas realizaciones, la endonucleasa Cas9 (proteína 9 asociada a CRISPR) es de *Streptococcus pyogenes*, aunque pueden usarse también otros homólogos de Cas9. Debe entenderse que puede usarse Cas9 de tipo natural o versiones modificadas de Cas9 (por ejemplo, versiones evolucionadas de Cas9, u ortólogos o variantes de Cas9), tal como se proporciona en la presente. En algunas realizaciones, puede sustituirse Cas9 por otra endonucleasa guiada por ARN, tal como Cpf1 (de un sistema de CRISPR/Cas de clase II).

En algunas realizaciones, el sistema de CRISPR/Cas comprende componentes derivados de un sistema de tipo I, tipo II o tipo III. Esquemas de clasificación actualizados para locus de CRISPR/Cas definen sistemas de CRISPR/Cas de clase 1 y clase 2, que tienen los tipos I a V o VI (Makarova et al., (2015) Nat Rev Microbiol, 13(11):722-36; Shmakov et al., (2015) Mol Cell, 60:385-397). Los sistemas de CRISPR/Cas de clase 2 tienen efectores proteicos individuales. Las proteínas Cas de tipos II, V y VI son endonucleasas guiadas por ARN, de una sola proteína, denominadas en la presente "nucleasas Cas de clase 2." Las nucleasas Cas de clase 2 incluyen, por ejemplo, proteínas Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 y C2c3. La nucleasa Cpf1 (Zetsche et al., (2015) Cell 163:1-13) es homóloga a Cas9, y contiene un dominio de nucleasa similar a RuvC.

En algunas realizaciones, la nucleasa Cas es de un sistema de CRISPR/Cas de tipo II (por ejemplo, una proteína Cas9 de un sistema de CRISPR/Cas9). En algunas realizaciones, la nucleasa Cas es de un sistema de CRISPR/Cas de clase 2 (una nucleasa Cas de una sola proteína tal como una proteína Cas9 o una proteína Cpf1). La familia de proteínas Cas9 y Cpf1 son enzimas con actividad de endonucleasa de ADN, y pueden dirigirse para escindir una diana de ácido nucleico deseada diseñando un ARN guía apropiado, tal como se describe en la presente adicionalmente.

En algunas realizaciones, una nucleasa Cas puede comprender más de un dominio de nucleasa. Por ejemplo, una nucleasa Cas9 puede comprender al menos un dominio de nucleasa similar a RuvC (por ejemplo Cpf1) y al menos un dominio de nucleasa similar a HNH (por ejemplo Cas9). En algunas realizaciones, la nucleasa Cas9 introduce una DSB en la secuencia diana. En algunas realizaciones, la nucleasa Cas9 se modifica para contener solo un dominio de nucleasa funcional. Por ejemplo, la nucleasa Cas9 se modifica de manera que uno de los dominios de nucleasa se muta o se deleta completa o parcialmente para reducir su actividad de escisión de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la nucleasa Cas9 se modifica para que no contenga dominio de nucleasa similar a RuvC funcional. En otras realizaciones, la nucleasa Cas9 se modifica para que no contenga dominio de nucleasa similar a HNH funcional. En algunas realizaciones en las que solo uno de los dominios de nucleasa es funcional, la nucleasa Cas9 es una nickasa que es capaz de introducir una rotura monocatenaria (una "mella") en la secuencia diana. En algunas realizaciones, se sustituye un aminoácido conservado dentro de un dominio de nucleasa de nucleasa Cas9

para reducir o alterar la actividad nucleasa. En algunas realizaciones, la nickasa de nucleasa Cas comprende una sustitución de aminoácido en el dominio de nucleasa similar a RuvC. Las sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo en el dominio de nucleasa similar a RuvC incluyen D10A (basándose en la nucleasa Cas9 de *S. pyogenes*). En algunas realizaciones, la nickasa comprende una sustitución de aminoácido en el dominio de nucleasa similar a HNH. Las sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo en el dominio de nucleasa similar a HNH incluyen E762A, H840A, N863A, H983A y D986A (basándose en la nucleasa Cas9 de *S. pyogenes*).

En algunas realizaciones, la nucleasa Cas es de un sistema de CRISPR/Cas de tipo I. En algunas realizaciones, la nucleasa Cas es un componente del complejo Cascade de un sistema de CRISPR/Cas de tipo I. Por ejemplo, la nucleasa Cas es una nucleasa Cas3. En algunas realizaciones, la nucleasa Cas se deriva de un sistema de CRISPR/Cas de tipo III. En algunas realizaciones, la nucleasa Cas se deriva de un sistema de CRISPR/Cas de tipo IV. En algunas realizaciones, la nucleasa Cas se deriva de un sistema de CRISPR/Cas de tipo V. En algunas realizaciones, la nucleasa Cas se deriva de un sistema de CRISPR/Cas de tipo VI.

ARN guía

La presente divulgación proporciona un ácido nucleico de direccionamiento a genoma que puede dirigir las actividades de un polipéptido asociado (por ejemplo, un polipéptido de sitio dirigido) a una secuencia diana específica en un ácido nucleico diana. El ácido nucleico de direccionamiento a genoma puede ser un ARN. Un ARN que selecciona como diana el genoma se denomina "ARN guía" o "ARNg" en el presente documento. Un ARN guía comprende al

menos una secuencia espaciadora que hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana de interés y una secuencia de repetición de CRISPR. En los sistemas de tipo II, el ARNg también comprende un segundo ARN que se denomina la secuencia de ARNtracr. En el ARNg de tipo II, la secuencia de repetición de CRISPR y la secuencia de ARNtracr se hibridan entre sí para formar un dúplex. En el ARNg de tipo V, el ARNcr forma un dúplex. En ambos sistemas, el dúplex se une a un polipéptido de sitio dirigido, de tal forma que el ARN guía y el polipéptido de sitio dirigido forman un complejo. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de direccionamiento a genoma proporciona especificidad de diana al complejo gracias a su asociación con el polipéptido de sitio dirigido. El ácido nucleico de direccionamiento a genoma dirige por tanto la actividad del polipéptido de sitio dirigido.

Como entenderá una persona normalmente experta en la materia, cada ARN guía se diseña para incluir una secuencia espaciadora complementaria a su secuencia diana genómica. Véanse Jinek *et al.*, *Science*, 337, 816-821 (2012) y Deltcheva *et al.*, *Nature*, 471, 602-607 (2011).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico que selecciona como diana el genoma (por ejemplo, ARNg) es un ARN guía de molécula doble. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que selecciona como diana el genoma (por ejemplo, ARNg) es un ARN guía de molécula individual.

Un ARN guía de molécula doble comprende dos hebras de ARN. La primera hebra comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de extensión de espaciador opcional, una secuencia espaciadora y una secuencia de repetición de CRISPR mínima. La segunda hebra comprende una secuencia de ARNtracr

mínima (complementaria a la secuencia de repetición de CRISPR mínima), una secuencia de ARNtracr 3' y una secuencia de extensión de ARNtracr opcional.

Un ARN guía de molécula individual (denominado ARNsg) en un sistema de tipo II comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de extensión de espaciador opcional, una secuencia espaciadora, una secuencia de repetición de CRISPR mínima, un ligador de guía de molécula individual, una secuencia de ARNtracr mínima, una secuencia de ARNtracr 3' y una secuencia de extensión de ARNtracr opcional. La extensión de ARNtracr opcional puede comprender elementos que aportan una funcionalidad adicional (por ejemplo, estabilidad) al ARN guía. El ligador de guía de molécula individual enlaza la repetición de CRISPR mínima y la secuencia de ARNtracr mínima para formar una estructura en horquilla. La extensión de ARNtracr opcional comprende una o más horquillas.

Un ARN guía de molécula individual en un sistema de tipo V comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de repetición de CRISPR mínima y una secuencia espaciadora.

En algunas realizaciones, el ARNsg comprende un espaciador de 20 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia de ARNsg. En algunas realizaciones, el ARNsg comprende una secuencia espaciadora de menos de 20 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia de ARNsg. En algunas realizaciones, el ARNsg comprende una secuencia espaciadora de más de 20 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia de ARNsg. En algunas realizaciones, el ARNsg comprende una secuencia espaciadora de longitud variable con 17-30 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia de ARNsg (véase la **Tabla 3**).

En algunas realizaciones, el ARNsg no comprende uracilo en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. En algunas realizaciones, el ARNsg comprende uno o más uracilos en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. Por ejemplo, el ARNsg puede comprender 1 uracilo (U) en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. El ARNsg puede comprender 2 uracilos (UU) en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. El ARNsg puede comprender 3 uracilos (UUU) en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. El ARNsg puede comprender 4 uracilos (UUUU) en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. El ARNsg puede comprender 5 uracilos (UUUUU) en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. El ARNsg puede comprender 6 uracilos (UUUUUU) en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. El ARNsg puede comprender 7 uracilos (UUUUUUU) en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. El ARNsg puede comprender 8 uracilos (UUUUUUUU) en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg.

El ARNsg puede estar sin modificar o modificado. Por ejemplo, los ARNsg modificados pueden comprender uno o más nucleótidos de 2'-O-metilfosforotioato.

Tabla 3.

SEQ ID NO.	Secuencia de ARNsg
15	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuagagcuagaaauagcaagu uaaaauaaggcuaguccguaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugcuuuu
16	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuagagcuagaaauagcaagu uaaaauaaggcuaguccguaucaacuugaaaaaguggcaccga gucggugc
17	n ₍₁₇₋ 30)guuuuagagcuagaaauagcaaguaaaauaaggcuaguccg uuaucaacuugaaa aaguggcaccgagucggugcu ₍₁₋₈₎

A modo ilustrativo, los ARN guía usados en el sistema de CRISPR/Cas/Cpf1 u otros ARN más pequeños pueden sintetizarse fácilmente por medios químicos, como se ilustra más adelante y se describe en la técnica. Aunque los procedimientos de química sintética se encuentran en continua expansión, la purificación de dichos ARN mediante procedimientos como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, que evita el uso de geles, tales como PAGE) tiende a ser más compleja debido a que la longitud de los polinucleótidos aumenta significativamente más allá de aproximadamente cien nucleótidos. Una estrategia usada para generar ARN de mayor longitud es producir dos o más moléculas que se ligan entre sí. Los ARN mucho más largos, tales como aquellos que codifican una endonucleasa Cas9 o Cpf1, se generan enzimáticamente más fácilmente. Pueden introducirse diversos tipos de modificaciones de ARN durante o después de la síntesis química y/o la generación enzimática de los ARN, por ejemplo, modificaciones que potencian la estabilidad, reducen la probabilidad o el grado de la respuesta inmunitaria innata y/o potencian otros atributos, como se describe en la técnica.

En algunas realizaciones, la frecuencia de indels (frecuencia de edición) puede determinarse usando un análisis de TIDE, que puede usarse para identificar moléculas de ARNg altamente eficaces. En algunas realizaciones, un ARNg altamente eficaz produce una frecuencia de edición génica superior al 80%. Por ejemplo, se considera que un ARNg es altamente eficaz si produce una frecuencia de edición génica de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95% o el 100%.

En algunas realizaciones, puede producirse una alteración génica mediante delección de una secuencia genómica usando dos ARN guía. Se conocen métodos de uso de la tecnología de edición génica por CRISPR-Cas para crear una delección genómica en una célula (por ejemplo, para desactivar un gen en una célula) (Bauer DE et al. *Vis. Exp.* 2015;95;e52118).

Secuencia espaciadora

En algunas realizaciones, un ARNg comprende una secuencia espaciadora. Una secuencia espaciadora es una secuencia (por ejemplo, una secuencia de 20 nucleótidos) que define la secuencia diana (por ejemplo, una secuencia diana de ADN, tal como una secuencia diana genómica) de un ácido nucleico diana de interés. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora es de 15 a 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la secuencia espaciadora es de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, una secuencia espaciadora es de 20 nucleótidos.

La "secuencia diana" es adyacente a una secuencia de PAM y es la secuencia modificada por una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, Cas9). El "ácido nucleico diana" es una molécula bicatenaria: una hebra comprende la secuencia diana y se denomina la "hebra de PAM" y la otra hebra complementaria se denomina la "hebra no de PAM". Un experto en la materia reconocerá que la secuencia espaciadora de ARNg se hibrida con el complemento inverso de la secuencia diana, que está ubicado en la hebra no de PAM del ácido nucleico diana de interés. Por lo tanto, la secuencia espaciadora de ARNg es el equivalente en ARN de la secuencia diana. Por ejemplo, si la secuencia diana es 5'-

AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 86), entonces la
secuencia espaciadora de ARNg es 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3'
(SEQ ID NO: 98). El espaciador de un ARNg interactúa con un
ácido nucleico diana de interés de un modo específico de
5 secuencia mediante hibridación (es decir, emparejamiento de
bases). La secuencia de nucleótidos del espaciador varía por
tanto dependiendo de la secuencia diana del ácido nucleico
diana de interés.

En un sistema de CRISPR/Cas del presente documento, la
10 secuencia espaciadora se diseña para hibridar con una región
del ácido nucleico diana que está ubicada en 5' de un PAM de
la enzima Cas9 usada en el sistema. El espaciador puede
emparejarse perfectamente con la secuencia diana o puede
tener emparejamientos erróneos. Cada enzima Cas9 tiene una
15 secuencia de PAM particular que reconoce en un ADN diana.
Por ejemplo, *S. pyogenes* reconoce en un ácido nucleico diana
un PAM que comprende la secuencia 5'-NRG-3', donde R
comprende o A o G, donde N es cualquier nucleótido y N se
encuentra inmediatamente 3' de la secuencia de ácido nucleico
20 diana usada como diana por la secuencia espaciadora.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácido
nucleico diana comprende 20 nucleótidos. En algunas
realizaciones, el ácido nucleico diana comprende menos de 20
nucleótidos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico
25 diana comprende más de 20 nucleótidos. En algunas
realizaciones, el ácido nucleico diana comprende al menos:
5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 o más
nucleótidos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico
diana comprende como máximo: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20,
30 21, 22, 23, 24, 25, 30 o más nucleótidos. En algunas
realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana

comprende 20 bases inmediatamente en 5' del primer nucleótido del PAM. Por ejemplo, en una secuencia que comprende 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3', el ácido nucleico diana comprende la secuencia que corresponde a los N, en donde N es cualquier nucleótido y la secuencia NRG subrayada es el PAM de *S. pyogenes*.

Se proporcionan ejemplos no limitativos de ARNg que pueden usarse tal como se proporcionan en la presente en el documento PCT/IB2018/001619, presentado el 11 de mayo de 2018, incorporado en la presente mediante esta referencia.

Métodos de preparación de ARNg

Los ARNg de la presente divulgación se producen mediante un medio adecuado disponible en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a transcripción *in vitro* (IVT), métodos de síntesis química y/o sintéticos, o una combinación de los mismos. Se utilizan métodos enzimáticos (IVT), en fase sólida, en fase líquida, métodos sintéticos combinados, síntesis de regiones pequeñas y métodos de ligación. En una realización, los ARNg se preparan usando métodos de síntesis enzimática por IVT. Se conocen en la técnica métodos de preparación de polinucleótidos mediante IVT y se describen en la solicitud internacional PCT/US2013/30062. Por consiguiente, la presente divulgación también incluye polinucleótidos, por ejemplo, se usan ADN, constructos y vectores para transcribir *in vitro* un ARNg descrito en la presente.

En algunas realizaciones, se introducen nucleobases modificadas no naturales en los polinucleótidos, por ejemplo, ARNg, durante la síntesis o después de la síntesis. En ciertas realizaciones, las modificaciones son en uniones internucleosídicas, bases de purina o pirimidina, o azúcar.

En algunas realizaciones, se introduce una modificación en el terminal de un polinucleótido; con síntesis química o con una enzima polimerasa. Se dan a conocer ejemplos de ácidos nucleicos modificados y su síntesis en la solicitud PCT n.º PCT/US2012/058519. También se describe la síntesis de polinucleótidos modificados en Verma y Eckstein, Annual Review of Biochemistry, vol. 76, 99-134 (1998).

En algunas realizaciones, se usan métodos de ligación enzimáticos o químicos para conjugar polinucleótidos o sus regiones con diferentes restos funcionales, tales como agentes de direccionamiento o suministro, marcadores fluorescentes, líquidos, nanopartículas, etc. Se revisan conjugados de polinucleótidos y polinucleótidos modificados se revisan en Goodchild, Bioconjugate. Chemistry, vol. 1 (3), 165-187 (1990).

Ciertas realizaciones de la invención también proporcionan ácidos nucleicos, por ejemplo, vectores, que codifican para los ARNg descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es una molécula de ADN. En otras realizaciones, el ácido nucleico es una molécula de ARN. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un ARNcr. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica par el el ARNcr comprende un espaciador flanqueado por la totalidad o una porción de una secuencia de repetición de un sistema de CRISPR/Cas que se produce de manera natural. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un ARNtracr. En algunas realizaciones, el ARNcr y el ARNtracr están codificados por dos ácidos nucleicos separados. En otras realizaciones, el ARNcr y el ARNtracr están codificados

por un único ácido nucleico. En algunas realizaciones, el ARNcr y el ARNtracr están codificados por hebras opuestas de un único ácido nucleico. En otras realizaciones, el ARNcr y el ARNtracr están codificados por la misma hebra de un único
5 ácido nucleico.

En algunas realizaciones, los ARNg proporcionados por la divulgación se sintetizan químicamente por cualquier medio descrito en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO/2005/01248). Aunque los procedimientos de
10 química sintética se encuentran en continua expansión, la purificación de dichos ARN mediante procedimientos como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, que evita el uso de geles, tales como PAGE) tiende a ser más compleja debido a que la longitud de los polinucleótidos aumenta
15 significativamente más allá de aproximadamente cien nucleótidos. Una estrategia usada para generar ARN de mayor longitud es producir dos o más moléculas que se ligan entre sí.

En algunas realizaciones, los ARNg proporcionados por la divulgación se sintetizan por métodos enzimáticos (por
20 ejemplo, transcripción in vitro, IVT).

Pueden introducirse diversos tipos de modificaciones de ARN durante o después de la síntesis química y/o la generación enzimática de los ARN, por ejemplo,
25 modificaciones que potencian la estabilidad, reducen la probabilidad o el grado de la respuesta inmunitaria innata y/o potencian otros atributos, como se describe en la técnica.

En ciertas realizaciones, puede usarse más de un ARN guía con un sistema de CRISPR/nucleasa Cas. Cada ARN guía
30 puede contener una secuencia de direccionamiento diferente,

de modo que el sistema de CRISPR/Cas escinde más de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, uno o más ARN guía pueden tener propiedades iguales o diferentes tales como actividad o estabilidad dentro del complejo de Cas9 RNP.

5 Cuando se usa más de un ARN guía, cada ARN guía puede codificarse en el mismo vector o en diferentes vectores. Los promotores utilizados para dirigir la expresión de más de un ARN guía son iguales o diferentes.

El ARN guía puede dirigirse a cualquier secuencia de

10 interés por medio de la secuencia de direccionamiento (por ejemplo, secuencia espaciadora) del ARNcr. En algunas realizaciones, el grado de complementariedad entre la secuencia de direccionamiento del ARN guía y la secuencia diana en la molécula de ácido nucleico diana es de

15 aproximadamente el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100%. En algunas realizaciones, la secuencia de direccionamiento del ARN guía y la secuencia diana en la molécula de ácido nucleico diana son complementarias al 100%. En otras

20 realizaciones, la secuencia de direccionamiento del ARN guía y la secuencia diana en la molécula de ácido nucleico diana pueden contener al menos un apareamiento erróneo. Por ejemplo, la secuencia de direccionamiento del ARN guía y la secuencia diana en la molécula de ácido nucleico diana pueden

25 contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 apareamientos erróneos. En algunas realizaciones, la secuencia de direccionamiento del ARN guía y la secuencia diana en la molécula de ácido nucleico diana pueden contener 1-6 apareamientos erróneos. En algunas realizaciones, la

30 secuencia de direccionamiento del ARN guía y la secuencia

diana en la molécula de ácido nucleico diana pueden contener 5 o 6 apareamientos erróneos.

La longitud de la secuencia de direccionamiento puede depender del sistema de CRISPR/Cas9 y los componentes usados. Por ejemplo, diferentes proteínas Cas9 de diferentes especies bacterianas tienen longitudes de secuencia de direccionamiento óptimas variables. Por consiguiente, la secuencia de direccionamiento puede comprender 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, o más de 50 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de dirección puede comprender 18-24 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de dirección puede comprender 19-21 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de direccionamiento puede comprender 20 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, un sistema de CRISPR/nucleasa Cas incluye al menos un ARN guía. En algunas realizaciones, el ARN guía y la proteína Cas pueden formar una ribonucleoproteína (RNP), por ejemplo, un complejo de CRISPR/Cas. El ARN guía puede guiar a la proteína Cas hasta una secuencia diana en una molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, una molécula de ADN genómico), donde la proteína Cas escinde el ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el complejo de CRISPR/Cas es un complejo de Cpf1/ARN guía. En algunas realizaciones, el complejo de CRISPR es un complejo de CRISPR/Cas9 de tipo II. En algunas realizaciones, la proteína Cas es una proteína Cas9. En algunas realizaciones, el complejo de CRISPR/Cas9 es un complejo de Cas9/ARN guía.

Suministro de ARN guía y nucleasa

En algunas realizaciones, se suministran un ARNg y una nucleasa guiada por ARN a una célula por separado, o bien de manera simultánea o bien secuencial. En algunas realizaciones, se suministran un ARNg y una nucleasa guiada por ARN a una célula juntos. En algunas realizaciones, un ARNg y una nucleasa guiada por ARN se complejan previamente entre sí para formar una ribonucleoproteína (RNP).

Las RNP son útiles para la edición génica, al menos porque minimizan el riesgo de interacciones promiscuas en un entorno celular rico en ácido nucleico y protegen el ARN de la degradación. Se conocen en la técnica métodos para formar RNP. En algunas realizaciones, una RNP que contiene una nucleasa guiada por ARN (por ejemplo, una nucleasa Cas, tal como una nucleasa Cas9) y un ARNg que selecciona como diana un gen de interés se suministran a una célula (por ejemplo: una célula T). En algunas realizaciones, se suministra una RNP a una célula T mediante electroporación.

Tal como se usa en el presente documento, una "RNP que selecciona como diana *TRAC*" se refiere a un ARNg que selecciona como diana el gen *TRAC* complejo previamente con una nucleasa guiada por ARN. Tal como se usa en el presente documento, una "RNP que selecciona como diana $\beta 2M$ " se refiere a un ARNg que selecciona como diana el gen $\beta 2M$ complejo previamente con una nucleasa guiada por ARN. Tal como se usa en el presente documento, una "RNP que selecciona como diana *CD70*" se refiere a un ARNg que selecciona como diana el gen *CD70* complejo previamente con una nucleasa guiada por ARN. Tal como se usa en el presente documento, una RNP "que selecciona como diana *PD-1*" se refiere a un ARNg que selecciona como diana el gen *PD-1* complejo previamente con una nucleasa guiada por ARN.

En algunas realizaciones, una RNP que selecciona como diana *TRAC* se suministra a una célula. En algunas realizaciones, una RNP que selecciona como diana $\beta 2M$ se suministra a una célula. En algunas realizaciones, una RNP
5 que selecciona como diana *CD70* se suministra a una célula. En algunas realizaciones, una RNP que selecciona como diana *PD-1* se suministra a una célula.

En algunas realizaciones, se suministra más de una RNP a una célula. En algunas realizaciones, se suministra más
10 de una RNP a una célula por separado. En algunas realizaciones, se suministra más de una RNP a una célula simultáneamente. En algunas realizaciones, se suministra al menos una de las siguientes RNP a una célula:

(i) una RNP que selecciona como diana *TRAC*;
15 (ii) una RNP que selecciona como diana $\beta 2M$;
(iii) una RNP que selecciona como diana *CD70*; o
(iv) una RNP que selecciona como diana *PD-1*. En algunas realizaciones, se suministran al menos dos de las siguientes RNP a una célula:

20 (i) una RNP que selecciona como diana *TRAC*;
(ii) una RNP que selecciona como diana $\beta 2M$;
(iii) una RNP que selecciona como diana *CD70*; o
(iv) una RNP que selecciona como diana *PD-1*.

En algunas realizaciones, una nucleasa guiada por ARN
25 se suministra a una célula en un vector de ADN que expresa la nucleasa guiada por ARN, un ARN que codifica para la nucleasa guiada por ARN o una proteína. En algunas realizaciones, un ARNg que selecciona como diana un gen se suministra a una célula como un vector de ARN o de ADN que
30 expresa el ARNg.

El suministro de una nucleasa guiada por ARN, ARNg y/o una RNP puede ser a través de inyección directa o transfección celular usando métodos conocidos, por ejemplo, electroporación o transfección química. Pueden usarse otros
5 métodos de transfección celular.

Células T con receptor de antígeno quimérico (CAR)

Un receptor de antígeno quimérico se refiere a un receptor de células inmunitarias artificial que se diseña por ingeniería genética para que reconozca y se una a un
10 antígeno expresado por células tumorales. En general, un CAR se diseña para una célula T y es una quimera de un dominio de señalización del complejo de receptor de células T (TCR) y un dominio de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, un fragmento monocatenario (scFv) de un anticuerpo u otro
15 fragmento de anticuerpo) (Enblad et al., Human Gene Therapy. 2015; 26(8):498-505). Una célula T que expresa un CAR se denomina célula CAR T. Los CAR tienen la capacidad de redirigir la especificidad y reactividad de las células T hacia una diana seleccionada de un modo no restringido al
20 MHC. El reconocimiento de antígeno no restringido al MHC proporciona a las células T que expresan los CAR la capacidad de reconocer un antígeno de manera independiente del procesamiento del antígeno, esquivando de este modo un mecanismo principal del escape tumoral. Además, cuando se
25 expresan en células T, los CAR ventajosamente no dimerizan con las cadenas alfa y beta endógenas del receptor de células T (TCR). Se hace referencia a menudo a los CAR mediante el antígeno al que se unen. Por ejemplo, un "CAR para CD19", un "CAR para CD70", un "CAR para CD33" y un "CAR para BCMA" son
30 CAR que comprenden dominios de unión a antígeno que se unen específicamente a CD19, CD70, CD33 o BCMA, respectivamente.

Por consiguiente, tales términos son intercambiables con CAR anti-CD19, CAR anti-CD70, CAR anti-CD33 y CAR anti-BCMA. Los expertos en la técnica entenderán que puede hacerse referencia a un CAR que se une específicamente a un antígeno con cualquier terminología.

Existen cuatro generaciones de CAR, cada una de las cuales contiene diferentes componentes. Los CAR de primera generación unen un scFv derivado de anticuerpo al dominio de señalización intracelular de CD3zeta (ζ o z) del receptor de células T a través de dominios bisagra y transmembrana. Los CAR de segunda generación incorporan un dominio adicional, por ejemplo, CD28, 4-1BB (41BB) o ICOS, para proporcionar una señal coestimuladora. Los CAR de tercera generación contienen dos dominios coestimuladores fusionados con la cadena CD3 ζ - ζ de TCR. Los dominios coestimuladores de tercera generación pueden incluir, por ejemplo, una combinación de CD3 ζ , CD27, CD28, 4-1BB, ICOS u OX40. Los CAR, en algunas realizaciones, contienen un ectodominio procedente normalmente de un fragmento variable monocatenario (scFv), una bisagra, un dominio transmembrana y un endodominio con uno (primera generación), dos (segunda generación) o tres (tercera generación) dominios de señalización procedentes de CD3Z y/o moléculas coestimuladoras (Maude et al., *Blood*. 2015; 125(26):4017-4023; Kakarla y Gottschalk, *Cancer J*. 2014; 20(2):151-155).

Los CAR normalmente difieren en sus propiedades funcionales. El dominio de señalización de CD3 ζ del receptor de células T, cuando está ocupado, activará e inducirá la proliferación de células T, pero puede ocasionar anergia (ausencia de reacción por los mecanismos de defensa del organismo, dando como resultado la inducción directa de

tolerancia de linfocitos periféricos). Los linfocitos se consideran anérgicos cuando no logran responder a un antígeno específico. La adición de un dominio coestimulador en los CAR de segunda generación mejoró la capacidad replicativa y la persistencia de células T modificadas. Se observan efectos antitumorales *in vitro* similares con CAR para CD28 o 4-1BB, pero estudios preclínicos *in vivo* sugieren que los CAR para 4-1BB pueden producir una proliferación y/o persistencia superiores. Los ensayos clínicos sugieren que estos dos CAR de segunda generación son capaces de inducir proliferación sustancial de células T *in vivo*, pero los CAR que contienen el dominio coestimulador de 4-1BB parecen persistir durante más tiempo. Los CAR de tercera generación combinan múltiples dominios de señalización (coestimuladores) para aumentar la potencia.

En algunas realizaciones, un receptor de antígeno quimérico es un CAR de primera generación. En otras realizaciones, un receptor de antígeno quimérico es un CAR de segunda generación. En otras realizaciones más, un receptor de antígeno quimérico es un CAR de tercera generación.

Un CAR, en algunas realizaciones, comprende un (ecto) dominio extracelular que comprende un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo, tal como un scFv), un dominio transmembrana y un (endo) dominio citoplasmático.

Ectodominio

El ectodominio es la región del CAR que está expuesta al fluido extracelular y, en algunas realizaciones, incluye un dominio de unión a antígeno y opcionalmente, un péptido de señal, un dominio espaciador y/o un dominio bisagra. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno es un

fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que incluye las VL y VH de inmunoglobulinas conectadas con un péptido ligador corto. En algunas realizaciones, el ligador incluye restos hidrófilos con tramos de glicina y serina para conferir flexibilidad, así como tramos de glutamato y lisina para conferir solubilidad adicional. Un fragmento variable monocatenario (scFv) no es realmente un fragmento de un anticuerpo, sino que es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de las inmunoglobulinas, conectadas con un péptido ligador corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. Normalmente, el ligador es rico en glicina para conferir flexibilidad, así como en serina o treonina para conferir solubilidad y puede conectar el extremo N-terminal de la VH con el extremo C-terminal de la VL, o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del ligador. En algunas realizaciones, el scFv de la presente divulgación está humanizado. En otras realizaciones, el scFv es completamente humano. En otras realizaciones más, el scFv es una quimera (por ejemplo, de secuencia de ratón y humana).

En algunas realizaciones, el scFv es un scFv anti-CD70 (se une específicamente a CD70). Los ejemplos no limitativos de proteínas scFv anti-CD70 que pueden usarse tal como se proporciona en el presente documento pueden incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 50.

En algunas realizaciones, el scFv es un scFv anti-BCMA (se une específicamente a BCMA). Los ejemplos no limitativos de proteínas scFv anti-BCMS que pueden usarse tal como se proporciona en el presente documento pueden incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

En algunas realizaciones, el scFv es un scFv anti-CD19 (se une específicamente a CD19). Los ejemplos no limitativos de proteínas scFv anti-CD19 que pueden usarse tal como se proporciona en el presente documento pueden incluir la
5 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151.

En algunas realizaciones, el scFv es un scFv anti-CD33 (se une específicamente a CD33). Los ejemplos no limitativos de proteínas scFv anti-CD33 que pueden usarse tal como se proporciona en el presente documento pueden incluir la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137.

Pueden usarse otras proteínas scFv.

El péptido de señal puede potenciar la especificidad antigénica de la unión del CAR. Los péptidos de señal pueden proceder de anticuerpos, tales como, pero sin limitación,
15 CD8, así como marcadores epitópicos, tales como, pero sin limitación, GST o FLAG. Los ejemplos de péptidos señal incluyen MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP (SEQ ID NO: 88) y MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO: 89). Pueden usarse otros péptidos señal.

En algunas realizaciones, se ubica un dominio espaciador o dominio bisagra entre un dominio extracelular (que comprende el dominio de unión a antígeno) y un dominio transmembrana de un CAR o entre un dominio citoplasmático y un dominio transmembrana del CAR. Un dominio espaciador es
25 cualquier oligopéptido o polipéptido que tiene la función de enlazar el dominio transmembrana al dominio extracelular y/o el dominio citoplasmático en la cadena de polipéptido. Un dominio bisagra es cualquier oligopéptido o polipéptido que tiene la función de proporcionar flexibilidad al CAR o
30 dominios del mismo o de prevenir el impedimento estérico del CAR o los dominios del mismo. En algunas realizaciones, un

dominio espaciador o dominio bisagra puede comprender hasta 300 aminoácidos (por ejemplo, de 10 a 100 aminoácidos o de 5 a 20 aminoácidos). En algunas realizaciones, pueden incluirse uno o más dominios espaciadores en otras regiones de un CAR. En algunas realizaciones, el dominio bisagra es un dominio bisagra de CD8. Pueden usarse otros dominios bisagra.

Dominio transmembrana

El dominio transmembrana es una alfa hélice hidrófoba que atraviesa la membrana. El dominio transmembrana proporciona estabilidad al CAR. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana de un CAR como se proporciona en el presente documento es un dominio transmembrana de CD8. En otras realizaciones, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana de CD28. En otras realizaciones más, el dominio transmembrana es una quimera de un dominio transmembrana de CD8 y de CD28. Pueden usarse otros dominios transmembrana como se proporciona en el presente documento. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana CD8a:

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG
AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR (SEQ ID NO: 90).

Pueden usarse otros dominios transmembrana.

En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es un dominio transmembrana CD8a que comprende la secuencia de aminoácidos: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY (SEQ ID NO: 126).

Endodominio

El endodominio es el extremo funcional del receptor. Después del reconocimiento del antígeno, los receptores se agrupan y se transmite una señal a la célula. El componente de endodominio más comúnmente usado es CD3-zeta, que contiene

tres (3) motivos de activación inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM). Esto transmite una señal de activación a la célula T después de que se una el antígeno. En muchos casos, CD3-zeta puede no proporcionar una señal de activación completamente competente y por tanto, se usa una señal coestimuladora. Por ejemplo, pueden usarse CD28 y/o 4-1BB con CD3-zeta (CD3 ζ) para transmitir una señal proliferativa/de supervivencia. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la molécula coestimuladora de un CAR como se proporciona en el presente documento es una molécula coestimuladora de CD28. En otras realizaciones, la molécula coestimuladora es una molécula coestimuladora de 4-1BB. En algunas realizaciones, un CAR incluye CD3 ζ y CD28. En otras realizaciones, un CAR incluye CD3-zeta y 4-1BB. En otras realizaciones más, un CAR incluye CD3 ζ , CD28 y 4-1BB. La **Tabla 4** proporciona ejemplos de dominios de señalización derivados de 4-1BB, CD28 y CD3-zeta que pueden usarse en la presente.

Tabla 4

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTT ATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGC CGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTG	18
	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	19
CD28	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACT CCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCC CCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCC	121
	SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	20

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
CD3-zeta	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAA GGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAG GAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGAAATG GGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAAT GAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGT ATGAAGGGCGAACGACGACGCGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTAC CAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCAT ATGCAGGCCCTGCCTCCCAGA	21
	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	22

Antígenos de cáncerCD70

En algunas realizaciones, las células T de la presente divulgación se modifican por ingeniería genética con un receptor de antígeno quimérico (CAR) diseñado para seleccionar como diana CD70. CD70 se identificó inicialmente como el ligando de CD27, un receptor coestimulador implicado en la proliferación y supervivencia de las células T. CD70 se encuentra solo en un pequeño porcentaje de células T activadas y células presentadoras de antígeno en los ganglios linfáticos drenantes durante la infección viral. Muchos tumores humanos también expresan CD70 incluyendo, pero sin limitarse a, cánceres sólidos tales como cáncer renal de células claras, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de ovario, glioblastoma y tumores malignos hematológicos. Debido a su patrón de expresión restringido en tejidos normales y sobreexpresión en numerosos cánceres, CD70 es una diana terapéutica atractiva.

Por tanto, en algunas realizaciones, las células T de la presente divulgación se modifican por ingeniería genética

para expresar un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD70 (por ejemplo, scFv anti-CD70). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 47 o 49. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 48 o 50. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 que comprende una VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 51. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 que comprende una VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 52. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD70 está codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 45. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD70 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 47 o 49. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 48 o 50. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 que comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 51. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 que comprende una VL que comprende una

secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 52. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD70 está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 45. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD70 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 46.

BCMA

En algunas realizaciones, las células T de la presente divulgación se modifican por ingeniería genética con un CAR diseñado para seleccionar como diana BCMA. El antígeno de maduración de células B (BCMA, CD269) es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF). BCMA se une al factor de activación de células B (BAFF) y un ligando inductor de proliferación (APRIL). Entre las células no malignas, BCMA se expresa principalmente por células plasmáticas y subconjuntos de células B maduras. BCMA se expresa selectivamente por células de linaje B que incluyen células de mieloma múltiple y linfoma no Hodgkin, por tanto BCMA también es una diana terapéutica atractiva.

Por tanto, en algunas realizaciones, las células T de la presente divulgación se modifican por ingeniería genética para expresar un CAR que comprende un anticuerpo anti-BCMA (por ejemplo, scFv anti-BCMA). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA es un scFv anti-BCMA codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 58. En algunas realizaciones, el

anticuerpo anti-BCMA es un scFv anti-BCMA que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 59. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA es un scFv anti-BCMA que comprende una VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 60. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA es un scFv anti-BCMA que comprende una VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 61. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-BCMA está codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 56. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-BCMA comprende la secuencia de SEQ ID NO: 57.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA es un scFv anti-BCMA codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 58. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA es un scFv anti-BCMA que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 59. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA es un scFv anti-BCMA que comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 60. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-BCMA es un scFv anti-BCMA que comprende una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 61. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-BCMA

está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 56. En algunas realizaciones, un
5 CAR que comprende un anticuerpo anti-BCMA comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 57.

CD19

10 En algunas realizaciones, las células T de la presente divulgación se modifican por ingeniería genética con un CAR diseñado para seleccionar como diana CD19. La agrupación de diferenciación 19 (CD19) es un determinante antigénico detectable en células precursoras de leucemia. Las
15 secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos humanas y murinas pueden encontrarse en una base de datos pública, tal como GenBank, UniProt y Swiss-Prot. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de CD19 humana puede encontrarse como el número de registro de UniProt/Swiss-Prot P15391 y la
20 secuencia de nucleótidos que codifica para la CD19 humana puede encontrarse en el número de registro NM-001178098. CD19 se expresa en la mayoría de los cánceres del linaje B, incluyendo, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica y linfoma no Hodgkin. También
25 es un marcador temprano de progenitores de células B. Véase, por ejemplo, Nicholson et al. Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997).

Por tanto, en algunas realizaciones, las células T de la presente divulgación se modifican por ingeniería genética
30 para expresar un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, scFv anti-CD19). En algunas realizaciones, el

anticuerpo anti-CD19 es un scFv anti-CD19 codificado por la
secuencia de SEQ ID NO: 150. En algunas realizaciones, el
anticuerpo anti-CD19 es un scFv anti-CD19 que comprende la
secuencia de SEQ ID NO: 151. En algunas realizaciones, el
5 anticuerpo anti-CD19 es un scFv anti-CD19 que comprende una
VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 152. En algunas
realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 es un scFv anti-CD19
que comprende una VL que comprende la secuencia de SEQ ID
NO: 153. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un
10 anticuerpo anti-CD19 está codificado por la secuencia de SEQ
ID NO: 148. En algunas realizaciones, un CAR que comprende
un anticuerpo anti-CD19 comprende la secuencia de SEQ ID NO:
149.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 es un
15 scFv anti-CD19 codificado por una secuencia de nucleótidos
que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%,
87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o
99% de identidad con SEQ ID NO: 150. En algunas
realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 es un scFv anti-CD19
20 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,
91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con
SEQ ID NO: 151. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-
CD19 es un scFv anti-CD19 que comprende una VH que comprende
25 una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%,
82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,
94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:
152. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD19 es un
scFv anti-CD19 que comprende una VL que comprende una
30 secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%,
82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 153. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD19 está codificado por un nucleótido que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 148. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD19 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 149.

CD33

En algunas realizaciones, las células T de la presente divulgación se modifican por ingeniería genética con un CAR diseñado para seleccionar como diana CD33. CD33, también conocido como Siglec3, es un receptor transmembrana expresado en células de linaje mieloide que se sabe que se une a ácidos siálicos. Puesto que CD33 se expresa en células cancerosas (por ejemplo, leucemia mieloide aguda), se cree que CD33 representa un marcador de superficie celular para seleccionar como diana estos tumores malignos.

Por tanto, en algunas realizaciones, las células T de la presente divulgación se modifican por ingeniería genética para expresar un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo, scFv anti-CD33). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 es un scFv anti-CD33 codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 138. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 es un scFv anti-CD33 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 137. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 es un scFv anti-CD19 que comprende una VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 140. En algunas

realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 es un scFv anti-CD33 que comprende una VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 141. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD33 está codificado por la secuencia de SEQ ID NO: 136. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD33 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 139.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 es un scFv anti-CD33 codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 138. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 es un scFv anti-CD33 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 137. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 es un scFv anti-CD19 que comprende una VH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 140. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD33 es un scFv anti-CD33 que comprende una VL que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 141. En algunas realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD33 está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 136. En algunas

realizaciones, un CAR que comprende un anticuerpo anti-CD33 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 139.

Anticuerpos

Un anticuerpo (usado indistintamente en forma plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca no solo anticuerpos monoclonales intactos (es decir, de longitud completa), sino también fragmentos de unión a antígeno (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), fragmento variable de cadena sencilla (scFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos de V_HH de camello o llama), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente.

Una molécula de anticuerpo típica comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de

cadena ligera (VL), que habitualmente están implicadas en la unión al antígeno. Estas regiones/residuos que son responsables de la unión al antígeno pueden identificarse a partir de secuencias de aminoácidos de las secuencias de VH/VL de un anticuerpo de referencia (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70 o un anticuerpo anti-BCMA tal como se describe en el presente documento) mediante métodos conocidos en la técnica. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, también conocidas como "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, que se conocen como "regiones de entramado" ("FR"). Cada VH y VL se compone normalmente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La extensión de la región de entramado y las CDR pueden identificarse con precisión usando metodología conocida en la técnica, por ejemplo, mediante la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de AbM y/o la definición de contacto, todas las cuales se conocen bien en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, una CDR puede referirse a la CDR definida mediante cualquier método conocido en la técnica. Dos anticuerpos que tienen la misma CDR significa que los dos anticuerpos tienen la misma secuencia de aminoácidos de esa CDR determinada por el mismo método. Véanse, por ejemplo, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación de los NIH n.º 91-3242, Chothia et al., (1989) *Nature* 342:877; Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, Al-

lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948; y Almagro, J. Mol. Recognit. 17:132-143 (2004). Véase también hgmp.mrc.ac.uk y bioinf.org.uk/abs.

5 En algunas realizaciones, un anticuerpo es un scFv, tal como un scFv anti-CD70, un scFv anti-BCMA, un scFv anti-CD19 o un scFv anti-CD33. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgD, IgE, IgG, IgA o IgM (o subclase de las mismas), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus
10 cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo
15 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de
20 inmunoglobulinas se conocen bien.

Los anticuerpos que van a usarse tal como se proporciona en el presente documento pueden ser murinos, de rata, humanos o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados). En algunos ejemplos, el
25 anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no desencadena la lisis mediada por el complemento o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

30 En algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos

humanizados se refieren a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de unión a antígeno de las mismas que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de entramado (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de entramado o CDR importadas, pero que se incluyen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una porción de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "derivadas" de una o más CDR del

anticuerpo original. Los anticuerpos humanizados también pueden implicar maduración por afinidad.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación es un anticuerpo quimérico, que puede incluir una región constante pesada y una región constante ligera de un anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos se refieren a anticuerpos que tienen una región variable o parte de una región variable de una primera especie y una región constante de una segunda especie. Normalmente, en estos anticuerpos quiméricos, la región variable de las cadenas tanto ligera como pesada imita las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, un mamífero no humano tal como ratón, conejo y rata), mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otro mamífero tal como ser humano. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones de aminoácidos en la región variable y/o en la región constante.

En algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación se une específicamente a un antígeno diana, tal como CD70 humano, BCMA humano, CD19 humano o CD33 humano. Un anticuerpo que "se une específicamente" a una diana o un epítipo es un término bien entendido en la técnica, y los métodos para determinar tal unión específica también se conocen bien en la técnica. Se dice que una molécula presenta "unión específica" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con un antígeno diana particular que con dianas alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a

otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente (o preferentemente) a un epítipo de CD70, BCMA, CD19 o CD33 es un anticuerpo que se une a este epítipo de CD70, BCMA, CD19 o CD33 con mayor afinidad, avidez, más
5 fácilmente y/o con mayor duración de la que se une a otros epítopos de CD70, BCMA, CD19 o CD33 o epítopos distintos de CD70, distintos de BCMA, distintos de CD19 o distintos de CD33. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un primer
10 antígeno diana puede o no unirse específica o preferentemente a un segundo antígeno diana. Como tal, la "unión específica" o "unión preferente" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión
15 preferente.

En algunas realizaciones, la constante de disociación en equilibrio (K_D) entre el anticuerpo y CD70 es de 100 pM a 1 μ M. En algunas realizaciones, la K_D entre el anticuerpo y CD70 es de 1 nM a 100 nM.

20 En algunas realizaciones, la constante de disociación en equilibrio (K_D) entre el anticuerpo y BCMA es de 100 pM a 1 μ M. En algunas realizaciones, la K_D entre el anticuerpo y BCMA es de 1 nM a 100 nM.

En algunas realizaciones, la constante de disociación en equilibrio (K_D) entre el anticuerpo y CD19 es de 100 pM a 1 μ M. En algunas realizaciones, la K_D entre el anticuerpo y CD19 es de 1 nM a 100 nM.
25

En algunas realizaciones, la constante de disociación en equilibrio (K_D) entre el anticuerpo y CD33 es de 100 pM a 1 μ M. En algunas realizaciones, la K_D entre el anticuerpo y CD33 es de 1 nM a 100 nM.
30

También dentro del alcance de la presente divulgación están variantes funcionales de cualquiera de los anticuerpos a modo de ejemplo dados a conocer en el presente documento. Una variante funcional puede contener una o más variaciones de residuos de aminoácidos en VH y/o VL, o en una o más de las CDR de VH y/o una o más de las CDR de VL en relación con un anticuerpo de referencia, mientras que conserva actividades de unión y biológicas sustancialmente similares (por ejemplo, afinidad de unión, especificidad de unión, actividad inhibidora, actividad antitumoral o una combinación de las mismas sustancialmente similares) como el anticuerpo de referencia.

En algunos ejemplos, un anticuerpo dado a conocer en la presente comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH, que conjuntamente contiene no más de 10 variaciones de aminoácidos (por ejemplo, no más de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 variación de aminoácido) en comparación con la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de un anticuerpo de referencia tal como el anticuerpo A (VH: SEQ ID NO: 51; VL: SEQ ID NO: 52) o anticuerpo B (VH: SEQ ID NO: 60; VL: SEQ ID NO: 61). "Conjuntamente" significa que el número total de variaciones de aminoácidos en las tres CDR de VH está dentro del intervalo definido. Alternativamente o además, el anticuerpo puede comprender una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL, que conjuntamente contienen no más de 10 variaciones de aminoácidos (por ejemplo, no más de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 variación de aminoácido) en comparación con la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL del anticuerpo de referencia.

En algunos ejemplos, un anticuerpo dado a conocer en el presente documento puede comprender una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH, al menos una de las cuales contiene

no más de 5 variaciones de aminoácidos (por ejemplo, no más de 4, 3, 2 o 1 variación de aminoácidos) como contraparte a CDR de VH de un anticuerpo de referencia tal como el anticuerpo A (VH: SEQ ID NO: 51; VL: SEQ ID NO: 52) o anticuerpo B (VH: SEQ ID NO: 60; VL: SEQ ID NO: 61). En ejemplos específicos, el anticuerpo comprende una CDR3 de VH, que contiene no más de 5 variaciones de aminoácidos (por ejemplo, no más de 4, 3, 2 o 1 variación de aminoácido) como la CDR3 de VH de un anticuerpo de referencia tal como el anticuerpo A (VH: SEQ ID NO: 51; VL: SEQ ID NO: 52) o anticuerpo B (VH: SEQ ID NO: 60; VL: SEQ ID NO: 61). Alternativamente o además, un anticuerpo puede comprender una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL, al menos una de las cuales contiene no más de 5 variaciones de aminoácidos (por ejemplo, no más de 4, 3, 2 o 1 variación de aminoácido) como contraparte a CDR de VL del anticuerpo de referencia. En ejemplos específicos, el anticuerpo comprende una CDR3 de VL, que contiene no más de 5 variaciones de aminoácidos (por ejemplo, no más de 4, 3, 2 o 1 variación de aminoácido) que la CDR3 de VL del anticuerpo de referencia.

En algunos casos, las variaciones de residuos de aminoácidos pueden ser sustituciones de residuos de aminoácidos conservativas. Como se usa en el presente documento, una "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera la carga relativa o las características de tamaño de la proteína en la que se realiza la sustitución de aminoácidos. Pueden prepararse variantes según métodos para alterar la secuencia de polipéptidos conocidos por un experto en la técnica, tal como se encuentran en referencias que compilan dichos métodos, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, J. Sambrook, et al., eds., segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York.

5 Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen sustituciones realizadas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) A $\rightarrow$ G, S; (b) R $\rightarrow$ K, H; (c) N $\rightarrow$ Q, H; (d) D $\rightarrow$ E, N; (e) C $\rightarrow$ S, A; (f) Q $\rightarrow$ N; (g) E $\rightarrow$ D, Q; (h) G $\rightarrow$ A; (i) H $\rightarrow$ N, Q; (j) I $\rightarrow$ L, V; (k) L $\rightarrow$ I, V; (l)
10 K $\rightarrow$ R, H; (m) M $\rightarrow$ L, I, Y; (n) F $\rightarrow$ Y, M, L; (o) P $\rightarrow$ A; (p) S $\rightarrow$ T; (q) T $\rightarrow$ S; (r) W $\rightarrow$ Y, F; (s) Y $\rightarrow$ W, F; y (t) V $\rightarrow$ I, L.

En algunas realizaciones, un anticuerpo dado a conocer en el presente documento puede comprender CDR de VH que
15 conjuntamente son al menos el 80% (por ejemplo, el 85%, el 90%, el 95% o el 98%) idénticas a las CDR de VH de un anticuerpo de referencia tal como el anticuerpo A (VH: SEQ ID NO: 51; VL: SEQ ID NO: 52) o anticuerpo B (VH: SEQ ID NO: 60; VL: SEQ ID NO: 61). Alternativamente o además, el
20 anticuerpo puede comprender CDR de VL que conjuntamente son al menos el 80% (por ejemplo, el 85%, el 90%, el 95% o el 98%) idénticas a las CDR de VL del anticuerpo de referencia. En algunas realizaciones, un anticuerpo puede comprender una VH que es al menos el 80% (por ejemplo, el 85%, el 90%, el
25 95% o el 98%) idéntica a la VH de un anticuerpo de referencia tal como el anticuerpo A (VH: SEQ ID NO: 51; VL: SEQ ID NO: 52) o anticuerpo B (VH: SEQ ID NO: 60; VL: SEQ ID NO: 61) y/o una VL que es al menos el 80% (por ejemplo, el 85%, el 90%, el 95% o el 98%) idéntica a la VL del anticuerpo de
30 referencia.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 (por ejemplo, scFv anti-CD70) comprende una VH y una VL que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 51 y 52, respectivamente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 (por ejemplo, scFv anti-CD70) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 51, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 52. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 (por ejemplo, ScFv anti-CD70) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 51, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 52, en el que las CDR se determinan según Kabat. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 (por ejemplo, ScFv anti-CD70) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 51, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 52, en el que las CDR se determinan según Chothia. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 (por ejemplo, scFv anti-CD70) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 51, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 52, en el que las CDR se determinan según AbM. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 (por ejemplo, scFv anti-CD70) comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada expuestas en SEQ ID NO: 68, 70 y 72, respectivamente, y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 62, 64 y 66. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 (por ejemplo, scFv anti-CD70) comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada expuestas en SEQ ID NO: 69, 71 y 73, respectivamente, y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 63, 65 y 67. En algunas

realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 50. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 49. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70 codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 47.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-BCMA (por ejemplo, scFv anti-BCMA) comprende una VH y una VL que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 60 y 61, respectivamente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-BCMA (por ejemplo, scFv anti-BCMA) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 60, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 61. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-BCMA (por ejemplo, scFv anti-BCMA) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 60, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 61, en el que las CDR se determinan según Kabat. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-BCMA (por ejemplo, scFv anti-BCMA) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 60, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 61, en el que las CDR se determinan según Chothia. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-BCMA (por ejemplo, scFv anti-BCMA) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 60, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 61, en el que las CDR se determinan según AbM. En algunas

realizaciones, un anticuerpo anti-BCMA (por ejemplo, scFv anti-BCMA) comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada expuestas en SEQ ID NO: 80, 82 y 84, respectivamente, y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de
5 cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 74, 76 y 78. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-BCMA (por ejemplo, scFv anti-BCMA) comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada expuestas en SEQ ID NO: 81, 83 y 85, respectivamente, y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de
10 cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 75, 77 y 79. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-BCMA es un scFv anti-BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 59. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-BCMA es un scFv anti-BCMA codificado por la secuencia de nucleótidos
15 expuesta en SEQ ID NO: 58.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, scFv anti-CD19) comprende una VH y una VL que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 152 y 153, respectivamente. En algunas realizaciones, un
20 anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, ScFv anti-CD19) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 152, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 153. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, ScFv anti-CD19) comprende tres CDR (CDR1,
25 CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 152, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 153, en el que las CDR se determinan según Kabat. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, ScFv anti-CD19) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH
30 expuesta en SEQ ID NO: 152, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 153, en el que las CDR se

determinan según Chothia. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, scFv anti-CD19) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 152, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 153, en el que las CDR se determinan según AbM. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, scFv anti-CD19) comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada expuestas en SEQ ID NO: 169, 170 y 171, respectivamente, y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 166, 167 y 168, respectivamente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD19 (por ejemplo, scFv anti-CD19) comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada expuestas en SEQ ID NO: 175, 176 y 177, respectivamente, y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 172, 173 y 174, respectivamente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD19 es un scFv anti-CD19 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 151. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD19 es un scFv anti-CD19 codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 150.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo, scFv anti-CD33) comprende una VH y una VL que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 140 y 141, respectivamente. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo, scFv anti-CD33) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 140, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 141. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo, scFv anti-CD33) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 140, y tres CDR

(CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 141, en el que las CDR se determinan según Kabat. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo, scFv anti-CD33) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 140, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 141, en el que las CDR se determinan según Chothia. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo, scFv anti-CD33) comprende tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR2) de la VH expuesta en SEQ ID NO: 140, y tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de la VL expuesta en SEQ ID NO: 141, en el que las CDR se determinan según AbM. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo, scFv anti-CD33) comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada expuestas en SEQ ID NO: 142, 143 y 144, respectivamente, y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 145, 146 y 147. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo, scFv anti-CD33) comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada expuestas en SEQ ID NO: 178, 179 y 180, respectivamente, y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera expuestas en SEQ ID NO: 145, 146 y 147. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD33 es un scFv anti-CD33 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 137. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD33 es un scFv anti-CD33 codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 138.

Constructo de receptor de antígeno quimérico que selecciona como diana un antígeno

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento comprenden un CAR que selecciona como diana un antígeno

tumoral. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral es un "antígeno asociado a un tumor", refiriéndose a una molécula inmunogénica, tal como una proteína, que generalmente se expresa a un nivel más alto en las células tumorales que en las células no tumorales, en las que puede no expresarse en absoluto, o solo en niveles bajos. En algunas realizaciones, las estructuras asociadas a tumores que son reconocidas por el sistema inmunológico del huésped que alberga el tumor se denominan antígenos asociados a tumores. En algunas realizaciones, un antígeno asociado a tumor es un antígeno tumoral universal si se expresa ampliamente en la mayoría de los tumores. En algunas realizaciones, los antígenos asociados a tumores son antígenos de diferenciación, antígenos mutacionales, antígenos celulares sobreexpresados o antígenos virales. En algunas realizaciones, un antígeno tumoral es un "antígeno específico de tumor" o "TSA", refiriéndose a una molécula inmunogénica, tal como una proteína, que es única para una célula tumoral. Los antígenos específicos de tumores se expresan exclusivamente en células tumorales. En algunas realizaciones, el antígeno tumoral no es CD70.

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en la presente comprenden un CAR que no selecciona como diana CD70 (por ejemplo, un CAR que no se une a CD70).

CAR para CD19

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento comprenden un CAR que selecciona como diana CD19, también denominado en el presente documento como CAR para CD19, CAR anti-CD19 o células T con CAR anti-CD19. En algunas

realizaciones, el CAR anti-CD19 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD19, (ii) un dominio transmembrana y (iii) un endodominio que comprende al menos un dominio coestimulador.

5 En algunas realizaciones, el CAR anti-CD19 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD19, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador CD28 o 41BB y un dominio de señalización CD3-zeta. En algunas
10 realizaciones, el CAR anti-CD19 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD19, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador CD28 y un dominio de señalización CD3-zeta. En algunas realizaciones, el CAR
15 anti-CD19 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD19, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB y un dominio de señalización CD3-zeta.

20 En algunas realizaciones, el CAR anti-CD19 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD19, (ii) un dominio transmembrana CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 126 y (iii) un endodominio que comprende un dominio
25 coestimulador CD28 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20 y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

 En algunas realizaciones, el CAR anti-CD19 comprende
30 (i) un ectodominio que comprende un scFv anti-CD19 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

151, (ii) un dominio transmembrana CD8 que comprende la
secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 126 y (iii)
un endodominio que comprende un dominio coestimulador CD28
que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
5 NO: 20 y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende
la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

En algunas realizaciones, el CAR anti-CD19 comprende
(i) un ectodominio que comprende un scFv anti-CD19 que
comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que
10 comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID
NO: 152 y 153, respectivamente, (ii) un dominio transmembrana
CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en
SEQ ID NO: 126 y (iii) un endodominio que comprende un
dominio coestimulador CD28 que comprende la secuencia de
15 aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 20 y un dominio de
señalización CD3-zeta que comprende la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

En algunas realizaciones, el CAR anti-CD19 comprende la
secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 149. En
20 algunas realizaciones, el CAR anti-CD19 está codificado por
la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 148. En
algunos aspectos, el scFv anti-BCMA está codificado por una
secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, el 85%,
el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de
25 identidad con SEQ ID NO: 148.

CAR para CD33

En algunas realizaciones, las células T modificadas por
ingeniería genética descritas en el presente documento
comprenden un CAR que selecciona como diana CD33, también
30 denominado en el presente documento como CAR frente a CD33,
CAR anti-CD33 o células T con CAR anti-CD33. En algunas

realizaciones, el CAR anti-CD33 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD33, (ii) un dominio transmembrana y (iii) un endodominio que comprende al menos un dominio coestimulador.

5 En algunas realizaciones, el CAR anti-CD33 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD33, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador CD28 o 41BB y un dominio de señalización CD3-zeta. En algunas
10 realizaciones, el CAR anti-CD33 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD33, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador CD28 y un dominio de señalización CD3-zeta. En algunas realizaciones, el CAR
15 anti-CD33 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD33, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB y un dominio de señalización CD3-zeta.

20 En algunas realizaciones, el CAR anti-CD33 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD33, (ii) un dominio transmembrana CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 126 y (iii) un endodominio que comprende un dominio
25 coestimulador 41BB que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

 En algunas realizaciones, el CAR anti-CD33 comprende
30 (i) un ectodominio que comprende un scFv anti-CD33 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

137, (ii) un dominio transmembrana CD8 que comprende la
secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 126 y (iii)
un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB
que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID
5 NO: 19 y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende
la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

En algunas realizaciones, el CAR anti-CD33 comprende
(i) un ectodominio que comprende un scFv anti-CD33 que
comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que
10 comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID
NO: 140 y 141, respectivamente, (ii) un dominio transmembrana
CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en
SEQ ID NO: 126 y (iii) un endodominio que comprende un
dominio coestimulador 41BB que comprende la secuencia de
15 aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 y un dominio de
señalización CD3-zeta que comprende la secuencia de
aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

En algunas realizaciones, el CAR anti-CD33 comprende la
secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 139. En
20 algunas realizaciones, el CAR anti-CD33 está codificado por
la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 136. En
algunas realizaciones, el scFv anti-BCMA está codificado por
una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, el
85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el
25 100% de identidad con SEQ ID NO: 136.

CAR para BCMA

En algunas realizaciones, las células T modificadas por
ingeniería genética descritas en el presente documento
comprenden un CAR que selecciona como diana BCMA, también
30 denominado en el presente documento CAR para BCMA, CAR anti-
BCMA o células CAR T anti-BCMA. En algunas realizaciones, el

CAR anti-BCMA comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-BCMA, (ii) un dominio transmembrana y (iii) un endodominio que comprende al menos un dominio coestimulador.

5 En algunas realizaciones, el CAR anti-BCMA comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-BCMA, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador CD28 o 41BB y un dominio de señalización CD3-zeta. En algunas
10 realizaciones, el CAR anti-BCMA comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-BCMA, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador CD28 y un dominio de señalización CD3-zeta. En algunas realizaciones, el CAR
15 anti-BCMA comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-BCMA, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB y un dominio de señalización CD3-zeta.

20 En algunas realizaciones, el CAR anti-BCMA comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-BCMA, (ii) un dominio transmembrana CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 126 y (iii) un endodominio que comprende un dominio
25 coestimulador 41BB que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

 En algunas realizaciones, el CAR anti-BCMA comprende
30 (i) un ectodominio que comprende un scFv anti-BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

59, (ii) un dominio transmembrana CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 126 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

En algunas realizaciones, el CAR anti-BCMA comprende (i) un ectodominio que comprende un scFv anti-BCMA que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NO: 60 y 61, respectivamente, (ii) un dominio transmembrana CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 126 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

En algunas realizaciones, el CAR anti-BCMA comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 57. En algunas realizaciones, el CAR anti-BCMA está codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 56. En algunas realizaciones, el scFv anti-BCMA está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de identidad con SEQ ID NO: 56.

CAR para CD70

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento comprenden un CAR que selecciona como diana CD70, también denominado en el presente documento como CAR para CD70, CAR anti-CD70 o células T con CAR anti-CD70. En algunas

realizaciones, el CAR anti-CD70 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD70, (ii) un dominio transmembrana y (iii) un endodominio que comprende al menos un dominio coestimulador.

5 En algunas realizaciones, el CAR anti-CD70 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD70, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador CD28 o 41BB y un dominio de señalización CD3-zeta. En algunas
10 realizaciones, el CAR anti-CD70 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD70, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador CD28 y un dominio de señalización CD3-zeta. En algunas realizaciones, el CAR
15 anti-CD70 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD70, (ii) un dominio transmembrana CD8 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB y un dominio de señalización CD3-zeta.

20 En algunas realizaciones, el CAR anti-CD70 comprende (i) un ectodominio que comprende un dominio de unión a antígeno anti-CD70, (ii) un dominio transmembrana CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 126 y (iii) un endodominio que comprende un dominio
25 coestimulador 41BB que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

 En algunas realizaciones, el CAR anti-CD70 comprende
30 (i) un ectodominio que comprende un scFv anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

50, (ii) un dominio transmembrana CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 126 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

En algunas realizaciones, el CAR anti-CD70 comprende (i) un ectodominio que comprende un scFv anti-CD70 que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NO: 51 y 52, respectivamente, (ii) un dominio transmembrana CD8 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 126 y (iii) un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 19 y un dominio de señalización CD3-zeta que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 22.

En algunas realizaciones, el CAR anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46. En algunas realizaciones, el CAR anti-CD70 está codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 45. En algunas realizaciones, el scFv anti-CD70 está codificado por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de identidad con SEQ ID NO: 45.

Expresión de constructo de receptor de antígeno quimérico

Molde donador

El ácido nucleico que codifica para un CAR puede suministrarse a una célula T que comprende lo que se denomina en el presente documento molde donador (también denominado polinucleótido donador). Un molde donador puede contener una

5 secuencia no homóloga, tal como el ácido nucleico que
 codifica para un CAR, flanqueada por dos regiones de
 homología para permitir una HDR eficaz en una ubicación
 genómica de interés. Alternativamente, un molde donador
 puede no tener regiones de homología con la ubicación
 seleccionada como diana en el ADN y puede integrarse por
 unión de extremos dependiente de NHEJ después de la escisión
 en el sitio diana.

10 Un molde donador puede ser ADN o ARN, monocatenario y/o
 bicatenario, y puede introducirse en una célula en forma
 lineal o circular. Si se introduce en forma lineal, los
 extremos de la secuencia donadora pueden estar protegidos
 (por ejemplo, de la degradación exonucleolítica) por métodos
 conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se
15 añaden uno o más residuos de didesoxinucleótido al extremo
 3' terminal de una molécula lineal y/o se ligan
 oligonucleótidos autocomplementarios a uno o ambos extremos.
 Véase, por ejemplo, Chang et al., (1987) Proc. Natl. Acad.
 Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al., (1996) Science 272:886-
20 889. Los métodos adicionales para proteger polinucleótidos
 exógenos de la degradación incluyen, pero no se limitan a,
 la adición de grupo(s) amino terminal(es) y el uso de uniones
 internucleotídicas modificadas tales como, por ejemplo,
 fosforotioatos, fosforamidatos y residuos de O-metilrribosa
25 o desoxirribosa.

 Puede introducirse un molde donador en una célula como
 parte de una molécula de vector que tiene secuencias
 adicionales tales como, por ejemplo, orígenes de
 replicación, promotores y genes que codifican para
30 resistencia a antibióticos. Además, puede introducirse un
 molde donador como ácido nucleico desnudo, como ácido

nucleico complejo con un agente tal como un liposoma o poloxámero, o puede administrarse por virus (por ejemplo, adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus y lentivirus defectuosos en integrasa (IDLV)).

5 En algunas realizaciones, se inserta un molde donador de modo que su expresión está dirigida por el promotor endógeno en el sitio de integración, concretamente el promotor que dirige la expresión del gen endógeno en el que se inserta el donador. Sin embargo, en algunas realizaciones,
10 el molde donador comprende un promotor y/o potenciador exógeno, por ejemplo, un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejido. En algunas realizaciones, el promotor exógeno es un promotor EFl α que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 123. Pueden usarse
15 otros promotores.

 Además, las secuencias exógenas también pueden incluir secuencias reguladoras de la transcripción o traducción, por ejemplo, promotores, potenciadores, aislantes, sitios de entrada al ribosoma internos, secuencias que codifican para
20 péptidos 2A y/o señales de poliadenilación.

 En algunas realizaciones, el molde donador comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 98% de identidad con SEQ ID NO: 44. En algunas realizaciones, el
25 molde donador comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 44.

 En algunas realizaciones, el molde donador comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 98% de
30 identidad con SEQ ID NO: 55. En algunas realizaciones, el

molde donador comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 55.

En algunas realizaciones, el molde donador comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 98% de identidad con SEQ ID NO: 135. En algunas realizaciones, el molde donador comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 135.

En algunas realizaciones, el molde donador comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 98% de identidad con SEQ ID NO: 156. En algunas realizaciones, el molde donador comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 156.

15 Otros métodos

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica para un CAR se introduce en una célula modificada por ingeniería genética mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede introducirse un CAR en una célula modificada por ingeniería genética mediante un vector. Pueden usarse una variedad de métodos diferentes conocidos en la técnica para introducir cualquiera de los ácidos nucleicos o vectores de expresión dados a conocer en el presente documento en una célula efectora inmunitaria. Los ejemplos no limitativos de métodos para introducir ácido nucleico en una célula incluyen: lipofección, transfección (por ejemplo, transfección con fosfato de calcio, transfección usando compuestos orgánicos altamente ramificados, transfección usando polímeros catiónicos, transfección basada en dendrímeros, transfección óptica, transfección basada en partículas (por ejemplo, transfección

con nanopartículas) o transfección usando liposomas (por ejemplo, liposomas catiónicos)), microinyección, electroporación, compresión celular, sonoporación, fusión de protoplastos, impalefección, suministro hidrodinámico, pistola de genes, magnetofección, transfección viral y nucleofección.

Métodos de suministro y constructos

Pueden administrarse nucleasas y/o moldes donadores usando un sistema de vector, que incluye, pero no se limita a, vectores de plásmidos, minicírculos de ADN, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales, vectores de poxvirus; vectores de herpesvirus y vectores de virus adenoasociados, y combinaciones de los mismos.

Pueden usarse métodos convencionales de transferencia de genes basados en virus y no basados en virus para introducir ácidos nucleicos que codifican para nucleasas y moldes donadores en células (por ejemplo, células T). Los sistemas de suministro de vectores no virales incluyen plásmidos de ADN, minicírculos de ADN, ácido nucleico desnudo y ácido nucleico complejado con un vehículo de suministro tal como un liposoma o poloxámero. Los sistemas de suministro de vectores virales incluyen virus de ADN y ARN, que tienen o bien genomas episomales o bien integrados después del suministro a la célula.

Los métodos de suministro no viral de ácidos nucleicos incluyen electroporación, lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, conjugados de polimerización o lípido:ácido nucleico, ADN desnudo, ARN desnudo, ARN protegido, viriones artificiales y captación potenciada por agente de ADN. También puede usarse sonoporación usando, por ejemplo, el sistema Sonitron

2000 (Rich-Mar) para el suministro de ácidos nucleicos. A continuación se proporcionan algunos ejemplos específicos.

Suministro de virus adenoasociados

5 El ácido nucleico donador que codifica para un constructo de CAR puede suministrarse a una célula usando un virus adenoasociado (AAV). Los AAV son pequeños virus que se integran de manera específica de sitio en el genoma del huésped y, por tanto, pueden suministrar un transgén, tal como CAR. Están presentes repeticiones terminales invertidas
10 (ITR) flanqueando el genoma de AAV y/o el transgén de interés y sirven como orígenes de replicación. También están presentes en el genoma de AAV las proteínas rep y cap que, cuando se transcriben, forman cápsides que encapsulan el genoma de AAV para su suministro a las células diana.
15 Receptores de superficie en estas cápsides que confieren el serotipo de AAV, que determina a qué órganos diana se unirán principalmente las cápsides y, por tanto, qué células infectará el AAV con mayor eficacia. Hay doce serotipos de AAV humanos actualmente conocidos. En algunas realizaciones,
20 el AAV es el serotipo 6 de AAV (AAV6).

Los virus adenoasociados se encuentran entre los virus más usados para terapia génica por varios motivos. En primer lugar, los AAV no provocan una respuesta inmunitaria tras la administración a mamíferos, incluyendo seres humanos. En
25 segundo lugar, los AAV se suministran eficazmente a células diana, particularmente cuando se considera la selección del serotipo de AAV apropiado. Por último, los AAV tienen la capacidad de infectar tanto células en división como células que no están en división porque el genoma puede persistir en
30 la célula huésped sin integración. Este rasgo los convierte en candidatos ideales para terapia génica.

Reparación dirigida por homología (HDR)

El ácido nucleico donador que codifica para un CAR se inserta mediante reparación dirigida por homología (HDR) en el locus del gen diana. Ambas hebras del ADN en el locus diana se cortan mediante una enzima CRISPR Cas9. Entonces se produce HDR para reparar la rotura bicatenaria (DSB) e insertar el ADN donador. Para que esto ocurra correctamente, la secuencia donadora se diseña con residuos flanqueantes que son complementarios a la secuencia que rodea el sitio de DSB en el gen diana (a continuación en el presente documento, "brazos de homología"). Estos brazos de homología sirven como molde para la reparación de DSB y permiten que HDR sea un mecanismo esencialmente libre de errores. La tasa de reparación dirigida por homología (HDR) es una función de la distancia entre la mutación y el sitio de corte, por lo que es importante la elección de sitios diana solapantes o cercanos. Los moldes pueden incluir secuencias adicionales flanqueadas por las regiones homólogas o pueden contener una secuencia que difiere de la secuencia genómica, permitiendo de este modo la edición de la secuencia.

El gen diana puede asociarse con una respuesta inmunitaria en un sujeto, en el que la eliminación permanente de al menos una parte del gen diana modulará la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, para generar una célula CAR T, el gen diana puede ser la región constante TCR α (TRAC). La alteración de TRAC conduce a pérdida de función del TCR endógeno.

En algunas realizaciones, el gen diana está en un locus de puerto seguro.

Células T modificadas por ingeniería genética

Las células CAR T modificadas por ingeniería genética (sometidas a edición génica) de la presente divulgación pueden ser autólogas ("propias") o no autólogas ("no
propias", por ejemplo, alogénicas, singénicas o
5 xenogénicas). "Autólogas" se refiere a células del mismo sujeto. "Alogénicas" se refiere a células de la misma especie que un sujeto, pero que difieren genéticamente de las células del sujeto. En algunas realizaciones, las células T se obtienen de un mamífero. En algunas realizaciones, las
10 células T se obtienen de un ser humano.

Las células T pueden obtenerse de varias fuentes incluyendo, pero sin limitarse a, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de los ganglios linfáticos, sangre del cordón umbilical, tejido del timo,
15 tejido de un sitio de infección, ascitis, efusión pleural, tejido del bazo y tumores. En ciertas realizaciones, las células T pueden obtenerse de una unidad de sangre recogida de un sujeto usando cualquiera de varias técnicas conocidas por el experto, tales como sedimentación, por ejemplo,
20 separación con FICOLL™.

En algunas realizaciones, se usa una población aislada de células T. En algunas realizaciones, después del aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), tanto los linfocitos T citotóxicos como auxiliares
25 pueden clasificarse en subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria y efectoras o bien antes o bien después de la activación, expansión y/o modificación genética.

Una subpoblación específica de células T, que expresa uno o más de los siguientes marcadores de superficie celular:
30 TCRab, CD3, CD4, CD8, CD27 CD28, CD38 CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD122, CD95, CD197, CCR7, KLRG1, proteínas MCH-I y/o

proteínas MCH-II, puede aislarse adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En algunas realizaciones, una subpoblación específica de células T, que expresa uno o más de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en TCRab, CD4 y/o CD8, se aísla adicionalmente mediante técnicas de selección positiva o negativa. En algunas realizaciones, las poblaciones de células T modificadas por ingeniería genética no expresan o no expresan sustancialmente uno o más de los siguientes marcadores: CD70, CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, HM3 y LAG3. En algunas realizaciones, las subpoblaciones de células T pueden aislarse mediante selección positiva o negativa antes de la ingeniería genética y/o después de la ingeniería genética.

En algunas realizaciones, una población aislada de células T expresa uno o más de los marcadores que incluyen, pero no se limitan a, un CD3+, CD4+, CD8+ o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, las células T se aíslan de un donante o sujeto, y en primer lugar se activan y se estimulan para que proliferen *in vitro* antes de someterse a la edición genética.

Para lograr dosis terapéuticas suficientes de composiciones de células T, las células T a menudo se someten a una o más rondas de estimulación, activación y/o expansión. Las células T pueden activarse y expandirse usando generalmente métodos tal como se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses 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; y 6,867,041. En algunas realizaciones, las células T se activan y expanden durante de aproximadamente 1 día a aproximadamente 4 días, de

aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días, de
aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 días, de
aproximadamente 2 días a aproximadamente 3 días, de
aproximadamente 2 días a aproximadamente 4 días, de
5 aproximadamente 3 días a aproximadamente 4 días o
aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días,
aproximadamente 3 días o aproximadamente 4 días antes de la
introducción de las composiciones de edición del genoma en
las células T.

10 En algunas realizaciones, las células T se activan y
expanden durante aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6
horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas,
aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas,
aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas o
15 aproximadamente 72 horas antes de la introducción de las
composiciones de edición del genoma en las células T.

En algunas realizaciones, las células T se activan al
mismo tiempo que se introducen las composiciones de edición
del genoma en las células T. Las poblaciones de células T o
20 células T aisladas generadas por cualquiera de los métodos
de edición génica descritos en el presente documento también
están dentro del alcance de la presente divulgación.

En algunas realizaciones, se proporciona en el presente
documento una población de células T que comprenden células
25 T modificadas genéticamente, que comprenden un gen *CD70*
endógeno alterado y un ácido nucleico que codifica para un
receptor de antígeno quimérico (CAR), por ejemplo, los
descritos en el presente documento. En algunas
realizaciones, el CAR se une a un antígeno expresado sobre
30 una célula patológica. En algunas realizaciones, el CAR se
une a CD70. En otras realizaciones, el CAR no se une a CD70.

Una población de células T de este tipo puede comprender además células T modificadas genéticamente que tienen una o más de las siguientes ediciones génicas: un gen de muerte celular programada-1 (*PD-1*) endógeno alterado, un gen de
5 región constante de cadena alfa de receptor de células T (*TRAC*) endógeno alterado y un gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$) endógeno alterado. En algunos ejemplos, el ácido nucleico que codifica para el CAR puede insertarse en el locus de *TRAC*.

10 En algunas realizaciones, la población de células T dada a conocer en el presente documentocomprende células T modificadas genéticamente, que comprenden un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a un antígeno
15 expresado en una célula patológica. En algunas realizaciones, la población de células T dada a conocer en el presente documento comprende células T modificadas genéticamente, que comprenden un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico
20 (CAR), en el que el CAR se une a *CD70*. En otras realizaciones, la población de células T dadas a conocer en el presente documentodocumento comprende células T modificadas genéticamente que comprenden un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica un CAR, en el que el CAR no se une a
25 *CD70*. En algunas realizaciones, la población de células T dada a conocer en el presente documentocomprende células T modificadas genéticamente, que comprenden un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a un antígeno
30 expresado en una célula patológica, y comprende además un gen *PD1* alterado. En algunas realizaciones, el CAR se une a

CD70. En algunas realizaciones el CAR no se une a CD70. En algunos aspectos, el CAR se une a CD19. En algunas realizaciones, el CAR se une a CD33. En algunos aspectos, el CAR se une a BCMA. Cualquiera de las células T modificadas por ingeniería genética recientemente indicadas pueden comprender además un gen de región constante de cadena alfa de receptor de células T (*TRAC*) alterado y/o un gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$) alterado.

En ejemplos particulares, se proporciona en el presente documentouna población de células T que comprenden células T modificadas genéticamente, que comprenden un gen *CD70* alterado, un gen de región constante de cadena alfa de receptor de células T (*TRAC*) alterado, un gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$) alterado, un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR), por ejemplo, un CAR anti-BCMA, CAR anti-CD19, CAR anti-CD33 o CAR anti-CD70 tal como se describe en el presente documento, y opcionalmente un gen de muerte celular programada-1 (*PD-1*) alterado. Cualquiera de las células T modificadas por ingeniería genética dadas a conocer en el presente documento puede contener genes de HLA nativos (no alterados).

En algunos ejemplos, al menos el 50% (por ejemplo, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95%) de la población de células T expresan el CAR tal como se da a conocer en el presente documento y no expresan un nivel detectable de CD70 de superficie. Tales células pueden poseer además las características de no expresar un nivel detectable de TCR de superficie, un nivel detectable de $\beta 2M$ de superficie y/o un nivel detectable de PD-1 de superficie. Por ejemplo, al menos el 50% (por ejemplo, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95%) de la población de células T expresan el CAR tal como

se da a conocer en el presente documento y no expresan un nivel detectable de CD70 de superficie, un nivel detectable de TCR de superficie y un nivel detectable de β 2M de superficie. En algunos casos, al menos el 50% (por ejemplo, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95%) de la población de células T expresan el CAR tal como se da a conocer en el presente documento y no expresan un nivel detectable de CD70 de superficie, un nivel detectable de TCR de superficie, un nivel detectable de β 2M de superficie y un nivel detectable de PD-1.

Una célula aislada que expresa el CAR tal como se describe en el presente documento y no expresa un nivel detectable de CD70 de superficie también está dentro del alcance de la presente divulgación. Una célula aislada de este tipo puede no expresar un nivel detectable de TCR de superficie, un nivel detectable de β 2M de superficie y/o un nivel detectable de PD-1 de superficie. En algunos ejemplos, la célula aislada comprende un ácido nucleico que codifica para el CAR, que se inserta en el locus de *TRAC*.

También se proporciona en el presente documento una población de células T modificadas por ingeniería genética que comprenden células T modificadas por ingeniería genética que comprenden una nucleasa guiada por ARN, por ejemplo, los descritos en el presente documento (por ejemplo, una nucleasa Cas9) y un ARN guía (ARNg) que selecciona como diana un gen *CD70*, por ejemplo, los descritos en el presente documento). En algunos casos, al menos el 50% (por ejemplo, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95%) de las células T en la población de células T comprenden la nucleasa guiada por ARN y el ARNg que selecciona como diana el gen *CD70*. Una población de células T modificadas por ingeniería genética de este tipo

puede comprender además células T modificadas por ingeniería genética que comprenden un ARNg que selecciona como diana un gen *PD-1*, un ARNg que selecciona como diana un gen *TRAC*, un ARNg que selecciona como diana un gen $\beta 2M$ y/o un ácido nucleico (por ejemplo, un vector) que comprende un molde donador que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un CAR (por ejemplo, los descritos en el presente documento), que opcionalmente está flanqueado por brazos de homología izquierdo y derecho al locus del gen *TRAC*. En algunos ejemplos, al menos el 50% (por ejemplo, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95%) de las células T en la población de células T comprenden la nucleasa guiada por ARN, el ARNg que selecciona como diana el gen *CD70* y el ácido nucleico que codifica el CAR. Cuando el ácido nucleico que codifica para el CAR comprende además los brazos de homología izquierdo y derecho al locus del gen *TRAC*, las células T también pueden comprender un ARNg que selecciona como diana el gen *TRAC*. Además, las células T pueden comprender además un ARNg que selecciona como diana un gen *PD-1*, un ARNg que selecciona como diana un gen $\beta 2M$, o una combinación de los mismos.

También está dentro del alcance de la presente divulgación una célula T modificada por ingeniería genética aislada que comprende la nucleasa guiada por ARN, el ARNg que selecciona como diana el gen *CD70*, y opcionalmente uno o más de un ARNg que selecciona como diana un gen *PD-1*, un ARNg que selecciona como diana un gen *TRAC*, un ARNg que selecciona como diana un gen $\beta 2M$, y un ácido nucleico (por ejemplo, un vector) que comprende un molde donador que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un CAR (por ejemplo, los descritos en el presente documento).

La secuencia de nucleótidos que codifica para el CAR puede estar flanqueada por brazos de homología izquierdo y derecho al locus del gen *TRAC*.

Generación de células CAR-T

5 En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan modificando el genoma de las células. En algunas realizaciones, se induce una rotura bicatenaria (DSB) en un sitio en un gen diana. En algunas realizaciones, la DSB se
10 repara usando una o más rutas de reparación del ADN endógenas. En algunas realizaciones, una ruta de reparación del ADN no requiere una secuencia homóloga (por ejemplo, la ruta de unión de extremos no homólogos o ruta de NHEJ). En algunas realizaciones, una ruta de reparación requiere una
15 secuencia homóloga (por ejemplo, la ruta dirigida por homología o ruta de HDR).

 En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan induciendo una DSB con CRISPR-Cas9 como endonucleasa
20 y uno o más ARN no codificantes, y reparando la DSB usando HDR y un molde de polinucleótido donador descrito en el presente documento.

 En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se
25 generan usando un ARNg complementario a una secuencia de un gen diana que es un *TRAC*. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un espaciador de ARNg de *TRAC* que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID
30 NO: 98. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento

se generan usando un ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 30. En algunas realizaciones, el ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 98 selecciona como diana la secuencia de TRAC expuesta en SEQ ID NO: 118. En algunas realizaciones, el ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 30 selecciona como diana la secuencia de TRAC expuesta en SEQ ID NO: 118.

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un espaciador de ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 108. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 40. En algunas realizaciones, el ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 108 selecciona como diana la secuencia de TRAC expuesta en SEQ ID NO: 118. En algunas realizaciones, el ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 40 selecciona como diana la secuencia de TRAC expuesta en SEQ ID NO: 118.

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg complementario a una secuencia de un gen diana que es una β 2M. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un espaciador de ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 99. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 31. En algunas realizaciones, el ARNg

de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 99 selecciona como diana la secuencia de β 2M expuesta en SEQ ID NO: 119. En algunas realizaciones, el ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 31 selecciona como diana la secuencia de β 2M expuesta en SEQ ID NO: 119.

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un espaciador de ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 109. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 41. En algunas realizaciones, el ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 109 selecciona como diana la secuencia de β 2M expuesta en SEQ ID NO: 119. En algunas realizaciones, el ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 41 selecciona como diana la secuencia de β 2M expuesta en SEQ ID NO: 119.

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg complementario a una secuencia de un gen diana que es un CD70. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un espaciador de ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 94. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, el ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 94 selecciona como diana la secuencia de CD70 expuesta en SEQ

ID NO: 114. En algunas realizaciones, el ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 26 selecciona como diana la secuencia de CD70 expuesta en SEQ ID NO: 114.

5 En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un espaciador de ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 104. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando
10 un ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 36. En algunas realizaciones, el ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 104 selecciona como diana la secuencia de CD70 expuesta en SEQ ID NO: 114. En algunas realizaciones, el ARNg de CD70 que comprende la
15 secuencia expuesta en SEQ ID NO: 36 selecciona como diana la secuencia de CD70 expuesta en SEQ ID NO: 114.

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg complementario a una secuencia de un
20 gen diana que es un CD70. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un espaciador de ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 95. En algunas realizaciones, las células T modificadas
25 por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27. En algunas realizaciones, el ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 95 selecciona como diana la secuencia de CD70 expuesta en SEQ
30 ID NO: 115. En algunas realizaciones, el ARNg de CD70 que

comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27 selecciona como diana la secuencia de CD70 expuesta en SEQ ID NO: 115.

5 En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un espaciador de ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 105. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ
10 ID NO: 37. En algunas realizaciones, el ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 105 selecciona como diana la secuencia de CD70 expuesta en SEQ ID NO: 115. En algunas realizaciones, el ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 37 selecciona como diana la
15 secuencia de CD70 expuesta en SEQ ID NO: 115.

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg complementario a una secuencia de un gen diana que es un PD-1. En algunas realizaciones, las
20 células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un espaciador de ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 100. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento
25 se generan usando un ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 32. En algunas realizaciones, el ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 100 selecciona como diana la secuencia de β 2M expuesta en SEQ ID NO: 120. En algunas realizaciones, el ARNg de PD-1
30 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 32

selecciona como diana la secuencia de PD-1 expuesta en SEQ ID NO: 120.

5 En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un espaciador de ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 110. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 42. En algunas realizaciones, el ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 110 selecciona como diana la secuencia de PD-1 expuesta en SEQ ID NO: 120. En algunas realizaciones, el ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 42 selecciona como diana la secuencia de PD-1 expuesta en SEQ ID NO: 120.

15 En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 98, un ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 99, un ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 94 o 95, y/o un ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 100. En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 108, un ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 109, un ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 104 o 105, y/o un ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 110.

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 30, un ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 31, un ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 26 o 27, y/o un ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 32 . En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética descritas en el presente documento se generan usando un ARNg de TRAC que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 40, un ARNg de β 2M que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 41, un ARNg de CD70 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 36 o 27, y/o un ARNg de PD-1 que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 42.

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética se generan usando un molde donador que comprende una secuencia no homóloga que es un ácido nucleico que codifica para un CAR. En algunas realizaciones, un molde donador está compuesto por brazos de homología que corresponden a secuencias en un gen diana que es un TRAC. En algunas realizaciones, un brazo de homología 5' (brazo de homología izquierdo) del molde donador comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 122. En algunas realizaciones, un brazo de homología 3' del molde donador comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 125.

En algunas realizaciones, un promotor exógeno es un promotor EF1a que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 123. En algunas realizaciones, un molde donador comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 135. En algunas realizaciones, un molde donador comprende la secuencia

expuesta en SEQ ID NO: 156. En algunas realizaciones, un molde donador comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 44. En algunas realizaciones, un molde donador comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 55.

5 En algunas realizaciones, se introducen polinucleótidos que codifican para ARNg, nucleasas y moldes donadores en células (por ejemplo, células T) usando métodos de transferencia de genes basados en virus y no basados en virus convencionales.

10 En algunas realizaciones, se suministra un polinucleótido tal como un ARNg, un ARNsg, un ARNm que codifica para una nucleasa o un molde donador a una célula usando un sistema de suministro de vector no viral. Los ejemplos de un sistema de suministro de vector no viral
15 incluyen, pero no se limitan a, un plásmido de ADN, un minicírculo de ADN, un ácido nucleico desnudo, un liposoma, una partícula de ribonucleoproteína (RNP) o un poloxámero. En algunas realizaciones, un método de introducción de polinucleótidos en una célula usando un sistema de suministro
20 de vector no viral incluye electroporación, lipofección, microinyección, biolística o captación mejorada por agente.

 En algunas realizaciones, se suministra un polinucleótido tal como un ARNg, un ARNsg, un ARNm que codifica para una nucleasa o un molde donador a una célula
25 usando un sistema de suministro de vector viral. Los ejemplos de un sistema de suministro de vector viral incluyen, pero no se limitan a, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores de adenovirus, vectores de poxvirus, vectores de herpesvirus y vectores de virus adenoasociado
30 (AAV).

En algunas realizaciones, se suministra un molde donador que codifica para un constructo de CAR a una célula como uno o más polinucleótidos. En algunas realizaciones, se suministra un molde donador que codifica para un constructo de CAR mediante un vehículo de suministro viral. En algunas realizaciones, un vehículo de suministro viral es un vector de virus adenoasociado (AAV).

En algunas realizaciones, se suministra una endonucleasa (por ejemplo, Cas9) a una célula como un polipéptido. En algunas realizaciones, se suministra una endonucleasa (por ejemplo, Cas9) a una célula por separado de un ácido nucleico que selecciona como diana el genoma (por ejemplo, un ARNg, un ARNsg). En algunas realizaciones, se suministra una endonucleasa (por ejemplo, Cas9) a una célula como un complejo con uno o más polinucleótidos que seleccionan como diana el genoma (por ejemplo, un ARNg, un ARNsg). En algunas realizaciones, se suministra una endonucleasa o una endonucleasa precomplejada mediante un vehículo de suministro no viral que incluye, pero no se limita a, una nanopartícula, un liposoma, una ribonucleoproteína, un péptido cargado positivamente, un conjugado de molécula pequeña-ARN, una quimera de aptámero-ARN o un complejo de proteína de fusión-ARN. En algunas realizaciones, un método de introducción de un polipéptido de endonucleasa o un polipéptido de endonucleasa precomplejado en una célula incluye electroporación, lipofección, microinyección, biolística o captación potenciada por agente.

En algunas realizaciones, un polipéptido Cas9 se compleja previamente con uno o más ARNsg para formar una partícula de ribonucleoproteína (RNP). En algunas

realizaciones, se formula una RNP de Cas9/ARNsg usando una nanopartícula lipídica. En algunas realizaciones, se formula un molde donador usando un vector de AAV. En algunas realizaciones, se realiza el suministro a una célula de una RNP de Cas9/ARNsg formulada mediante electroporación de la célula. En algunas realizaciones, se suministra un molde donador formulado como un vector de AAV antes de la electroporación. En algunas realizaciones, se suministra un molde donador formulado como un vector de AAV durante la electroporación. En algunas realizaciones, se suministra un molde donador formulado como un vector de AAV tras la electroporación.

En algunas realizaciones, una edición génica realizada usando una CRISPR/endonucleasa Cas9 da como resultado una célula T modificada por ingeniería genética con un gen TRAC alterado. En algunas realizaciones, una alteración de un gen TRAC da como resultado la expresión eliminada o disminuida del producto del gen TRAC. En algunas realizaciones, una alteración de un gen TRAC altera o inhibe la transcripción y traducción de un producto génico codificado. En algunas realizaciones, una alteración de un gen TRAC da como resultado la eliminación o disminución de la expresión de un producto del gen TRAC. En algunas realizaciones, la expresión eliminada o disminuida del gen TRAC está asociada con la pérdida de función del TCR. En algunas realizaciones, la pérdida de la función de TCR hace que una célula T modificada por ingeniería genética sea adecuada para el trasplante alogénico (es decir, minimiza el riesgo de inducción de GvHD). En algunas realizaciones, se crea una alteración de un gen TRAC insertando un CAR en el gen TRAC (por ejemplo, usando un vector de AAV y un molde donador). En algunas

realizaciones, se crea una alteración en la expresión del gen TRAC mediante ARNg que seleccionan como diana la región genómica de TRAC e insertando un CAR en el gen CAR. En algunas realizaciones, se proporciona la inserción de CAR
5 mediante un molde donador con brazos de homología que corresponden a las secuencias del TRAC que rodean el sitio de una DSB.

En algunas realizaciones, una edición génica realizada usando una CRISPR/endonucleasa Cas9 da como resultado una
10 célula T modificada por ingeniería genética con un gen $\beta 2M$ alterado. En algunas realizaciones, los ARNg que se dirigen a la región genómica B2M crean indels en el gen $\beta 2M$ que interrumpen o inhiben la transcripción y traducción de un producto génico codificado. En algunas realizaciones, una
15 alteración de un gen $\beta 2M$ da como resultado la expresión eliminada o disminuida del polipéptido $\beta 2M$. En algunas realizaciones, la expresión eliminada o disminuida del gen B2M está asociada con la pérdida de función del complejo de MHC I. En algunas realizaciones, la pérdida de la función
20 del MHC I hace que una célula T modificada por ingeniería genética sea adecuada para el trasplante alogénico (es decir, minimiza el riesgo de una respuesta del huésped contra una célula T alogénica). En algunas realizaciones, la pérdida de la función del MHC I da como resultado una persistencia
25 aumentada de una célula T modificada por ingeniería genética en un receptor alogénico.

En algunas realizaciones, una edición génica realizada usando una CRISPR/endonucleasa Cas9 da como resultado una célula T modificada por ingeniería genética con un gen CD70
30 alterado. En algunas realizaciones, los ARNg que se dirigen a la región genómica CD70 crean indels en el gen CD70 que

interrumpen o inhiben la transcripción y traducción de un producto génico codificado. En algunas realizaciones, una alteración de un gen CD70 da como resultado la expresión eliminada o disminuida del polipéptido CD70. En algunas realizaciones, la expresión eliminada o disminuida del polipéptido CD70 se asocia con una proliferación celular potenciada, persistencia *in vivo* potenciada, agotamiento disminuido y/o eficacia antitumoral potenciada.

En algunas realizaciones, una edición génica realizada usando una CRISPR/endonucleasa Cas9 da como resultado una célula T modificada por ingeniería genética con un gen PD-1 alterado. En algunas realizaciones, los ARNg que se dirigen a la región genómica PD-1 crean indels en el gen PD-1 que interrumpen o inhiben la transcripción y traducción de un producto génico codificado. En algunas realizaciones, una alteración de un gen PD-1 da como resultado la expresión eliminada o disminuida del polipéptido PD-1.

Métodos y composiciones

Se proporcionan en el presente documento, en algunas realizaciones, métodos para tratar el cáncer. Los ejemplos no limitativos de cánceres que pueden tratarse tal como se proporciona en el presente documento incluyen mieloma múltiple, leucemia (por ejemplo, Leucemia de células T, leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) y/o leucemia linfocítica crónica (C-CLL)), linfoma (por ejemplo, linfoma de células B no Hodgkin (B-NHL), linfoma de Hodgkin y/o linfoma de células T) y/o carcinoma de células renales de células claras (ccRCC). En alguna realización, los métodos comprenden suministrar las células CAR T (por ejemplo, células CAR T anti-BCMA, anti-CD19, anti-CD33 y/o anti-CD70) de la presente divulgación a un sujeto que tiene mieloma

múltiple, leucemia o linfoma. Otros ejemplos no limitativos de cánceres (por ejemplo, tumores sólidos) que pueden tratarse tal como se proporciona en el presente documento incluyen cáncer de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de tiroides, cáncer de nasofaringe, de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), glioblastoma y/o melanoma.

También se ha detectado CD70 en tumores hematológicos y carcinomas. El patrón de expresión restringido de CD70 en tejidos normales y su expresión generalizada en diversos tumores malignos lo convierte en una diana atractiva para terapias basadas en anticuerpos. El uso de la terapia con células CAR T para seleccionar como diana cánceres CD70⁺, sin embargo, es potencialmente problemático debido a la expresión de CD70 en las células T. Para abordar este posible problema, la presente divulgación también proporciona células CAR T que se han modificado por ingeniería genética para alterar la expresión de CD70 endógena mientras que al mismo tiempo expresan un resto de unión anti-CD70 (por ejemplo, un scFv anti-CD70).

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer CD70⁺. En otras realizaciones, el cáncer es un cáncer BCMA⁺. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer CD19⁺. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer CD33⁺. Debe entenderse que otros cánceres, que expresan otros antígenos de cáncer, pueden tratarse usando las células CAR T con desactivación de CD70 modificadas por ingeniería genética de la presente divulgación.

Los métodos, en algunas realizaciones, comprenden administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente que tiene un cáncer CD70⁺, un cáncer BCMA⁺, un cáncer CD19⁺ o un cáncer

CD33+) una población de células CAR T tal como se proporciona en el presente documento. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar a un sujeto una población de células CAR T que comprenden una desactivación del gen CD70.

5 En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar a un sujeto una población de células CAR T que comprenden una desactivación del gen CD70 y una desactivación del gen PD1. En algunas realizaciones, los métodos comprenden implantar las células en el sujeto. Esta etapa de

10 implantación puede llevarse a cabo usando cualquier método de implantación conocido en la técnica. Por ejemplo, las células modificadas por ingeniería genética pueden inyectarse directamente en la sangre de un sujeto o administrarse de otro modo al sujeto.

15 Tal como se demuestra en el presente documento, las células CAR T que comprenden una desactivación del gen CD70 presentan una proliferación extendida y un aumento de la persistencia *in vivo*. En algunas realizaciones, las células CAR T que comprenden una desactivación del gen CD70 presentan

20 una eficacia antitumoral aumentada en relación con células CAR T que expresan CD70 endógena. En algunas realizaciones, las células CAR T que comprenden una desactivación del gen CD70 presentan una eficacia antitumoral aumentada en tumores sólidos en relación con células CAR T que expresan CD70

25 endógena. Sin querer restringirse a la teoría, la persistencia *in vivo* aumentada de células CAR T que comprenden una desactivación del gen CD70 puede permitir la expansión de tumores sólidos y por tanto proporcionan una eficacia antitumoral potenciada en tales tumores en relación

30 con células CAR T que expresan CD70 endógena.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para tratar un tumor sólido con las células CAR T descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método para
5 tratar un tumor sólido con las células CAR T anti-CD70 descritas en el presente documento.

La etapa de administrar puede incluir la colocación (por ejemplo, trasplante) de células, por ejemplo, células T modificadas por ingeniería genética, en un sujeto, mediante
10 un método o vía que da como resultado la localización al menos parcial de las células introducidas en un sitio deseado, tal como un tumor, de manera que se produzca(n) el/los efecto(s) deseado(s). Pueden administrarse células T modificadas por ingeniería genética mediante cualquier vía
15 apropiada que dé como resultado el suministro a una ubicación deseada en el sujeto donde al menos una porción de las células implantadas o componentes de las células permanecen viables. El período de viabilidad de las células después de la administración a un sujeto puede ser tan breve como de
20 unas pocas horas, por ejemplo, veinticuatro horas, hasta unos pocos días, hasta tan largo como varios años o incluso el tiempo de vida el sujeto, es decir, injerto a largo plazo. Por ejemplo, en algunos aspectos descritos en el presente documento, se administra una cantidad eficaz de células T
25 modificadas por ingeniería genética por una vía de administración sistémica, tal como una vía intraperitoneal o intravenosa.

Un sujeto puede ser cualquier sujeto para el que se desee un diagnóstico, tratamiento o terapia. En algunos
30 aspectos, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Un donante es un individuo que no es el sujeto que está tratándose. Un donante es un individuo que no es el paciente. En algunas realizaciones, un donante es un individuo que no tiene o no se sospecha que tenga el cáncer que está
5 tratándose. En algunas realizaciones, se usan múltiples donantes, por ejemplo, dos o más donantes.

En algunas realizaciones, una población de células T modificadas por ingeniería genética que se administra de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento
10 comprende células T alogénicas de uno o más donantes. Alogénica se refiere a una célula, población de células o muestra biológica que comprende células, obtenida de uno o más donantes diferentes de la misma especie, donde los genes en uno o más locus no son idénticos a los del receptor (por
15 ejemplo, sujeto). Por ejemplo, una población de células T modificadas por ingeniería genética, que se administra a un sujeto, puede proceder de uno o más donantes no relacionados o de uno o más hermanos no idénticos. En algunas realizaciones, pueden usarse poblaciones de células
20 singénicas, tales como aquellas obtenidas de donantes genéticamente idénticos (por ejemplo, gemelos idénticos). En algunas realizaciones, las células son células autólogas; es decir, las células T modificadas por ingeniería genética se obtienen o se aíslan de un sujeto y se administran al mismo
25 sujeto, es decir, el donante y el receptor son el mismo.

Una cantidad eficaz se refiere a la cantidad de una población de células T modificadas por ingeniería genética necesaria para prevenir o aliviar al menos uno o más signos o síntomas de un estado médico (por ejemplo, cáncer), y se
30 refiere a una cantidad suficiente de una composición para proporcionar el efecto deseado, por ejemplo, para tratar a

un sujeto que tiene un estado médico. Una cantidad eficaz también incluye una cantidad suficiente para prevenir o retrasar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad, alterar el transcurso de un síntoma de la enfermedad (por ejemplo, pero sin limitación, a frenar la progresión de un
5 síntoma de la enfermedad) o revertir un síntoma de la enfermedad. Se entiende que para cualquier caso dado, puede determinarse una cantidad eficaz adecuada por un experto habitual en la materia usando experimentación rutinaria.

10 Para su uso en los diversos aspectos descritos en el presente documento, una cantidad eficaz de células (por ejemplo, células T modificadas por ingeniería genética) comprende al menos 10^2 células, al menos 5×10^2 células, al menos 10^3 células, al menos 5×10^3 células, al menos 10^4
15 células, al menos 5×10^4 células, al menos 10^5 células, al menos 2×10^5 células, al menos 3×10^5 células, al menos 4×10^5 células, al menos 5×10^5 células, al menos 6×10^5 células, al menos 7×10^5 células, al menos 8×10^5 células, al menos 9×10^5 células, al menos 1×10^6 células, al menos
20 2×10^6 células, al menos 3×10^6 células, al menos 4×10^6 células, al menos 5×10^6 células, al menos 6×10^6 células, al menos 7×10^6 células, al menos 8×10^6 células, al menos 9×10^6 células, o múltiplos de las mismas. Las células proceden de uno o más donantes o se obtienen de una fuente
25 autóloga. En algunos ejemplos descritos en el presente documento, las células se expanden en cultivo antes de su administración a un sujeto que lo necesite.

Los modos de administración incluyen inyección, infusión, instilación o ingestión. Inyección incluye, sin
30 limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular,

intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transcraneal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebroespinal e intraesternal. En algunas realizaciones, la vía es intravenosa.

En algunas realizaciones, las células T modificadas por ingeniería genética se administran sistémicamente, lo que se refiere a la administración de una población de células que no sea directamente en un sitio, tejido u órgano diana, de manera que entra, en cambio, en el sistema circulatorio del sujeto y, por tanto, se somete al metabolismo y otros procesos similares.

La eficacia de un tratamiento que comprende una composición para el tratamiento de una afección médica puede determinarse por el profesional sanitario experto. Un tratamiento se considera un "tratamiento eficaz" en caso de que uno cualquiera o todos los signos o síntomas, como un ejemplo, los niveles de diana funcional se alteran de un modo beneficioso (por ejemplo, aumenta en al menos un 10%) o se mejoran o alivian otros síntomas o marcadores de enfermedad (por ejemplo, cáncer) clínicamente aceptados. La eficacia puede medirse también por la incapacidad de un sujeto para empeorar tal como se evalúa mediante la hospitalización o necesidad de intervenciones médicas (por ejemplo, la progresión de la enfermedad se detiene o al menos se ralentiza). Los métodos para medir estos indicadores son conocidos por los expertos en la materia y/o se describen en el presente documento. El tratamiento incluye cualquier tratamiento de una enfermedad en el sujeto e incluye: (1) inhibir la enfermedad, por ejemplo, detener o frenar la progresión de síntomas; o (2) aliviar la enfermedad, por

ejemplo, provocar la regresión de los síntomas; y (3) prevenir o reducir la probabilidad de desarrollo de los síntomas.

También se abarcan terapias de combinación por la presente divulgación. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos frente a CD70 y/o CD27 para unirse a y/o modular la actividad de CD70 y/o CD27 sobre células CAR T y promover una disminución del agotamiento, una expansión de células CAR T potenciada y un aumento de la eficacia de la destrucción de células cancerosas. Por tanto, pueden administrarse anticuerpos frente a CD70 y/o CD27 con cualquier célula CAR T conocida en la técnica para mejorar la función de células CAR T. Por ejemplo, cualquiera de las células T modificadas por ingeniería genética proporcionadas en la presente puede administrarse en combinación con anticuerpos anti-CD70, anticuerpos anti-CD27 o una combinación de anticuerpos anti-CD70 y anticuerpos anti-CD27. En algunas realizaciones, se administran células T $TRAC^{-}/\beta 2M^{-}$ CAR⁺ (por ejemplo, CAR anti-CD70 o CAR anti-BCMA) en combinación con anticuerpos anti-CD70 y/o anti-CD27. En algunas realizaciones, se administran células T $TRAC^{-}/\beta 2M^{-}/PD-1^{-}/CD70^{-}$ CAR⁺ (por ejemplo, CAR anti-CD70 CAR o anti-BCMA) en combinación con anticuerpos anti-CD70 y/o anti-CD27. En algunas realizaciones, se administran células T $TRAC^{-}/\beta 2M^{-}/PD-1^{-}$ CAR⁺ (por ejemplo, CAR anti-CD70 CAR o anti-BCMA) en combinación con anticuerpos anti-CD70 y/o anti-CD27. En algunas realizaciones, se administran células T $TRAC^{-}/\beta 2M^{-}/CD70^{-}$ CAR⁺ (por ejemplo, CAR anti-CD70 CAR o anti-BCMA) en combinación con anticuerpos anti-CD70 y/o anti-CD27. En algunas realizaciones, los anticuerpos administrados en combinación pueden ser Varlilumab.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método de reducción del agotamiento de células T que comprende alterar el gen *CD70* en las células T. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método de aumento de la proliferación de células T que comprende alterar el gen *CD70* en las células T. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método de aumento de la citotoxicidad de células T que comprende alterar el gen *CD70* en las células T. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un método de superación del efecto inhibitor de un punto de control inmunitario (por ejemplo, PD-1) en células T que comprende alterar el gen *CD70* en las células T.

Otras realizaciones

La divulgación se refiere a las siguientes realizaciones. A lo largo de esta sección, el término realización se abrevia como 'E' seguido de un ordinal. por ejemplo, E1 es equivalente a Realización 1.

E1. Una célula T modificada por ingeniería genética que comprende un gen *CD70* alterado, un gen de muerte celular programada-1 (*PD-1*) alterado y un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR).

E2. Una célula T modificada por ingeniería genética que comprende un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a *CD70*.

E3. Una célula T modificada por ingeniería genética que comprende un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) que no se une a *CD70*.

- E4. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 2 o 3, que comprende además un gen *PD-1* alterado.
- E5. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 1-4 que comprende además un
5 gen de región constante de cadena alfa de receptor de células T (*TRAC*) alterado.
- E6. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 1-5 que comprende además un gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$) alterado.
- 10 E7. Una célula T modificada por ingeniería genética, que comprende
un gen de región constante de cadena alfa de receptor de células T (*TRAC*) alterado;
un gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$) alterado;
15 un gen *CD70* alterado; y
un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (*CAR*).
- E8. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 7, en la que el ácido nucleico que codifica para
20 el *CAR* se inserta en el gen *TRAC*.
- E9. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 7 u 8, que comprende además un gen *PD-1* alterado.
- E10. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 1-9, en la que el *CAR*
25 comprende un ectodominio que comprende un anticuerpo anti-*CD70*, opcionalmente en la que el anticuerpo anti-*CD70* es un fragmento variable de cadena sencilla (*scFv*) anti-*CD70*.
- E11. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 10, en la que el *scFv* anti-*CD70* comprende las
30 mismas regiones determinantes de complementariedad (*CDR*) de región variable de cadena pesada (*VH*) y las mismas *CDR* de

región variable de cadena ligera (VL) que un anticuerpo de referencia, en la que el anticuerpo de referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 51 y una VL expuesta como SEQ ID NO: 52.

5 E12. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 11, en la que el scFv anti-CD70 comprende las mismas cadenas VH y VL que el anticuerpo de referencia.

E13. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 11, en la que el scFv anti-CD70 comprende la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 o 50.

E14. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 11, en la que el scFv anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

E15. La célula T modificada por ingeniería genética de una
15 cualquiera de las realizaciones 1-9, en la que el CAR comprende un ectodominio que comprende un anticuerpo anti-BCMA, opcionalmente en la que el anticuerpo anti-BCMA es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-BCMA.

E16. La célula T modificada por ingeniería genética de la
20 realización 15, en la que el scFv anti-BCMA comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH y las mismas CDR de VL que un anticuerpo de referencia, en la que el anticuerpo de referencia comprende una VH) expuesta como SEQ ID NO: 60 y una VL expuesta como SEQ ID
25 NO: 61.

E17. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 16, en la que el scFv anti-BCMA comprende las mismas cadenas VH y VL que el anticuerpo de referencia.

E18. La célula T modificada por ingeniería genética de la
30 realización 16, en la que el scFv anti-BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

- E19. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 1-18, en la que el CAR comprende un dominio coestimulador CD28 o 41BB y opcionalmente un dominio de señalización CD3ζ.
- 5 E20. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 5-19, en la que el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 44 o 55 y/o el ácido nucleico que codifica para el CAR comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 45 o 56.
- 10 E21. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 6-20, en la que el gen $\beta 2M$ alterado comprende al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 9-14.
- E22. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 1-21, en la que la célula T modificada por ingeniería genética mantiene la citotoxicidad después de 5 reexposiciones con una célula cancerosa.
- 15 E23. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 22, en la que la célula T modificada por ingeniería genética mantiene la citotoxicidad después de 10 reexposiciones con una célula cancerosa.
- 20 E24. Una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética que comprenden un gen *CD70* alterado, un gen de muerte celular programada-1 (PD-1) alterado y un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR).
- 25 E25. Una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética que comprenden un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) que se une a CD70.
- 30

- E26. Una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética que comprenden un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR) que no se une a *CD70*.
- 5 E27. La población de células de la realización 25 o 26 que comprende además un gen de muerte celular programada-1 (*PD-1*) alterado.
- E28. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-27 que comprende además un gen de región constante de cadena alfa de receptor de células T (*TRAC*)
- 10 alterado.
- E29. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-28 que comprende además un gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$) alterado.
- 15 E30. Una población de células que comprende
células T modificadas por ingeniería genética que comprenden
un gen de región constante de cadena alfa de receptor de células T (*TRAC*) alterado;
20 un gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$) alterado;
un gen *CD70* alterado; y
un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR).
- E31. La población de células de la realización 30, en la que
- 25 el ácido nucleico que codifica para el CAR se inserta en el gen *TRAC*.
- E32. La población de células de la realización 30 o 31, en la que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden además un gen de muerte celular programada-1 (*PD-*
- 30 1) alterado.

E33. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24 o 27-32, en la que el CAR comprende un ectodominio que comprende un anticuerpo anti-CD70, opcionalmente en la que el anticuerpo anti-CD70 es un
5 fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-CD70.

E34. La población de células de la realización 33, en la que el scFv anti-CD70 comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH y las mismas CDR de VL que un anticuerpo de referencia, en la que el
10 anticuerpo de referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 51 y una VL expuesta como SEQ ID NO: 52.

E35. La población de células de la realización 34, en la que el scFv anti-CD70 comprende las mismas cadenas VH y VL que el anticuerpo de referencia.

E36. La población de células de la realización 35, en la que el scFv anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de
15 SEQ ID NO: 48 o 50.

E37. La población de células de la realización 35, en la que el scFv anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de
20 SEQ ID NO: 50.

E38. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-32, en la que el CAR comprende un ectodominio que comprende un anticuerpo anti-BCMA, opcionalmente en la que el anticuerpo anti-BCMA es un
25 fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-BCMA.

E39. La población de células de la realización 38, en la que el scFv anti-BCMA comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH y las mismas CDR de VL que un anticuerpo de referencia, en la que el
30 anticuerpo de referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 60 y una VL expuesta como SEQ ID NO: 61.

E40. La población de células de la realización 39, en la que el scFv anti-BCMA comprende las mismas cadenas VH y VL que el anticuerpo de referencia.

5 E41. La población de células de la realización 39, en la que el scFv anti-BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

E42. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 28-41, en la que el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 44 o 55 y/o el ácido nucleico que codifica para el CAR comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 45 o 56.

10 E43. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 29-42, en la que el gen $\beta 2M$ alterado comprende al menos una secuencia de nucleótidos seleccionada de una cualquiera de SEQ ID NO: 9-14.

E44. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-43, en la que al menos el 50% de las células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable de proteína de superficie TCR, no expresan un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$, no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70, no expresan un nivel detectable de proteína de superficie PD-1 y/o expresan un nivel detectable del CAR.

20 E45. La población de células de la realización 44, en la que el 50%-70% de las células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable de proteína de superficie TCR, no expresan un nivel detectable de proteína de superficie $\beta 2M$, no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70, no expresan un nivel detectable de proteína de superficie PD-1 y/o expresan un nivel detectable del CAR.

30

5 E46. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 28-45, en la que al menos el 90%, opcionalmente el 90%-100%, de las células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable de proteína de superficie TCR.

10 E47. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 29-46, en la que al menos el 60%, opcionalmente el 60%-75%, de las células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable de proteína de superficie β 2M.

15 E48. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-47, en la que al menos el 80%, opcionalmente el 80%-100%, de las células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable de proteína de superficie CD70.

E49. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 1-48, en la que al menos el 80%, opcionalmente el 80%-95%, de las células T modificadas por ingeniería genética no expresan un nivel detectable del CAR.

20 E50. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-49, en la que las células T modificadas por ingeniería genética presentan al menos el 20% más de capacidad proliferativa celular, en relación con células T de control.

25 E51. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-50, en la que las células T modificadas por ingeniería genética presentan al menos el 20% más de capacidad de lisis celular, en relación con células T de control.

30 E52. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-51, en la que el nivel de citocinas

secretadas por las células T modificadas por ingeniería genética es al menos 2 veces mayor que el nivel de citocinas secretadas por células T de control.

5 E53. La población de una cualquiera de las realizaciones 24-52, en la que las células T modificadas por ingeniería genética presentan un agotamiento celular reducido, en relación con células T de control.

10 E54. La población de células de la realización 53, en la que las células T modificadas por ingeniería genética expresan niveles reducidos de LAG3, en relación con células T de control.

15 E55. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 54, en la que las células T de control son células T modificadas por ingeniería genética que expresan proteína CD70 endógena.

E56. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-55, en la que las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la proliferación dependiente de citocinas.

20 E57. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-56, en la que las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de 5 reexposiciones con una célula cancerosa.

25 E58. La población de células de la realización 47, en la que las células T modificadas por ingeniería genética mantienen la citotoxicidad después de 10 reexposiciones con una célula cancerosa.

30 E59. Un método que comprende administrar a un sujeto la población de células de una cualquiera de las realizaciones 24-58.

E60. El método de la realización 59, en el que las células T modificadas por ingeniería genética son células T humanas modificadas por ingeniería genética.

5 E61. El método de la realización 59 o 60, en el que el sujeto tiene un cáncer.

E62. El método de la realización 61, en el que el cáncer expresa CD70 y/o BCMA.

10 E63. El método de una cualquiera de las realizaciones 59-62, en el que la población de células se administra al sujeto en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

E64. El método de una cualquiera de las realizaciones 59-63, en el que el cáncer es un tumor maligno sólido o un tumor maligno hematológico.

15 E65. El método de la realización 64, en el que el tumor maligno sólido se selecciona del grupo que consiste en: tumor de ovario, tumor pancreático, tumor de riñón, tumor de pulmón y tumor intestinal.

20 E66. El método de la realización 63, en el que la población de células se administra al sujeto en una cantidad eficaz para reducir el volumen de un tumor en el sujeto.

E67. Un método para producir una célula T modificada por ingeniería genética, comprendiendo el método

- 25 (a) suministrar a una célula T
una nucleasa guiada por ARN,
un ARNg que selecciona como diana un gen *CD70*, y
un vector que comprende un molde donador que
comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR;
y
- 30 (b) producir una célula T modificada por ingeniería
genética que comprende un gen *CD70* alterado y que
expresa el CAR.

E68. El método de la realización 67, que comprende además en la etapa (a) suministrar a la célula T un ARNg que selecciona como diana un gen *PD-1*; en el que la célula T modificada por ingeniería genética de la etapa (b) comprende además un gen *PD-1* alterado.

E69. El método de la realización 67 o la realización 68, que comprende además en la etapa (a) suministrar a la célula T un ARNg que selecciona como diana un gen *TRAC*; en el que la célula T modificada por ingeniería genética de la etapa (b) comprende además un gen *TRAC* alterado.

E70. El método de la realización 69, en el que el ácido nucleico que codifica para el CAR está flanqueado por brazos de homología izquierdo y derecho al locus del gen *TRAC*; y en el que la célula T modificada por ingeniería genética de la etapa (b) comprende el ácido nucleico que codifica para el CAR insertado en el locus del gen *TRAC*.

E71. El método de una cualquiera de las realizaciones 67-70, que comprende además en la etapa (a) suministrar a la célula T un ARNg que selecciona como diana un gen $\beta 2M$; en el que la célula T modificada por ingeniería genética de la etapa (b) comprende además un gen $\beta 2M$ alterado.

E72. Un método para producir una célula T modificada por ingeniería genética, comprendiendo el método

(a) suministrar a una célula T
una nucleasa guiada por ARN,
un ARNg que selecciona como diana un gen *TRAC*,
un ARNg que selecciona como diana un gen $\beta 2M$,
un ARNg que selecciona como diana un gen *CD70*, y
un vector que comprende un molde donador que comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR; y

(b) producir una célula T modificada por ingeniería genética.

5 E73. El método de la realización 72, en el que el ácido nucleico que codifica para el CAR está flanqueado por brazos de homología izquierdo y derecho al locus del gen *TRAC*.

E74. El método de la realización 72 o 73 que comprende además suministrar a la célula T un ARNg que selecciona como diana un gen *PD-1*.

10 E75. El método de una cualquiera de las realizaciones 67-74, en el que la nucleasa guiada por ARN es una nucleasa Cas9, opcionalmente una nucleasa Cas9 de *S. pyogenes*.

E76. El método de una cualquiera de las realizaciones 69-75, en el que el ARNg que selecciona como diana el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 98 o
15 selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 118, y opcionalmente en las que el ARNg que selecciona como diana el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30.

E77. El método de una cualquiera de las realizaciones 71-76, en el que el ARNg que selecciona como diana el gen $\beta 2M$
20 comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 99 o selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 119, y opcionalmente en las que el ARNg que selecciona como diana el gen $\beta 2M$ comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 31.

E78. El método de una cualquiera de las realizaciones 67-77, en e que el ARNg que selecciona como diana el gen *CD70* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 94 o 95
30 o selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 114 o 115, y opcionalmente en las que el ARNg que

selecciona como diana el gen *CD70* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26 o 27.

5 E79. El método de una cualquiera de las realizaciones 68-71 y 74-78, en el que el ARNg que selecciona como diana el gen *PD-1* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 100 o selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 120, y opcionalmente en el que el ARNg que selecciona como diana el gen *PD-1* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 32.

10 E80. El método de una cualquiera de las realizaciones 67-79, en el que el CAR comprende un ectodominio que comprende un anticuerpo anti-CD70, opcionalmente en el que el anticuerpo anti-CD70 es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-CD70.

15 E81. El método de la realización 80, en el que el scFv anti-CD70 comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH y las mismas CDR de VL que un anticuerpo de referencia, en el que el anticuerpo de referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 51 y
20 una VL expuesta como SEQ ID NO: 52.

E82. El método de la realización 81, en el que el scFv anti-CD70 comprende las mismas cadenas VH y VL que el anticuerpo de referencia.

25 E83. El método de la realización 81, en el que el scFv anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 o 50.

E84. El método de la realización 81, en el que el scFv anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

30 E85. El método de una cualquiera de las realizaciones 67-79, en el que el CAR comprende un ectodominio que comprende un anticuerpo anti-BCMA, opcionalmente en la que el anticuerpo

anti-BCMA es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-BCMA.

5 E86. El método de la realización 85, en el que el scFv anti-BCMA comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH y las mismas CDR de VL que un anticuerpo de referencia, en e que el anticuerpo de referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 60 y una VL expuesta como SEQ ID NO: 61.

10 E87. El método de la realización 86, en el que el scFv anti-BCMA comprende las mismas cadenas VH y VL que el anticuerpo de referencia.

E88. El método de la realización 86, en el que el scFv anti-BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

15 E89. El método de una cualquiera de las realizaciones 67-88, en el que el CAR comprende además un dominio coestimulador CD28 o 41BB y opcionalmente un dominio de señalización CD3z.

E90. El método de la realización 72, en el que el vector comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46.

20 E91. El método de la realización 72, en el que el vector comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57.

25 E92. Una célula T modificada por ingeniería genética que comprende una nucleasa guiada por ARN y un ARNg que selecciona como diana un gen *CD70*, opcionalmente en la que el ARNg que selecciona como diana el gen *CD70* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 94 o 95 o selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 114 o 115, y opcionalmente en las que el ARNg que selecciona como
30 diana el gen *CD70* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26 o 27.

5 E93. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 92 que comprende además un ARNg que selecciona como diana un gen *PD-1*, opcionalmente en el que el ARNg que selecciona como diana el gen *PD-1* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 100 o selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 120, y opcionalmente en las que el ARNg que selecciona como diana el gen *PD-1* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 32.

10 E94. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 92 o 93 que comprende además un ARNg que selecciona como diana un gen *TRAC*, opcionalmente en la que el ARNg que selecciona como diana el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 98 o selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 118, y
15 opcionalmente en la que el ARNg que selecciona como diana el gen *TRAC* comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30.

E95. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 92-94 que comprende además
20 un ARNg que selecciona como diana un gen $\beta 2M$, opcionalmente en la que el ARNg que selecciona como diana el gen $\beta 2M$ comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 99 o selecciona como diana la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 119, y opcionalmente en las que el ARNg que selecciona
25 como diana el gen $\beta 2M$ comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 31.

E96. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 92-95, en la que la nucleasa guiada por ARN es una nucleasa Cas9, opcionalmente una
30 nucleasa Cas9 de *S. pyogenes*.

E97. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 92-96 que comprende además un vector que comprende un molde donador que comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR, opcionalmente en la
5 que el ácido nucleico que codifica para el CAR está flanqueado por brazos de homología izquierdo y derecho al locus del gen *TRAC*.

E98. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 97, en la que el CAR comprende un ectodominio
10 que comprende un anticuerpo anti-CD70, opcionalmente en la que el anticuerpo anti-CD70 es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-CD70.

E99. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 98, en la que el scFv anti-CD70 comprende las
15 mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH y las mismas CDR de VL que un anticuerpo de referencia, en la que el anticuerpo de referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 51 y una VL expuesta como SEQ ID NO: 52.

20 E100. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 99, en la que el scFv anti-CD70 comprende las mismas cadenas VH y VL que el anticuerpo de referencia.

E101. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 99, en la que el scFv anti-CD70 comprende la
25 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 o 50.

E102. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 99, en la que el scFv anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

E103. La célula T modificada por ingeniería genética de la
30 realización 97, en la que el CAR comprende un ectodominio que comprende un anticuerpo anti-BCMA, opcionalmente en la

que el anticuerpo anti-BCMA es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-BCMA.

5 E104. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 103, en la que el scFv anti-BCMA comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH y las mismas CDR de VL que un anticuerpo de referencia, en la que el anticuerpo de referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 60 y una VL expuesta como SEQ ID NO: 61.

10 E105. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 104, en la que el scFv anti-BCMA comprende las mismas cadenas VH y VL que el anticuerpo de referencia.

15 E106. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 104, en la que el scFv anti-BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

E107. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 97, en la que el vector comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 o 57.

20 E108. Un método de aumento de la proliferación o reducción del agotamiento de células T, comprendiendo el método alterar el gen *CD70* en las células T.

E109. El método de la realización 108 que comprende además alterar en las células T al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: gen de muerte celular programada-1 (*PD-1*), gen de región constante de cadena alfa de receptor de células T (*TRAC*) y gen de beta-2-microglobulina ($\beta 2M$).

25 E110. El método de una cualquiera de las realizaciones 108-109 que comprende además expresar en las células T un ácido nucleico que codifica para un receptor de antígeno quimérico (CAR).

30

E111. El método de una cualquiera de las realizaciones 108-110, en el que el gen *CD70* se altera mediante edición génica por CRISPR/Cas.

5 E112. El método de una cualquiera de las realizaciones 110-111, en el que el gen *PD-1*, *TRAC* y/o *β2M* se altera mediante edición génica por CRISPR/Cas.

E113. Un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al paciente una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden un gen *CD70* alterado y un ácido nucleico que codifica para un CAR, tratando de ese modo el cáncer en el sujeto.

15 E114. El método de la realización 113, en el que el CAR se une a *CD70*.

E115. El método de la realización 113, en el que el CAR no se une a *CD70*.

20 E116. El método de una cualquiera de las realizaciones 113-115, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden además un gen *TRAC* alterado.

E117. El método de una cualquiera de las realizaciones 113-116, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden además un gen *B2M* alterado.

25 E118. El método de una cualquiera de las realizaciones 113-116, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden además un gen *PD-1* alterado.

E119. Un método para tratar cáncer en un sujeto, que comprende administrar al paciente una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en el que las células T modificadas por ingeniería genética comprenden:

- (i) un gen TRAC alterado;;
- (ii) un gen B2M alterado;
- (iii) un gen CD70 alterado; y
- (iv) un ácido nucleico que codifica para un CAR;

5 tratando de ese modo el cáncer en el sujeto.

E120. El método de una cualquiera de las realizaciones 113-114 y 116-119, en el que el CAR comprende (a) un ectodominio que comprende un fragmento de unión a antígeno anti-CD70, (b) un dominio transmembrana CD8 y (c) un endodominio que
10 comprende un dominio coestimulador 41BB y un dominio coestimulador CD3z.

E121. El método de la realización 119 o 120, en el que el gen TRAC alterado comprende el ácido nucleico que codifica para el CAR.

15 E122. El método de una cualquiera de las realizaciones 120-121, en el que el anticuerpo anti-CD70 es un scFv anti-CD70.

E123. El método de la realización 122, en el que el scFv anti-CD70 comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de región variable de cadena pesada
20 (VH) y las mismas CDR de región variable de cadena ligera (VL) que un anticuerpo de referencia, en la que el anticuerpo de referencia comprende una VH expuesta como SEQ ID NO: 51 y una VL expuesta como SEQ ID NO: 52.

E124. El método de la realización 123, en el que el scFv anti-CD70 comprende las mismas cadenas VH y VL que el
25 anticuerpo de referencia.

E125. El método de la realización 122, en el que el scFv anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 o 50.

30

E126. El método de la realización 122, en el que el scFv anti-CD70 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50.

5 E127. El método de una cualquiera de las realizaciones 113 y 115-118, en el que el CAR comprende un ectodominio que comprende un anticuerpo anti-BCMA, opcionalmente en la que el anticuerpo anti-BCMA es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-BCMA.

10 E128. El método de la realización 127, en el que el scFv anti-BCMA comprende las mismas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de VH y las mismas CDR de VL que un anticuerpo de referencia, en la que el anticuerpo de referencia comprende una VH) expuesta como SEQ ID NO: 60 y una VL expuesta como SEQ ID NO: 61.

15 E129. El método de la realización 128, en el que el scFv anti-BCMA comprende las mismas cadenas VH y VL que el anticuerpo de referencia.

20 E130. El método de la realización 127, en el que el scFv anti-BCMA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59.

E131. El método de una cualquiera de las realizaciones 113-130, en el que las células T modificadas por ingeniería genética son células T humanas modificadas por ingeniería genética.

25 E132. El método de una cualquiera de las realizaciones 113-131, en el que el cáncer expresa CD70 y/o BCMA.

E133. El método de una cualquiera de las realizaciones 113-132, en el que la población de células se administra al sujeto en una cantidad eficaz para tratar el cáncer.

30

E134. El método de una cualquiera de las realizaciones 113-133, en el que el cáncer es un tumor maligno sólido o un tumor maligno hematológico.

5 E135. El método de la realización 134, en el que el tumor maligno sólido se selecciona del grupo que consiste en: tumor de ovario, tumor pancreático, tumor de riñón, tumor de pulmón y tumor intestinal.

E136. Una población de células que comprenden células T modificadas por ingeniería genética, en la que las células
10 T modificadas por ingeniería genética comprenden:

(i) un gen TRAC alterado;;

(ii) un gen de beta-2-microglobulina (B2M) alterado;

(iii) un gen CD70 alterado

(iv) un ácido nucleico que codifica para un CAR que
15 comprende (a) un ectodominio que comprende un fragmento de unión a antígeno anti-CD70, (b) un dominio transmembrana CD8 y (c) un endodominio que comprende un dominio coestimulador 41BB y un dominio coestimulador CD3z.

E137. La población de células de la realización 136, en la
20 que el gen TRAC alterado comprende el ácido nucleico que codifica para el CAR.

E138. La población de células de una cualquiera de las realizaciones 136-137, en la que las células T modificadas por ingeniería genética con células T humanas.

25 E139. Una célula T modificada por ingeniería genética que comprende:

(i) un gen TRAC alterado, en el que el gen TRAC alterado comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:
30 46;

(ii) un gen B2M alterado; y

(iii) un gen CD70 alterado.

E140. La célula T modificada por ingeniería genética de la realización 139, en la que el ácido nucleico que codifica para el CAR comprende una secuencia al menos el 80%, al menos
5 el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 45.

E141. Una célula T modificada por ingeniería genética que comprende:

(i) un gen TRAC alterado, en el que el gen TRAC alterado
10 comprende un ácido nucleico que codifica para un CAR, en el que la secuencia de ácido nucleico es al menos el 90% idéntica a SEQ ID NO: 45;

(ii) un gen B2M alterado; y

(iii) un gen CD70 alterado.

15 E142. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 139-141, en la que el gen TRAC alterado comprende una secuencia donadora que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 44.

20 E143. Una célula T modificada por ingeniería genética que comprende:

(i) un gen TRAC alterado que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 44;

(ii) un gen B2M alterado; y

25 (iii) un gen CD70 alterado.

E144. La célula T modificada por ingeniería genética de una cualquiera de las realizaciones 139-143, en la que la célula T es una célula T humana.

EJEMPLOS

30 **Ejemplo 1. Desactivación eficaz de CD70 mediante RNP de Cas9:ARNsg en células T**

Este ejemplo describe la edición eficaz del gen *CD70* en células T humanas primarias *ex vivo* usando edición génica por CRISPR/Cas9. Se usaron segmentos genómicos el gen *CD70* que contienen los primeros tres (3) exones que codifican para la proteína como entrada en el software de diseño de ARNg. Los segmentos genómicos también incluyeron secuencias aceptoras/donantes de sitio de corte y empalme flanqueantes. Los ARNg deseados fueron aquellos que podrían dar lugar a inserciones o deleciones en la secuencia codificante, que alteran la secuencia de aminoácidos de *CD70*, que conducen a alelo(s) fuera de marco/de pérdida de función (denominados alelos "con desactivación de *CD70*"). Se sintetizaron las siete (7) secuencias de espaciador de ARNg identificadas *in silico* que seleccionan como diana el gen *CD70*, y los ARNg se modificaron específicamente, tal como se indica en la **Tabla 5**. Aunque los ARNg en la **Tabla 5** se modificaron con modificaciones de 2'-O-metilfosforotioato, pueden usarse ARNg no modificados, o ARNg con otras modificaciones. Véase también el documento PCT/IB2018/001619, presentado el 11 de mayo de 2018, incorporado en el presente documento en su totalidad mediante esta referencia.

Tabla 5. Secuencias de ARNg de *CD70*/secuencias diana

Secuencias de ARNg		
Nombre	Secuencia no modificada	Secuencia modificada
ARNsg de <i>CD70</i> (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACCA AUuuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguuaucaacuu	U*C*A*CCAAGCCCGCGA CCAAUguuuuagagcuag aaauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucaa

		gaaaaagugggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 23)	cuugaaaaagugggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 33)
5	Espaciador de ARNsg de CD70 (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACCA AU (SEQ ID NO: 91)	U*C*A*CCAAGCCCGCGA CCAAU (SEQ ID NO: 101)
10	ARNsg de CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGACC AAguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguuaucaacuu gaaaaagugggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 24)	A*U*C*ACCAAGCCCGCG ACCAAguuuagagcuag aaauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucaa cuugaaaaagugggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 34)
15	Espaciador de ARNsg de CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGACC AA (SEQ ID NO: 92)	A*U*C*ACCAAGCCCGCG ACCAA (SEQ ID NO: 102)
20	ARNsg de CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCCU AUguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguuaucaacuu gaaaaagugggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 25)	C*G*G*UGCGGCGCAGGC CCUAUguuuuagagcuag aaauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucaa cuugaaaaagugggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 35)
25	Espaciador de ARNsg de CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCCU AU (SEQ ID NO: 93)	C*G*G*UGCGGCGCAGGC CCUAU (SEQ ID NO: 103)
30	ARNsg de CD70 (E1_T7)); también denominado: T7	GCUUUGGUCCCAUUGGUC GCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguuaucaacuu	G*C*U*UUGGUCCCAUUG GUCGCguuuuagagcuag aaauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucaa

		gaaaaagugggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 26)	cuugaaaaagugggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 36)
5	Espaciador de ARNsg de CD70 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGUC GC (SEQ ID NO: 94)	G*C*U*UUGGUCCCAUUG GUCGC (SEQ ID NO: 104)
10	ARNsg de CD70 (E1_T8); también denominado: T8	GCCCGCAGGACGCACCCA UAguuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguaucaacuu gaaaaagugggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 27)	G*C*C*CGCAGGACGCAC CCAUAguuuuagagcuag aaauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguaucaaa cuugaaaaagugggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 37)
15	Espaciador de ARNsg de CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCA UA (SEQ ID NO: 95)	G*C*C*CGCAGGACGCAC CCAUA (SEQ ID NO: 105)
20	ARNsg de CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCGC ACguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguaucaacuu gaaaaagugggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 28)	G*U*G*CAUCCAGCGCUU CGCACguuuuagagcuag aaauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguaucaaa cuugaaaaagugggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 38)
25	Espaciador de ARNsg de CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCGC A C (SEQ ID NO: 96)	G*U*G*CAUCCAGCGCUU CGCAC (SEQ ID NO: 106)
30	ARNsg de CD70 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCGU GAguuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguaucaacuu	C*A*G*CUACGUAUCCA CGUGAguuuagagcuag aaauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguaucaaa

		gaaaaagugggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 29)	cuugaaaaagugggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 39)
5	Espaciador de ARNsg de CD70 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCGU GA (SEQ ID NO: 97)	C*A*G*CUACGUAUCCA CGUGA (SEQ ID NO: 107)
Secuencias diana			
	Nombre	Secuencia diana (PAM)	
10	ARNsg de CD70 (E1_T1)	TCACCAAGCCCGCGACCAAT (GGG) (SEQ ID NO: 111)	
	ARNsg de CD70 (E1_T3)	ATCACCAAGCCCGCGACCAA (TGG) (SEQ ID NO: 112)	
	ARNsg de CD70 (E1_T4)	CGGTGCGGCGCAGGCCCTAT (GGG) (SEQ ID NO: 113)	
15	ARNsg de CD70 (E1_T7)	GCTTTGGTCCCATTTGGTCGC (GGG) (SEQ ID NO: 114)	
	ARNsg de CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCATA (GGG) (SEQ ID NO: 115)	
20	ARNsg de CD70 (E1_T10)	GTGCATCCAGCGCTTCGCAC (AGG) (SEQ ID NO: 116)	
	ARNsg de CD70 (E3_T1)	CAGCTACGTATCCATCGTGA (TGG) (SEQ ID NO: 117)	
	ARNsg de TRAC	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC (TGG) (SEQ ID NO: 118)	
25	ARNsg de β 2M	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC (TGG) (SEQ ID NO: 119)	
	ARNsg de PD-1	CTGCAGCTTCTCCAACACAT (CGG) (SEQ ID NO: 120)	

30 *: Residuo de 2'-O-metilfosforotioato

Se transfectaron células T humanas primarias (sometidas a electroporación) con una partícula de ribonucleoproteína (RNP) que contiene nucleasa Cas9 y un ARNg modificado sintético que selecciona como diana el gen *CD70* (secuencias en la **Tabla 5**) o controles (sin Cas9, sin ARNg). De cuatro a seis (4-6) días después de la transfección, las células (1) se sometieron a un análisis TIDE para evaluar la frecuencia de indels y (2) se procesaron mediante citometría de flujo (anticuerpo primario: Anticuerpo anti-CD70 humano FITC, clon 113-16, Biolegend) para evaluar los niveles de expresión de CD70 en la superficie celular.

Siete (7) ARNg produjeron datos medibles mediante el análisis TIDE, tal como se indica en la **Tabla 6**. Cuatro (4) secuencias de ARNg produjeron porcentajes de indels (frecuencias de edición) por encima del 85% con una reducción de la expresión de proteínas por encima del 80% (SEQ ID NO: 23, 26, 27 y 29), indicando una edición génica altamente eficaz. Los datos en la **Tabla 6** son de un (1) donante. El nivel de expresión de la proteína CD70 (evaluado por la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI)) por muestra de prueba se normalizó al nivel de expresión de la proteína CD70 presente en células de control.

Tabla 6. Secuencias de ARNg de CD70, eficacias de corte y expresión de proteína de superficie CD70 en células T sometidas a edición génica

5		Nombre del ARNg	Secuencia espaciadora de ARNg	% de inde ls	R²	Inactiv ación de la expresi ón proteic a, %
10		EXÓN1_T1 de CD70 (E1_T1)	UCACCAAGCCCCGCGACCAA U (SEQ ID NO: 91)	89.3 %	0.9 7	84.8%
		EXÓN1_T3 de CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCCGCGACCA A (SEQ ID NO: 92)	65.2 %	0.9 3	84.0%
15		EXÓN1_T4 de CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGGCGCAGGCCCUA U (SEQ ID NO: 93)	81.6 %	0.8 3	87.5%
		EXÓN1_T7 de CD70 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGUCG C (SEQ ID NO: 94)	97.8 %	0.9 8	87.7%
20		EXÓN1_T8 de CD70 (E1_T8)	GCCCCGAGGACGCACCCAU A (SEQ ID NO: 95)	90.1 %	0.9 4	88.1%
		EXÓN1_T10 de CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCGCA C (SEQ ID NO: 96)	28.3 %	0.3 0	83.9%
25		EXÓN3_T1 de CD70 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCGUG A (SEQ ID NO: 97)	85.6 %	0.9 3	87.2%

Análisis de perfiles de indels en la diana en células T

30 Se realizó el análisis de amplicones en la diana en el locus CD70 después de la edición génica usando la guía T7

(SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 36), que selecciona como diana el gen CD70:

GCTTTGGTCCCATTGGTCGC (SEQ ID NO: 160; secuencia diana, con PAM SEQ ID NO: 114).

5 Tras la edición génica, se realizó el análisis de amplicones en la diana alrededor del locus CD70 en células TRAC-/ β 2M-/CD70-/CAR+ anti-CD70 (generadas tal como se describe en el ejemplo 3).

Se realizó una PCR inicial usando el kit de PCR KAPA HiFi (Kapa Biosystems, Wilmington, MA). Se combinaron 100 ng
10 de ADN_g de entrada con 10 uM de cada cebador. Se aparearon los cebadores CD70_F y CD70_R para amplificar el locus CD70 (Tabla 7).

15 **Tabla 7. Cebadores para la preparación de la biblioteca de amplicones de CD70**

CD70_ F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGcccaacttttccatctc aactcaccccaagt (SEQ ID NO: 127)
CD70_ R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcccctcctgcgctagc gga (SEQ ID NO: 128)

20 El análisis del locus CD70 en una población de células T tras la edición génica por CRISPR/Cas9 para producir células T TRAC-/ β 2M-/CAR+ anti-CD70 da como resultado frecuencias de indels específicas y secuencias sometidas a edición génica en el locus CD70 (**Tabla 8**; deleciones como
25 guiones e inserciones en negrita). Se generaron dos poblaciones de células editadas a partir de dos células T de donantes diferentes (1 y 2). Las poblaciones de células T editadas de cada donante se analizaron por duplicado: 1A/1B y 2A/2B.

30 **Tabla 8.**

SEQ ID NO:	Secuencia sometida a edición génica	1A	1B	2A	2B	Medi a	Desv .est.
5 129	CACACCACGAGGCAGATCA CCAAGCCCGCG-- CAATGGGACCAAAGCAGCC CGCAGGACG	10.4 %	11.1 %	14.4 %	14.8 %	12.7 %	0.02 2
10 130	CACACCACGAGGCAGATC ACCAAGCCCGCGAACCAA TGGGACCAAAGCAGCCCCG CAGGACG	8.7%	10.0 %	11.3 %	11.1 %	10.3 %	0.01 2
15 131	CACACCACGAGGCAGATC ----- ACCAATGGGACCAAAGCA GCCCCGAGGACG	8.2%	7.8%	7.1%	6.8%	7.5%	0.00 6
20 132	CACACCACGAGGCAGATC ACCAAGCCCGCG- CCAATGGGACCAAAGCAG CCCGCAGGACG	3.9%	4.5%	4.2%	4.3%	4.2%	0.00 2
20 133	CACACCACGAGGCAGATC ACCAAGCCCGC- ACCAATGGGACCAAAGCA GCCCCGAGGACG	2.2%	2.5%	2.4%	2.6%	2.4%	0.00 2
25 134	CACACCACGAGGCAGATC ACCA----- ----- AGCCCCGAGGACG	2.9%	2.3%	2.0%	2.0%	2.3%	0.00 4

Ejemplo 2. Generación de células T con múltiples desactivaciones de genes

30 Este ejemplo describe el uso de la tecnología de edición génica por CRISPR/Cas9 para producir células T humanas que

carecen de la expresión de dos, tres o cuatro genes simultáneamente. Específicamente, el gen de receptor de células T (TCR) (gen editado en la región constante alfa de TCR (TRAC)), el gen de β 2-microglobulina (β 2M), el gen de agrupación de diferenciación 70 (CD70) y/o el gen de muerte celular programada 1 (PD-1 o PD1) se editaron mediante edición génica por CRISPR/Cas9 para producir células T deficientes en dos o más de los genes enumerados. Se usan las siguientes abreviaturas en las figuras por brevedad y claridad:

2X KO: TRAC⁻/ β 2M⁻

3X KO (PD-1): TRAC⁻/ β 2M⁻/PD-1⁻

3X KO (CD70): TRAC⁻/ β 2M⁻/CD70⁻

4X KO: TRAC⁻/ β 2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻

Se sometieron células T humanas activadas primarias a electroporación con complejos de RNP de Cas9:ARNg. La mezcla de nucleofección contenía la disolución Nucleofector™, 5x10⁶ células, Cas9 1 μ M y ARNg 5 μ M (tal como se describe en Hendel *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2015; 33(9):985-989, PMID: 26121415). Para la generación de células T con desactivación doble (2X KO), las células se sometieron a electroporación con dos complejos de RNP diferentes, conteniendo cada uno proteína Cas9 y uno de los siguientes ARNsg: TRAC (SEQ ID NO: 40) y β 2M (SEQ ID NO: 41) a las concentraciones indicadas anteriormente. Para la generación de células T con desactivación triple (3X KO), las células se sometieron a electroporación con tres complejos de RNP diferentes, conteniendo cada uno proteína Cas y uno de los siguientes ARNsg: (a) TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), y PD-1 (SEQ ID NO: 42) a las concentraciones indicadas anteriormente; o (b) TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO:

41), y CD70 (SEQ ID NO: 36 o 37) a las concentraciones indicadas anteriormente. Para la generación de células T con desactivación cuádruple (4X KO), las células se sometieron a electroporación con cuatro complejos de RNP diferentes, 5 conteniendo cada uno proteína Cas9 y uno de los siguientes ARNsg: TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), PD-1 (SEQ ID NO: 42), y CD70 (SEQ ID NO: 36 o 37) a las concentraciones indicadas anteriormente. Pueden usarse también las versiones no modificadas (u otras versiones modificadas) de los ARNsg 10 (por ejemplo, SEQ ID NO: 30, 31, 32, 26 y/o 27). Secuencias en las **Tablas 5 y 9**.

Tabla 9. Secuencias de ARNsg/secuencias diana

Nombre	Secuencia no modificada	Secuencia modificada
ARNsg de TRAC	AGAGCAACAGUGCUGUGG CCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguuaucaacuu gaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 30)	A*G*A*GCAACAGUGCUG UGGCCguuuuagagcuag aaauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucaa cuugaaaaaguggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 40)
Espaciador de ARNsg de TRAC	AGAGCAACAGUGCUGUGG CC (SEQ ID NO: 98)	A*G*A*GCAACAGUGCUG UGGCC (SEQ ID NO: 108)
ARNsg de β 2M	GCUACUCUCUCUUUCUGG CCguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguuaucaacuu gaaaaaguggcaccgagu cggugcUUUU	G*C*U*ACUCUCUCUUUC UGGCCguuuuagagcuag aaauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucaa cuugaaaaaguggcaccg agucggugcU*U*U*U

		(SEQ ID NO: 31)	(SEQ ID NO: 41)
	Espaciador de ARNsg de β 2M	GCUACUCUCUCUUUCUGG CC (SEQ ID NO: 99)	G*C*U*ACUCUCUCUUUC UGGCC (SEQ ID NO: 109)
5	ARNsg de PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACAC AUguuuuagagcuagaaa uagcaaguuaaaauaagg cuaguccguuaucaacuu gaaaaagugggcaccgagu cggugcUUUU (SEQ ID NO: 32)	C*U*G*CAGCUUCUCCAA CACAUguuuuagagcuag aaauagcaaguuaaaaua aggcuaguccguuaucaa cuugaaaaagugggcaccg agucggugcU*U*U*U (SEQ ID NO: 42)
10	Espaciador de ARNsg de PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACAC AU (SEQ ID NO: 100)	C*U*G*CAGCUUCUCCAA CACAU (SEQ ID NO: 110)

15 Aproximadamente una (1) semana después de la electroporación, las células o bien se dejaron sin tratar o bien se trataron con acetato-miristato de forbol (PMA)/ionomicina durante la noche. El día siguiente se procesaron las células para citometría de flujo (véase, por
20 ejemplo, Kalaitzidis D et al. J Clin Invest 2017; 127(4): 1405-1413) para evaluar los niveles de expresión de TRAC, β 2M, PD-1 y CD70 en la superficie celular de la población de células editadas. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios (**Tabla 10**):

25 **Tabla 10. Anticuerpos**

Anticuerpo	Clon	Fluor	N.º de catálogo	Dilución	Por 1
TCR	BW242/412	PE	130-091-236 (Miltenyi)	1:100	1 μ L

30

Anticuerpo	Clon	Fluor	N.° de catálogo	Dilución	Por 1
β 2M	2M2	PE- Cy7	316318 (Biolegend)	1:100	1 μ L
PD-1	EH12.2H7	PE	329906 (Biolegend)	1:100	1 μ L
CD70	113-16	FITC	355105 (Biolegend)	1:100	1 μ L

Las **Tablas 11 y 12** muestran una edición génica múltiple altamente eficaz. Para las células con desactivación doble (2X KO; TRAC⁻/ β 2M⁻), el 83% de las células viables carecían de expresión de TCR y β 2M (**Tabla 11; 3X KO (PD1)**). Para las células con desactivación triple, el 70% de las células viables carecían de expresión de TCR, β 2M y PD-1 (**Tabla 11**); y el 80% de las células viables carecían de expresión de TCR, β 2M y CD70 independientemente del ARNg de CD70 usado (**Tabla 12**). Para las células con desactivación cuádruple (4X KO), el 78% de las células viables carecían de expresión de TCR, β 2M, PD-1 y CD70 (**FIG. 1**).

Tabla 11. % de células viables que carecen de expresión en poblaciones de células 2KO y 3KO (PD1)

	TRAC KO	β 2M KO	PD1 KO	2 KO	3 KO (PD1)
2KO	98%	85%	NA	83%	NA
3 KO (PD1)	98%	73%	99%	NA	70%

Tabla 12. % de células viables que carecen de expresión en poblaciones de células 3KO (CD70)

	TRAC KO	β 2M KO	CD70 KO	3KO (CD70)
--	---------	---------------	---------	---------------

3KO (CD70) (T7)	99%	79%	99%	80%
3KO (CD70) (T8)	99%	82%	99%	80%

5 Para evaluar si la edición génica triple y cuádruple en las células T afecta a la expansión celular, se enumeraron los números de células entre las células T sometidas a edición génica doble, triple y cuádruple (se usaron células T sin editar como control) a lo largo de un período de dos
10 semanas tras la edición. Se generaron 5×10^6 células y se sembraron en placa para cada genotipo de células T.

Tal como se muestra en la **FIG. 2**, la proliferación celular (expansión) continuó a lo largo de la prueba de ventana tras la electroporación. Se observó una
15 proliferación celular similar entre las células T con desactivación doble ($\beta 2M$ -/TRAC-), triple ($\beta 2M$ -/TRAC-/PD-1- o $\beta 2M$ -/TRAC-/CD70-) y cuádruple ($\beta 2M$ -/TRAC-/PD-1-/CD70), tal como se indica mediante el número de células viables. Estos datos sugieren que la edición génica múltiple (hasta triple
20 y cuádruple, con los genes *CD70* y *PD-1*) no tiene un impacto sobre la salud de células T tal como se mide mediante la proliferación de células T.

Ejemplo 3. Generación de células CAR T que carecen de CD70 y/o PD1

25 Generación de células CAR T anti-CD70 con desactivaciones múltiples

Este ejemplo describe la producción de células T humanas alogénicas que carecen de expresión del gen *TCR*, gen $\beta 2M$, gen *CD70* y/o gen *PD1*, y expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que selecciona como diana CD70. Estas
30 células se designan TCR⁻/ $\beta 2M$ -/CD70-/CAR⁺ anti-CD70 o 3X KO

(CD70) CD70 CAR⁺; TCR⁻/β2M⁻/PD1⁻/CAR⁺ anti-CD70 o 3X KO (PD1) CD70 CAR⁺; TCR⁻/β2M⁻/PD1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 o 4X KO CD70 CAR⁺ en las figuras.

Un vector de virus adenoasociado recombinante, serotipo 6 (AAV6) (MOI 50,000) que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 43 (que comprende el molde donador en SEQ ID NO: 44, que codifica para CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46) se suministró con RNP de Cas9:ARNsg (Cas9 1 μM, ARNg 5 μM) a células T humanas alogénicas activadas. Se usaron los siguientes ARNg: TRAC (SEQ ID NO: 40), β2M (SEQ ID NO: 41), CD70 (SEQ ID NO: 36 o 37) y PD1 (SEQ ID NO: 42). Pueden usarse también las versiones no modificadas (u otras versiones modificadas) de los ARNg (por ejemplo, SEQ ID NO: 30, 31, 32, 26 y/o 27). Aproximadamente una (1) semana después de la electroporación, las células se procesaron por citometría de flujo para evaluar los niveles de expresión de TRAC, β2M, CD70 y PD1 en la superficie celular de la población de células editadas. Se usaron los siguientes anticuerpos primarios (**Tabla 13**):

Tabla 13. Anticuerpos

Anticuerpo	Clon	Fluor	N.º de catálogo	Dilución
TCR	BW242/412	PE	130-091-236 (Miltenyi)	1:100
β2M	2M2	PE- Cy7	316318 (Biolegend)	1:100
CD70	113-16	FITC	355105 (Biolegend)	1:100

PD-1	EH12.2H7	PE	329906 (Biolegend)	1:100
------	----------	----	-----------------------	-------

5 **Ensayo de proporción de células T.** Las proporciones de células CD4+ y CD8+ se evaluaron entonces en las poblaciones de células T editadas mediante citometría de flujo usando los siguientes anticuerpos (**Tabla 14**):

Tabla 14. Anticuerpos

Anticuerpo	Clon	Fluor	N.º de catálogo	Dilución
CD4	RPA-T4	BV510	300545 (Biolegend)	1:100
CD8	SK1	BV605	344741 (Biolegend)	1:100

10 Se lograron una expresión de CAR y edición génica de alta eficacia en las poblaciones de células CAR T anti-CD70 editadas. Además, la edición no alteró adversamente las poblaciones de células T CD4/CD8. La **FIG. 3** muestra una expresión de CAR anti-CD70 y edición génica altamente eficaz en la célula CAR T con desactivación triple. Más del 55% de las células viables carecían de expresión de TCR, β 2M y CD70, y también expresaban el CAR anti-CD70. La **FIG. 4** muestra que se mantuvieron proporciones normales de subconjuntos de células T CD4/CD8 en las células TRAC-/ β 2M-/CD70-/CAR+ anti-CD70, lo que sugiere que estas ediciones génicas múltiples no afectan a la biología de las células T tal como se mide mediante la proporción de subconjuntos de células T CD4/CD8 T.

20 La **FIG. 5** muestra una expresión de CAR anti-CD70 y edición génica altamente eficaz en la célula CAR T con desactivación cuádruple. Más del 60% de las células viables carecían de expresión de TCR, β 2M, PD-1 y CD70, y también expresaban el CAR anti-CD70. La **FIG. 6** muestra que se

mantuvieron proporciones normales de subconjuntos de células T CD4/CD8 en las células TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70, lo que sugiere que estas ediciones génicas múltiples no afectan a la biología de las células T tal como se mide mediante la proporción de subconjuntos de células T CD4⁺/CD8⁺.

Generación de células CAR T anti-BCMA con desactivaciones múltiples

Este ejemplo describe la producción de células T humanas alogénicas que carecen de expresión del gen *TCR*, el gen *β2M*, el gen *PD-1* y/o el gen *CD70*, y también expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que selecciona como diana el antígeno de maduración de células B (BCMA).

Un vector de virus adenoasociado recombinante, serotipo 6 (AAV6) que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 54 (que comprende el molde donador en SEQ ID NO: 55, que codifica para CAR anti-BCMA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57) se suministró con RNP de Cas9:ARNg (Cas9 1 μM y ARNg 5 μM) a células T humanas alogénicas activadas. Se usaron los siguientes ARNsg: TRAC (SEQ ID NO: 40), β2M (SEQ ID NO: 41), PD-1 (SEQ ID NO: 42), y CD70 (SEQ ID NO: 36 o 37). Pueden usarse también las versiones no modificadas (u otras versiones modificadas) de los ARNg (por ejemplo, SEQ ID NO: 30, 31, 32, 26 y/o 27). Aproximadamente una (1) semana después de la electroporación, las células se procesaron por citometría de flujo tal como se describió anteriormente para las células T CAR⁺ anti-CD70, con la siguiente diferencia. Se detectó la expresión de CAR anti-BCMA usando BCMA humano recombinante biotinilado (n.º de cat. de ACROS BC7-H82F0). Entonces se caracterizaron las células CAR⁺ anti-BCMA con desactivación

doble y cuádruple tal como se describe en el presente documento.

Las FIG. 7A-7B muestran una edición génica altamente eficaz del gen *TRAC*, gen $\beta 2M$, el gen *CD70* y el gen *PD-1*. La **FIG. 7C** muestra una alta expresión de las células CAR+ anti-BCMA en células con desactivación doble y desactivación cuádruple.

Generación de células CAR T anti-CD19 con desactivaciones múltiples

Se generaron células T humanas alogénicas que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que selecciona como diana CD19 y carecen de la expresión del gen *TCR*, el gen $\beta 2M$ y opcionalmente el gen *CD70*.

Para generar las células T alogénicas, se sometieron a electroporación células T humanas primarias activadas con complejos de RNP de Cas9:ARNg y se infectaron con vectores de adenovirus adenoasociados (AAV) que contenían un molde donador de CAR anti-CD19 con homología con el locus *TRAC*. Serotipo 6 de AAV recombinante (AAV6) que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 155 (que comprende el molde donador en SEQ ID NO: 156, que codifica para CAR anti-CD19 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149) se suministró con RNP de Cas9:ARNsg (Cas9 1 μ M, ARNg 5 μ M) a células T humanas activadas. Se usaron los siguientes ARNsg para desactivar los genes respectivos: *TRAC* (SEQ ID NO: 40), $\beta 2M$ (SEQ ID NO: 41), *CD70* (SEQ ID NO: 36). Pueden usarse también las versiones no modificadas (u otras versiones modificadas) de los ARNg (por ejemplo, SEQ ID NO: 30, 21 o 27). Aproximadamente una (1) semana después de la electroporación, las células se procesaron por citometría de flujo tal como se describió anteriormente para las células

T CAR⁺ anti-CD70, con la siguiente diferencia. La expresión de CAR anti-CD19 se detectó usando CD19 humano recombinante biotinilado (ACROBIOSYSTEMS INC; CD9-H825). Las células T CAR⁺ anti-CD19 deficientes en CD70 se caracterizaron entonces tal como se describe en el presente documento.

Generación de células CAR T anti-CD33 con desactivaciones múltiples

Se generaron células T humanas alogénicas que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) que selecciona como diana CD33 y carecen de la expresión del gen de receptor de células T (TCR) (gen editado en la región constante alfa de TCR (TRAC)), el gen de β 2-microglobulina (β 2M) y, opcionalmente, el gen de CD70.

Para generar las células T alogénicas, se sometieron a electroporación células T humanas primarias activadas con complejos de RNP de Cas9:ARNg y se infectaron con vectores de adenovirus adenoasociados (AAV) que contenían un molde donador de CAR anti-CD33 con homología con el locus TRAC. Serotipo 6 de AAV recombinante (AAV6) que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 87 (que comprende el molde donador en SEQ ID NO: 135, que codifica para CAR anti-CD33 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 se suministró con RNP de Cas9:ARNsg (Cas9 1 μ M, ARNg 5 μ M) a células T humanas activadas. Se usaron los siguientes ARNsg para desactivar los genes respectivos: TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), CD70 (SEQ ID NO: 36). Pueden usarse también las versiones no modificadas (u otras versiones modificadas) de los ARNg (por ejemplo, SEQ ID NO: 30, 21 o 27).

Se generaron de manera similar poblaciones de células T TCR⁺ (sin RNP) y células T TRAC⁻/ β 2M⁻ (células deficientes

en TCR y β 2M sin un CAR) para su uso como controles. Aproximadamente una (1) semana después de la electroporación, las células se procesaron por citometría de flujo tal como se describió anteriormente para las células T CAR+ anti-CD70, con la siguiente diferencia. La expresión de CAR anti-CD33 se detectó usando CD33 humano recombinante biotinilado (datos no mostrados). Las células T CAR+ anti-CD33 con desactivación de CD70 se caracterizaron entonces tal como se describe en el presente documento.

10 Caracterización de poblaciones de células CD4/CD8 en células CAR T anti-CD33 con desactivación de CD70

Puede expresarse CD33 en células T con niveles más altos observados en células CD4 cultivadas que en células CD8. Durante el transcurso de la producción de células CAR-T anti-CD33, las células CD4 se reducen sustancialmente debido al fratricidio. Como se muestra en la **Fig. 8**, los cultivos de células CAR-T anti-CD33 con CD70 intacto mostraron una reducción del 97% en las células CD4 durante un período de cultivo de 3 semanas, mientras que los cultivos de células con CD70 alterado mostraron solo una reducción del 61% durante este transcurso de tiempo. Por tanto, la alteración del gen CD70 parece reducir el fratricidio observado en los cultivos de células CAR-T anti-CD33. Sin querer restringirse a la teoría, este efecto puede producirse a través de una función inmunoestimuladora que podría potenciarse por interacciones CD70/CD27, y la alteración genética de CD70 da como resultado razones de CD4/CD8 más equilibradas que pueden ser más óptimas para el beneficio terapéutico en tumores malignos.

30 **Ejemplo 4: CD70 KO mejora la proliferación celular**

Efecto de CD70 KO sobre la proliferación celular de células
CAR T anti-CD33 in vitro

Para evaluar la capacidad de las células para expandirse en medios que contienen citocinas (IL-2+IL-7), se utilizaron células CAR T anti-CD33. Específicamente, se generaron 5×10^6 células CAR T anti-CD33 totales que comprendían una desactivación doble (TRAC-/B2M-) o desactivación triple (TRAC-/B2M-/CD70-) tal como se describe en el ejemplo 3, se sembraron en placa y se permitió que crecieran en un volumen de 10 mL de medios que contienen citocinas. Después de 1 semana, se contaron las células. Entonces volvieron a sembrarse en placa 5×10^6 células del cultivo previo en un volumen de 10 mL (medios que contienen citocinas nuevos) y 1 semana después se enumeró el número total de células. Las células CAR-T anti-CD33 alogénicas que contienen una alteración en el gen CD70 se expandieron a niveles más altos en la primera y segunda semana de volver a sembrar en placa (**Fig. 9**). Estos datos muestran que la desactivación de CD70 puede dar como resultado mayores rendimientos celulares en cultivo.

Efecto de CD70 KO sobre la proliferación celular de células
CAR T anti-CD19 in vitro

Para evaluar adicionalmente la capacidad de las células para expandirse en medios que contienen citocinas (IL-2+IL-7), se utilizaron células CAR T anti-CD19. Específicamente, se generaron 5×10^6 células CAR T anti-CD19 totales que comprendían una desactivación doble (TRAC-/B2M-) o desactivación triple (TRAC-/B2M-/CD70-) tal como se describe en el ejemplo 3, se sembraron en placa y se permitió que crecieran en un volumen de 10 mL de medios que contienen citocinas. Después de 1 semana, se contaron las células.

Entonces volvieron a sembrarse en placa 5×10^6 células del cultivo previo en un volumen de 10 mL (medios que contienen citocinas nuevos) y 1 semana después se enumeró el número total de células. Las células CAR-T anti-CD19 alogénicas que
5 contienen una alteración en el gen CD70 se expandieron a niveles más altos en la primera y segunda semana de volver a sembrar en placa en comparación con células de control sin una alteración del gen CD70 (**Fig. 10**). Estos datos muestran que la desactivación de CD70 puede dar como resultado mayores
10 rendimientos celulares en cultivo.

Efecto de CD70 KO sobre la proliferación impulsada por citocinas y apoptosis de células CAR T anti-BCMA in vitro

Proliferación impulsada por citocinas. Para evaluar el efecto de la desactivación de CD70 y/o PD1 sobre la
15 proliferación celular, se utilizaron células CAR T anti-BCMA. Se generaron células CAR T anti-BCMA tal como se describe en el ejemplo 3. Se generaron los siguientes grupos de células T editadas:

TRAC-/B2M-/CAR+ anti-BCMA (control; 2KO, BCMA CAR+)
20 TRAC-/B2M-/CD70-/CAR+ anti-BCMA (3KO (CD70), BCMA CAR+)
TRAC-/B2M-/PD1-/CAR+ anti-BCMA (3KO (PD1), BCMA CAR+)
TRAC-/B2M-/CD70-/PD1-/CAR+ anti-BCMA (4KO, BCMA CAR+)

.
Las células editadas se enriquecieron en células TRAC-
25 /B2M- por agotamiento magnético de células CD3+B2M+. Brevemente, las células se marcaron con anticuerpos anti-CD3 biotina (n.º de cat. de Biolegend 300404) anti-β2M biotina (n.º de cat. de Biolegend 316308), cada uno a 0.5 µg por 1×10^6 células en un volumen de 100 µl a 4°C durante
30 15 min, se lavaron y se incubaron con microperlas magnéticas marcadas con estreptavidina (Miltenyi Biotech, 130-048-101)

durante 15 min a 4°C. Las células se resuspendieron en tampón y se hicieron pasar a través de columnas LS (Miltenyi Biotech, 130-042-401) según el protocolo del fabricante.

5 Para determinar el efecto de CD70 o PD1 sobre la proliferación de células T impulsada por IL-2/IL-7, las células T editadas (células 1E6 / ml) se cultivaron en medio de crecimiento (medio X-vivo (04--744, Lonza), complementado con suero AB humano al 5% (HP1022, Valley Biomedical)), 50 ng/ml de IL-2 (rhIL-2; 130-097-745, Miltenyi Biotech) y 10
10 ng/ml de IL-7 (rhIL-7; Cellgenix 001410-050) durante hasta cuatro semanas. En los días indicados, las células se contaron y volvieron a sembrarse en medio fresco a 1,5E6 células/ml en placas de cultivo apropiadas.

Las FIG. 11 y 12 muestran que la desactivación de CD70
15 mejoró la proliferación impulsada por IL-2/IL-7 de células CAR T anti-BCMA *in vitro*, en comparación con controles suficientes de CD70 (es decir, células CAR T anti-BCMA que comprenden CD70 endógeno). La **Fig. 11** también muestra que el CD70 KO puede mejorar la salud y la capacidad de
20 proliferación de células CAR T anti-BCMA incluso cuando las células T de este donante parecen estar en declive significativo después de 17 días cuando el gen CD70 está intacto (tal como se muestra por los números reducidos de células del donante 1 (**FIG. 11**) en comparación con el donante
25 2 (**FIG. 12**)). Esta propiedad de mantener la salud de las células T (habilitada por la desactivación del gen CD70) puede aplicarse ampliamente a muchos aspectos del desarrollo de CAR T que incluyen: expansión prolongada durante la fabricación aumentando el rendimiento y la constancia,
30 rescate de células T agotadas/enfermas permitiendo dosis potencialmente más bajas en pacientes y respuestas más

sólidas, combinación con otras desactivaciones que pueden ser más perjudiciales para la salud de las células T pero que tienen otras ventajas tales como superar la supresión de la actividad de las células T (por ejemplo, PD1 KO). Tal como se muestra en las **FIG. 11 y 12**, la delección del gen PD1 no muestra por sí misma beneficio para la expansión de células CAR T pero cuando se combina con una CD70 KO muestra efectos sinérgicos.

Apoptosis. Se evaluó el efecto de CD70 KO sobre la muerte celular apoptótica de células T CAR+ anti-BCMA tras la exposición a antígeno en un ensayo de reexposición a antígeno. Brevemente, para lograr la exposición al antígeno, se expusieron células T CAR+ anti-BCMA a proteína BCMA recombinante adherida a placa. Las placas con antígeno adherido se prepararon recubriendo placas de 24 pocillos con proteína BCMA recombinante en 1x PBS (1 µg/ml; proteína BCMA humana biotinilada, ACRO Biosystems) durante la noche a 4°C y luego eliminando por lavado el antígeno no unido. Después del lavado, se usaron placas unidas a antígeno para exponer las células T CAR+ anti-BCMA con o sin una desactivación de CD70. Se expusieron las células T 2X KO (TRAC-/B2M-) CAR+ anti-BCMA y células T 3X KO (TRAC-/B2M-/CD70-) CAR+ anti-BCMA (1×10^6 células/ml) a proteína BCMA recombinante unida a placa (1 µg/ml) durante 24 horas en medio de crecimiento (medio X-vivo (04-744, Lonza), suero AB humano al 5% (HP1022, Valley Biomedical)) suplementado con IL-2 (rhIL-2; 130-097-745, Miltenyi Biotech). Entonces se lavaron las células, se contaron y volvieron a exponerse (1×10^6 células/ml) con antígeno fresco unido a placa cada 24 horas durante un total de tres reexposiciones consecutivas (24 horas, 48 horas y 72 horas). Al final de cada reexposición, se lavó una

alícuota de células y se tiñó con anexina V conjugada con fluorocromo junto con yoduro de propidio en tampón de unión de anexina V (BioLegend) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Entonces se lavaron las células y se resuspendieron en tampón de unión de anexina V para su análisis por citometría de flujo. Se contaron las células en cada punto de tiempo y se derivó el recuento de células por ml. Para el cálculo de la expansión en veces en cada punto de tiempo, la expansión en veces inicial en el tiempo 0 se estableció en 1. La expansión en veces para todos los demás puntos de tiempo se calculó multiplicando el recuento de células por ml en cada punto de tiempo por la expansión en veces por ml para el punto de tiempo anterior. Por ejemplo, la expansión en veces a las 72 h se calculó multiplicando el recuento de células por ml a las 72 h por la expansión en veces por ml a las 48 h.

La **Fig. 13** demuestra que la delección de CD70 (CD70 KO) rescata a las células T CAR+ anti-BCMA de la apoptosis, tal como se muestra por la disminución en el porcentaje de células apoptóticas después de la segunda (48 h) y la tercera (72 h) reexposición. Además, la ausencia de expresión de CD70 en las células T CAR+ anti-BCMA aumenta sorprendentemente la expansión de las células T CAR+ anti-BCMA en respuesta a la exposición a antígeno (**Fig. 14**).

Efecto de CD70 KO sobre la proliferación celular de células CAR T anti-CD70 in vitro

Para evaluar adicionalmente el impacto de alterar el gen CD70 en las células CAR T, se generaron células CAR T anti-CD70 tal como se describe en el ejemplo 3. Específicamente, se generaron células CAR T 3X KO (TRAC- β 2M-/CD70-) anti-CD70 usando dos ARNg diferentes (T7 (SEQ

ID NO: 36 y T8 (SEQ ID NO: 37)). Después de la electroporación, se evaluó la expansión celular tal como se describe en el ejemplo 2 contando las células viables. La **FIG. 15** muestra que células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple generadas con ARNg de o bien T7 o bien T8 presentaban mayor expansión celular en relación con células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble. Estos datos sugieren que la desactivación del gen CD70 proporciona una ventaja de proliferación celular a las células T CAR⁺ anti-CD70.

Se evaluó también la expansión celular en las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple. Estas células presentaban una mayor expansión en relación con las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple y las células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble (**FIG. 16**).

Ejemplo 5. CD70 KO aumenta la durabilidad y potencia de células CAR T in vitro

Función de destrucción celular de células CAR T anti-CD19 con desactivación de CD70

Tras la preparación de células CAR T anti-CD19 editadas tal como se describe en el ejemplo 3, se verificó la actividad funcional de las células CAR T usando un ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo. Se cocultivaron las células CAR T anti-CD19 (TRAC⁻/β2M⁻/CD19 CAR⁺ y TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CD19 CAR⁺) con una de dos líneas de células cancerosas que expresan CD19 (células diana): Nalm6 (ATCC ccl3273) o Raji (ATCC ccl-86). Las células diana se marcaron con efluor670 5 μM (eBiosciences), se lavaron y se incubaron en cocultivos con TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD19, o TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD19 en razones variables (0.01, 0.05, 0.1,

0.5, 1:1 células T:células diana). Las células diana se sembraron a 50,000 células por pocillo en una placa de fondo en U de 96 pocillos. El cocultivo se incubó durante la noche. Después de la incubación, se lavaron los pocillos y se reemplazó el medio con 200 µl de medio que contenía una dilución 1:500 de DAPI 5 mg/ml (Molecular Probes). A continuación, se añadieron 25 µl de perlas CountBright (Life Technologies) a cada pocillo y se analizaron los cultivos celulares para determinar la viabilidad celular mediante citometría de flujo (es decir, células viables que eran negativas para la tinción de DAPI).

Entonces se determinó el porcentaje de lisis celular de las células diana (por ejemplo: células Nalm6 o Raji) usando la siguiente fórmula:

Porcentaje de lisis celular = $(1 - ((\text{número total de células diana en una muestra de prueba}) \div (\text{número total de células diana en una muestra de control}))) \times 100$;

en la que una muestra de prueba eran células diana (por ejemplo: células Nalm6 o Raji) cocultivadas con 1) células T TRAC-/β2M-/CD19 CAR+ o 2) células T TRAC-/β2M-/CD70-/CD19 CAR+; y

una muestra de control eran células diana solas que no se habían cocultivado.

La alteración del gen CD70 condujo a una actividad citolítica potenciada de las células CAR-T anti-CD19 contra la línea celular Raji a razones bajas de CAR-T con respecto a la diana (**Fig. 17**, panel inferior). La alteración de CD70 no potenció la actividad de CAR-T anti-CD19 contra la línea celular Nalm6 (**Fig. 17**, panel superior). Es de destacar que la línea celular Nalm6 es relativamente más fácil de lisar por estas células CAR-T (> 80% de lisis a una razón de

células CAR-T con respecto a la diana de 0.1: 1 para Nalm6 frente al 0% para Raji a esta razón para las células de tipo natural) probablemente explicando la falta de aumento de eficacia resultante debido a la alteración de CD70 en este ensayo contra células Nalm6. La actividad aumentada conferida por la pérdida de CD70 contra la línea celular Raji indica que en entornos tumorales de reexposición, particularmente cuando las razones de CAR-T frente a tumor son bajas, la pérdida de CD70 puede tener un beneficio sustancial para las células CAR-T en la erradicación de células tumorales.

Función de destrucción celular de células CAR T anti-CD33 con desactivación de CD70

Tras la preparación de las células T CAR+ anti-CD33 editadas tal como se describe en el ejemplo 3, se verificó la actividad funcional de las células CAR T usando un ensayo de citotoxicidad basado en citometría de flujo. Se cocultivaron las células CAR T anti-CD33 (TRAC-/β2M-/CD33 CAR+ y TRAC-/β2M-/CD70-/CD33 CAR+) o células T de control (sin RNP) con la línea de células cancerosas que expresan CD33 MV4-11 (ATCC CRL-9591). Las células diana se marcaron con efluor670 5 μM (eBiosciences), se lavaron y se incubaron en cocultivos con el TRAC-/B2M-/CAR+ anti-CD33, TRAC-/β2M-/CD70-/CAR+ anti-CD33, o controles a razones variables (0.01:1, 0.03:1, 0.06:1, 0.125:1, 0.25:1, 0.5:1 o 1:1 células T:células diana). Las células diana se sembraron a 50,000 células por pocillo en una placa de fondo en U de 96 pocillos. El cocultivo se incubó durante la noche. Después de 48 h, se lavaron las células y se reemplazó el medio con 200 μL de medio que contenía una dilución 1:500 de DAPI 5 mg/mL (Molecular Probes). A continuación, se añadieron 25 μl de

perlas CountBright (Life Technologies) a cada pocillo y se analizaron los cultivos celulares para determinar la viabilidad celular mediante citometría de flujo (es decir, células viables que eran negativas para la tinción de DAPI).

5 Entonces se determinó el porcentaje de lisis celular de las células diana (por ejemplo: MV4-11) usando la siguiente fórmula:

Porcentaje de lisis celular = $(1 - ((\text{número total de células diana en una muestra de prueba}) \div (\text{número total de células diana en una muestra de control}))) \times 100;$

10 en la que una muestra de prueba eran células diana (por ejemplo: células MV4-11) cocultivadas con 1) células T TRAC-/B2M-/CD33 CAR+; o 2) células T TRAC-/B2M-/CD70-/CD33 CAR+, y

15 una muestra de control eran células diana solas que no se habían cocultivado.

Aunque ambas poblaciones de células CAR T anti-CD33 destruyeron eficazmente células MV4-11, alcanzando casi el 100% de destrucción celular a razones de 0.5 células CAR T: célula MV4-11, las células T TRAC-/B2M-/CD70-/CD33 CAR+ demostraron una mayor destrucción celular a razones inferiores de CAR T con respecto a células cancerosas (**FIG. 18**). Estos datos demuestran que células CAR T anti-CD33 alogénicas con la desactivación adicional de CD70 son más eficaces a razones inferiores de células CAR T con respecto a células diana.

25 Función de destrucción celular de células CAR T anti-CD70 con desactivación de CD70

Se usó un ensayo de destrucción celular para evaluar la capacidad de las células TRAC-/β2M-/CD70-/CAR⁺ anti-CD70 y las células TRAC-/β2M-/PD-1-/CD70-/CAR⁺ anti-CD70 para

destruir una línea celular derivadas de carcinoma de células renales adherente (RCC) CD70⁺ (células A498). Las células adherentes se sembraron en placas de 96 pocillos a 50,000 células por pocillo y se dejaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se añadieron células CAR T anti-CD70 editadas a los pocillos que contenían células diana en las razones indicadas. Después del período de incubación indicado, se retiraron las células CAR T del cultivo mediante aspiración y se añadieron 100 µL de Cell titer-Glo (Promega) a cada pocillo de la placa para evaluar el número de células viables restantes. Después, se cuantificó la cantidad de luz emitida por pocillo usando un lector de placas. Las células presentaban una potente destrucción celular de células derivadas de RCC después de una coincubación de 24 horas (**Fig. 19**). Las células CAR T anti-CD70 demostraron una mayor potencia cuando se desactivó CD70, lo que es claramente visible a bajas razones de células T: A498 (1:1 y 0.5:1) donde la lisis celular permanece por encima del 90% para TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70, mientras que la lisis celular desciende por debajo del 90% para el TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70. Esto sugiere que la desactivación del gen CD70 proporciona una mayor potencia de destrucción celular a las células T CAR⁺ anti-CD70.

Ejemplo 6. Reexposición de células CAR T deficientes en CD70 *in vitro*

La desactivación de CD70 mejora la destrucción de células T CAR⁺ anti-CD33 tras la reexposición en serie

Para evaluar la capacidad de las células para expandirse después de la exposición y la reexposición con células que expresan antígeno (por ejemplo, células diana), se generaron y utilizaron células CAR T anti-CD33 tal como

se describe en el ejemplo 3 y se utilizaron. Específicamente, se sembraron en placa 5×10^6 células T totales en presencia de 5×10^6 células diana irradiadas (MV-4-11) y se permitió que crecieran en un volumen de 10 mL. Después de 1 semana, se contaron las células, entonces volvieron a sembrarse en placa 5×10^6 células del cultivo anterior en un volumen de 10 ml junto con una alícuota nueva de 5×10^6 células diana irradiadas y 1 semana después se enumeró el número total de células. El proceso se repitió tal como se indica, cada reexposición comenzó con 5×10^6 células. Se contó el número de células viables tal como se describe en el ejemplo 2. Células CAR-T anti-CD33 alogénicas que contienen una alteración en el gen CD70 se expandieron a mayores niveles en la segunda semana después de 2 exposiciones con células MV-4-11 (**FIG.20**). Estos datos muestran que CD70 puede limitar la expansión de células T en presencia de células que expresan antígenos y su pérdida puede dar como resultado una mayor expansión celular después de la estimulación con antígeno.

La desactivación de CD70 mejora la destrucción de células T CAR+ anti-CD19 tras la reexposición en serie

Para evaluar adicionalmente la capacidad de las células para expandirse después de la exposición y la reexposición con células que expresan antígeno (por ejemplo, células diana), se generaron y utilizaron células CAR T anti-CD19 tal como se describe en el ejemplo 3 y se utilizaron. Específicamente, se sembraron en placa 5×10^6 células T totales en presencia de 5×10^6 células diana irradiadas (Nalm6) y se permitió que crecieran en un volumen de 10 mL. Después de 1 semana, se contaron las células, entonces volvieron a sembrarse en placa 5×10^6 células del cultivo

anterior en un volumen de 10 ml junto con una alícuota nueva de 5×10^6 células diana irradiadas y 1 semana después se enumeró el número total de células. El proceso se repitió tal como se indica, cada reexposición comenzó con 5×10^6 células. Se contó el número de células viables tal como se describe en el ejemplo 2. Las células CAR-T anti-CD19 alogénicas que contienen una alteración en el gen CD70 se expandieron a cantidades similares durante las 2 primeras exposiciones. Sin embargo, a tres exposiciones, las células CAR-T anti-CD19 alogénicas que contenían una alteración en el gen CD70 se expandieron a un mayor nivel en la tercera exposición con células Nalm6 (**FIG. 21**). Estos datos muestran que la presencia de CD70 puede limitar la expansión de células T en presencia de células que expresan antígenos y su pérdida puede dar como resultado una mayor expansión celular después de la estimulación con antígeno repetida.

La desactivación de CD70, o PD-1 más CD70, mantiene la destrucción de células T CAR⁺ anti-CD70 tras la reexposición en serie

Las células T CAR⁺ anti-CD70 generadas anteriormente se reexpusieron en serie con la línea de células de cáncer de riñón CD70+, A498, y se evaluaron para determinar su capacidad para destruir las líneas de células de cáncer de riñón CD70+ A498 o ACHN.

Se sembraron en placa células A498 en un frasco T25 y se mezclaron a una razón de 2:1 (célula T con respecto a A498) con 10×10^6 células T CAR⁺ anti-CD70 que contienen o bien dos (TRAC⁻/β2M⁻), tres (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻) o (TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻), o bien cuatro (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) ediciones de ARNg.

Dos o tres días después de cada exposición, las células se contaron, se lavaron, se resuspendieron en medio de células T nuevo y volvieron a exponerse el día siguiente con la misma razón de dos células T CAR⁺ anti-CD70 por una célula A498 (2:1, T CAR⁺:diana). La exposición de células T CAR⁺ anti-CD70 con células A498 CD70⁺ se repitió 13 veces. De tres a cuatro días después de cada exposición a las células A498 (y antes de la siguiente reexposición), se tomaron alícuotas del cultivo y se analizaron para determinar la capacidad de las células CAR T para destruir células diana A498 o ACHN en una razón de 2: 1 (célula CAR T: célula diana). Se midió la destrucción celular usando Cell titer-glo (Promega). Antes de la primera exposición con A498, las células T CAR⁺ anti-CD70 con 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻), 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70), 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻) y 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) presentaban cada una una destrucción de células diana de células A498 que se aproximaba al 100%. Sin embargo, hacia la exposición nueve, las células T 2X KO (TRAC⁻/β2M⁻) y 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻) CAR⁺ anti-CD70 indujeron una destrucción celular de células A498 por debajo del 40%, mientras que las células T 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70) y 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) CAR⁺ anti-CD70 presentaban una destrucción de células diana por encima del 60% (**FIG. 22A**). La destrucción de células diana para células T 3X KO (TRAC⁻/β2M⁻/CD70) y 4X KO (TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) CAR⁺ anti-CD70 permaneció por encima del 60% incluso después de 13 reexposiciones con células A498, demostrando que estas células T CAR⁺ eran resistentes al agotamiento.

También se evaluaron células CAR T anti-CD70 para determinar su actividad para destruir células ACHN a una razón de 2:1 (célula T con respecto a ACHN) tras la

reexposición en serie con células de carcinoma renal A498 (FIG. 22B). Antes de la primera exposición con A498, las células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble, las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1-CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple, las células TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple y las células TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple presentaban una eficacia de destrucción celular por encima del 62%, el 47 %, el 73% y el 81%, respectivamente.

Después de la exposición cinco, las células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ T anti-CD70 con desactivación triple y las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple destruían eficazmente todavía más del 55% de las células ACHN a una razón de 2:1 (célula T con respecto a ACHN), mientras que la destrucción de células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble y las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple descendió por debajo del 11% de células ACHN. Esta tendencia continuó, en la que las células TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble y las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ T anti-CD70 con desactivación triple no pudieron sobrevivir más allá de 10 reexposiciones. En cambio, las células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple y las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple continuaron expandiéndose en cultivo y destruyendo más del 30% de células ACHN a una razón de 2:1 (célula T con respecto a ACHN) tras dos reexposiciones.

Los datos demuestran que las células T 4x KO, CD70 CAR⁺ y las células 3xKO (CD70), CD70 CAR⁺ son más potentes que las células T 2X KO, CD70 CAR⁺ T o células T 3X KO (PD1),

CD70 CAR+. Además, las 3X (CD70) KO y 4X KO impiden el agotamiento de células T.

Después de 5 reexposiciones, se evaluó la capacidad de las células para destruir células cancerosas. Sorprendentemente, las células T 3KO y 4KO CAR+ anti-CD70 siguieron siendo altamente eficaces en la destrucción de células cancerosas (**FIG. 23A**) incluso después de múltiples exposiciones a células cancerosas. El efecto de destrucción celular de las células T CAR+ anti-CD70 sobre células ACHN es reproducible a razones de efector con respecto a célula diana incluso reducidas de 1:1, 0.5:1, y 0.25:1. (**FIG. 23A**).

Para garantizar un beneficio a largo plazo tras el tratamiento con CAR T, las células CAR T deberían poder identificar y erradicar sus células diana a lo largo de un período de tiempo prolongado, para descartar la posibilidad de que las células cancerosas escapen de la muerte celular mediada por CAR-T. El ensayo de reexposición *in vitro* imita un encuentro recurrente de células CAR-T con células diana a lo largo de varios ciclos de activación de células CAR-T. Estos datos demuestran la superioridad de las células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple y de las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple en el mantenimiento de múltiples exposiciones con células de cáncer de riñón, sin mostrar reducción de su capacidad de destrucción de células diana, en comparación con las células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble y las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple.

También se midió el agotamiento y marcadores de activación mediante citometría de flujo en las células T CAR+ anti-CD70 tras la reexposición. Después de 8

exposiciones, las células T triples (TRAC-/β2M-/CD70-) y cuádruples (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) KO CAR+ anti-CD70 presentaban una mayor expresión del marcador de activación LAG3 que las células T dobles (TRAC-/β2M-) y cuádruples (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) KO CAR+ anti-CD70, consecuente con su nivel de alta actividad de destrucción celular. Se observó que la expresión de PD1 era menor en las células T triples (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70 (similares a células T triples (TRAC-/β2M-/PD1-) y cuádruples (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) KO CAR+ anti-CD70) en comparación con las células T dobles (TRAC-/β2M-) CAR+ anti-CD70, lo que sugiere que la desactivación de CD70 tiene un efecto sobre la regulación por disminución de la expresión del marcador de agotamiento PD1 en las células T CAR+ anti-CD70. (FIG. 23B).

La desactivación de PD-1 y CD70 mantiene la destrucción de células T CAR⁺ anti-BCMA tras la reexposición en serie

Las células T CAR⁺ anti-BCMA generadas tal como se describe en el ejemplo 3 se reexpusieron en serie con y se evaluó su capacidad para destruir la línea celular de mieloma múltiple BCMA+ MM.1S (ATCC CRL-2974). También se midió la capacidad para secretar citocinas tras la activación de células T en serie a través del acoplamiento de CAR después de cada nueva exposición. Se marcaron células MM.1S con eFlour670 5 μM y se mezclaron a una razón de 2:1 (MM.1S con respecto a célula T) una placa de cultivo tisular de 6 pocillos con 1x10⁶ células T CAR⁺ anti-BCMA que contenían o bien dos (TRAC⁻/β2M⁻) o bien cuatro ((TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻) ediciones de ARNg. Un día después de la exposición a células MM.1S, se tomó una alícuota del cultivo y se analizó tanto la destrucción de células dianas como la secreción de IFN-g por las células CAR-T. Para medir la liberación de citocinas,

las células T y las células diana se incubaron conjuntamente durante 24 horas a las razones indicadas. Se recogió medio sobrenadante para su uso en ELISA de IL-2 o IFN γ (RD Systems) en una placa nueva siguiendo las instrucciones del fabricante (RD Systems). Para cuantificar la destrucción celular, las células se lavaron, el medio se reemplazó con 200 mL de medio que contenía una dilución 1:500 de 5 mg/mL de DAPI (Molecular Probes) (para enumerar las células muertas/moribundas). Finalmente, se añadieron 25 mL de perlas CountBright (Life Technologies) a cada pocillo. Después, las células se procesaron por citometría de flujo.

1) Células / mL = ((número de eventos de células diana vivas) / (número de eventos de perlas)) x ((recuento de perlas asignado del lote (perlas/50 μ L)) / (volumen de muestra))

2) Las células diana totales se calcularon multiplicando células/mL x el volumen total de células.

3) El porcentaje de lisis celular se calculó entonces con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de lisis celular} = (1 - ((\text{número total de células en la muestra de ensayo}) / (\text{número total de células diana en la muestra de control}))) \times 100$$

Dos o tres días después de cada exposición, las células se contaron, se lavaron, se resuspendieron en medio de células T nuevo y se reexpusieron con la misma razón de una célula T CAR⁺ anti-BCMA por dos células MM.1S marcadas con eFlour670. La exposición de células T CAR⁺ anti-BCMA con células MM.1S BCMA⁺ se repitió 10 veces secuenciales. Antes de la exposición con células MM.1S, la coincubación de o bien células T 2X KO (TRAC⁻/B2M⁻) o bien 4X KO (TRAC⁻/B2M⁻)

/CD70-/PD-1-) CAR+ anti-BCMA con células MM.1S dio como resultado una destrucción completa de células diana. Adicionalmente, la producción de IFN γ por células T CAR+ anti-BCMA tanto 2X KO como 4X KO fue similar. Después de una

5 4^a reexposición con células MM.1S, sin embargo, la destrucción de células diana y la producción de IFN γ por células T CAR+ anti-BCMA 2X KO disminuyó en relación con la inducida por células T CAR+ anti-BCMA 4X KO. Hacia la 8^a reexposición, la destrucción de células diana era solo de

10 aproximadamente el 20% para células T CAR+ anti-BCMA 2X KO, mientras que tanto IFN γ como la destrucción de células diana por células T CAR+ anti-BCMA 4X KO siguieron siendo comparables con las observadas antes de cualquier exposición con células MM.1S (**FIG. 24A-24B**). Además, las células CAR T

15 anti-BCMA con desactivación cuádruple mostraron una proliferación superior en respuesta a la exposición a células diana (**FIG. 24C**).

Para garantizar un beneficio a largo plazo tras el tratamiento con CAR T, las células CAR T deberían poder

20 identificar y erradicar sus células diana a lo largo de un período de tiempo prolongado, para descartar la posibilidad de que las células cancerosas escapen de la destrucción celular mediada por CAR-T. El ensayo de reexposición *in vitro* imita un encuentro recurrente de células CAR-T con células

25 diana a lo largo de varios ciclos de activación de células CAR-T, demostrando por tanto la superioridad de las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-BCMA con desactivación 4X, en el mantenimiento de múltiples exposiciones con células diana, sin mostrar reducción de la capacidad de destrucción

30 celular, en comparación con las células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-BCMA con desactivación doble (**FIG. 24A-24C**).

Ejemplo 7. CD70 KO supera la exposición de moléculas inhibidoras en exceso

Comparación de los efectos de células T CAR⁺ anti-CD70 con desactivaciones múltiples sobre células de carcinoma renal A498-PD-L1

5 **Ensayo de destrucción celular.** La capacidad de células CAR⁺ anti-CD70 sometidas a múltiples ediciones génicas para destruir células de carcinoma renal A498 que sobreexpresan PD-L1 se determinó usando el ensayo de destrucción celular descrito en el presente documento Para crear células que sobreexpresan PD-L1 (CD274), se infectaron células A498 con lentivirus que codifican para un ADNc de PD-L1 y un gen de resistencia a puromicina (Genecopoeia). Después de la selección con puromicina, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-PD-L1 para evaluar la expresión de PD-L1. Las células A498 que expresan PD-L1 se denominan A498-PD-L1 y se usados en los ensayos funcionales descritos.

15 Las células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 (2X KO, CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 (3X KO (PD-1), CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 (3X KO (CD70), CD70 CAR⁺) y TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 (4X KO, CD70 CAR⁺) se incubaron con las células A498-PD-L1 a una razón de células CAR T:células diana A498-PD-L1 de 2:1 (**FIG. 25A**), 1:1 (**FIG. 25B**) o 0.5:1 (**FIG. 25C**). Las células con desactivación de CD70 presentaban una potente destrucción celular de células derivadas de RCC después de una coincubación de 24 horas (**FIG. 25A-25C**). Las células con desactivación de PD1 sola no lisaron eficazmente las células en presencia de sobreexpresión de PD-L1. Sin embargo, la desactivación de CD70 pudo rescatar la desactivación de PD1 y se observó una lisis celular potenciada en las células

CART con CD70 KO y PD1 KO. Estos datos demuestran que la pérdida de CD70 en la superficie de estas células CAR-T potencia su función incluso en presencia de moléculas altamente inmunosupresoras expresadas por células tumorales tales como PD-L1.

Ensayo de liberación de citocinas. Se realizó un ensayo de liberación de citocinas tal como se describe en el presente documento. La capacidad de las células T CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble, desactivación triple y desactivación cuádruple para producir IL-2 e IFN-g cuando se cocultivan en presencia de células A948-PD-L1 después de una coincubación de 24 horas a una razón (célula CAR T:célula diana A948-PD-L1) de 1:1 se evaluó usando un ensayo ELISA. Se midieron IL-2 e IFN-g de los sobrenadantes de cocultivos celulares. Las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple secretaron los niveles más altos de IFN-g (**FIG. 26A**) e IL-2 (**FIG. 26B**) cuando se cocultivaron con células A948-PD-L1. Estos datos demuestran que la desactivación de CD70 potencia la secreción de citocinas por células CAR-T incluso en presencia de moléculas altamente inmunosupresoras expresadas por células tumorales tales como PD-L1. La desactivación de CD70 junto con una desactivación de PD-1 en las células CAR-T potencia adicionalmente el efecto. Sin querer restringirse a la teoría, se cree que la desactivación de CD70 en células T CAR⁺ anti-CD70 puede rescatar los fenotipos perjudiciales de otras desactivaciones celulares (por ejemplo: PD1). Estos datos demuestran que la desactivación de CD70 en las células CAR T potencia la destrucción de células diana y la función de las células CAR T en un contexto altamente inmunosupresor.

Ejemplo 8. La desactivación de CD70 mejora la eficacia *in vivo*

Eficacia de la desactivación de CD70 y PD1 en células CART anti-CD70: el modelo de xenoinjerto tumoral de carcinoma de células renales subcutáneo en ratones NOG

Tratamiento en modelo tumoral pequeño

La capacidad de células T que expresan un CAR para CD70 para eliminar células de carcinoma de riñón que expresan altos niveles de CD70 se evaluó *in vivo* usando un modelo de xenoinjerto de tumor de carcinoma de células renales subcutáneo (A498) en ratones.

Se usaron CRISPR/Cas9 y AAV6 como anteriormente (véase, por ejemplo, el ejemplo y 3) para crear células T humanas que carecen de la expresión de TCR, β 2M, CD70 y/o PD1 con expresión concomitante a partir del locus de TRAC usando un constructo de CAR que selecciona como diana BCMA (SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46). En este ejemplo, las células T activadas se sometieron a electroporación en primer lugar con 2, 3 o 4 complejos de RNP de Cas9:ARNsg distintos que contienen ARNsg que selecciona como diana TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), PD1 (SEQ ID NO: 42), y CD70 (SEQ ID NO: 36 o 37). La rotura bicatenaria del ADN en el locus de TRAC se reparó mediante reparación dirigida por homología con un molde de ADN suministrado por AAV6 que comprende un molde donador (SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45) (que codifica para CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45) que contienen brazos de homología derechos e izquierdos para el locus de TRAC que flanquean a un casete de receptor de antígeno quimérico (-/+ elementos reguladores para la expresión génica).

Las células T modificadas resultantes son células T 2X KO (TRAC-/ β 2M-), 3X KO (TRAC-/ β 2M-/PD1- o TRAC-/ β 2M-/CD70-) y 4X KO (TRAC-/ β 2M-/PD1-/CD70-) CAR+ anti-CD70 (con dominio coestimulador 41BB). La capacidad de estas células T CAR+ anti-CD70 para mejorar la enfermedad provocada por una línea celular de carcinoma renal CD70+ se evaluó en ratones NOG usando métodos empleados por Translational Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). En resumen, se alojaron individualmente 12 ratones hembra de 5-8 semanas de edad CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/ JicTac) en jaulas de microaislamiento ventiladas, mantenidas en condiciones libres de patógeno, 5-7 días antes del inicio del estudio. Los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 5×10^6 células de carcinoma renal A498/ratón en el costado trasero derecho. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 25-75 mm³ (objetivo de ~50 mm³), los ratones se dividieron adicionalmente en 5 grupos de tratamiento tal como se muestra en la **Tabla 15**. El día 1, el grupo de tratamiento 2 a 5 recibió una única dosis intravenosa de 200 μ l de células T CAR+ anti-CD70 según la **Tabla 15**.

Tabla 15. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células A498	Tratamiento con células T (i.v.)	N
1	Ninguno	5×10^6 células/ratón	Ninguno	5
2	Células T 2X KO, CAR+ anti-CD70	5×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	5

3	Células T 3X KO (PD1), CAR+ T anti-CD70	5x10 ⁶ células/ratón	1x10 ⁷ células/ratón	5
4	Células T 3X KO (CD70,) CAR+ anti-CD70	5x10 ⁶ células/ratón	1x10 ⁷ células/ratón	5
5	Células T 4X KO (CD70, PD1), CAR+ anti-CD70	5x10 ⁶ células/ratón	1x10 ⁷ células/ratón	5

Se midió el volumen tumoral 2 veces a la semana desde el día de inicio del tratamiento. Para el día 5, el tratamiento con los cuatro tipos de células CAR T anti-CD70 comenzó a mostrar una disminución en el volumen del tumor y para el día 22, los cuatro tipos de células CAR T anti-CD70 eliminaron completamente los tumores de cáncer de riñón CD70 durante la duración del estudio hasta el día 91 (**Fig. 27A**). Estos datos demuestran que las cuatro células CAR T anti-CD70 pueden producir la regresión de tumores de cáncer de riñón CD70 *in vivo*.

Para someter a prueba la actividad de las células CAR T anti-CD70 después de la reexposición, se inocularon en ratones supervivientes en el costado trasero izquierdo subcutáneo 5x10⁶ células de carcinoma renal A498/ratón el día 25. (**Tabla 16**). Se evaluó la eficacia sostenida desde el día 46 en adelante. Los resultados se muestran en la **FIG. 27B**. El día 56, 5 de 5 ratones tratados con células T 2X, CD70 CAR+ presentaban recrecimiento de los tumores tras la reexposición, 4 de 5 ratones tratados con células T 3X (PD1), CD70 CAR+ presentaban recrecimiento de los tumores tras la reexposición, 2 de 5 ratones tratados con células T 4X (CD70,PD1), CD70 CAR+ presentaban recrecimiento de los

tumores tras la reexposición, mientras que ninguno de los ratones tratados con células T 3X (CD70), CD70 CAR⁺ presentaban recrecimiento de los tumores tras la reexposición. Esta tendencia continuó, el día 70, 4 de 5 ratones tratados con células T 3X (PD1), CD70 CAR⁺ presentaban recrecimiento de los tumores tras la reexposición, 4 de 5 ratones tratados con células T 4X (CD70, PD1), CD70 CAR⁺ presentaban recrecimiento de los tumores tras la reexposición, mientras que solo uno de los ratones tratados con células T 3X (CD70), CD70 CAR⁺ presentaba un recrecimiento tumoral pequeño que comenzó a aparecer a los 34 días tras la reexposición. Incluso hasta el día 91, solo 1 de 5 ratones tratados con células T 3X (CD70), CD70 CAR⁺ estaba comenzando a presentar recrecimiento tumoral, lo que indica que las células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 conservan una eficacia *in vivo* superior tras la reexposición a células tumorales.

Tabla 16. Tamaño de los tumores de reexposición en ratones no tratados o ratones tratados con células CAR T para CD70

Tratamiento con CAR T	Sujeto	Volumen tumoral (mm ³) el día tras la dosificación de células CAR T				
		Día 77	Día 81	Día 84	Día 88	Día 91
2KO, CD70 CAR T	1	1044	1265	1853	1927	2150
	2	653	927	1040	1123	1256
	3	899	1267	1603	1678	2167
	4	701	1287	1672	1817	2490
	5	689	1146	1423	1525	1901
3KO (PD1), CD70 CAR T	1	385	692	983	1172	1369
	2	0	0	0	0	0

5		3	566	738	1030	1537	1740
		4	712	1111	1337	1482	1832
		5	632	778	1017	1129	1289
		1	0	0	0	0	0
		2	34	56	75	104	135
10	3KO (CD70), CD70 CAR T	3	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0
		1	66	91	182	215	304
		2	56	85	119	126	155
15	4KO, CD70 CAR T	3	0	0	0	0	0
		4	76	175	218	256	316
		5	35	30	51	58	63
		1	567	1263	1673	1751	2020
		2	882	1214	1535	1609	2047
20	Sin tratamiento	3	1158	1304	1676	1924	2389
		4	295	391	667	789	1078
		5	707	1213	1676	1766	2056

Tratamiento en modelo tumoral grande

Se investigó la eficacia *in vivo* de células CAR T anti-CD70 frente a tumores de carcinoma de células renales más grandes. Como anteriormente, se usaron CRISPR/Cas9 y AAV6 para crear células T humanas que carecían de la expresión del TCR, β 2M, CD70 y/o PD1 con expresión concomitante del locus de TRAC usando un constructo de CAR que selecciona como diana CD70 (SEQ ID NO: 45). En este ejemplo, las células T activadas se sometieron a electroporación en primer lugar con 2, 3 o 4 complejos de RNP de Cas9:ARNsg distintos que contienen ARNsg que selecciona como diana TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), PD1 (SEQ ID NO: 42), y CD70 (SEQ

ID NO: 36 o 37). La rotura bicatenaria de ADN en el locus de TRAC se reparó mediante reparación dirigida por homología con un molde de ADN suministrado por AAV6 (SEQ ID NO: 43) (que codifica para CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5) que contienen brazos de homología derechos e izquierdos para el locus de TRAC que flanquean a un casete de receptor de antígeno quimérico (-/+ elementos reguladores para la expresión génica).

Las células T modificadas resultantes son células T 2X KO (TRAC-/β2M-), 3X KO (TRAC-/β2M-/PD1- o TRAC-/β2M-/CD70-) y 4X KO (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) CAR+ anti-CD70 (con dominio coestimulador 41BB). La capacidad de estas células T CAR+ anti-CD70 para mejorar la enfermedad provocada por una línea celular de carcinoma renal CD70+ se evaluó en ratones NOG usando métodos empleados por Translational Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). En resumen, se alojaron individualmente 12 ratones hembra de 5-8 semanas de edad CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/ JicTac) en jaulas de microaislamiento ventiladas, mantenidas en condiciones libres de patógeno, 5-7 días antes del inicio del estudio. Los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 5x10⁶ células de carcinoma renal A498/ratón. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 125-175 mm³ (objetivo de ~150 mm³), los ratones se dividieron adicionalmente en 5 grupos de tratamiento tal como se muestra en la **Tabla 17**. El día 1, el grupo de tratamiento 2 a 5 recibió una única dosis intravenosa de 200 µl de células T CAR+ anti-CD70 según la **Tabla 17**.

Tabla 17. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células A498	Tratamiento con células T (i.v.)	N
1	Ninguno	5x10 ⁶ células/ratón	Ninguno	5
2	Células T 2X KO, CD70 CAR+	5x10 ⁶ células/ratón	1x10 ⁷ células/ratón	5
3	Células T 3X KO (PD1), CD70 CAR+	5x10 ⁶ células/ratón	1x10 ⁷ células/ratón	4
4	Células T 3X KO (CD70,) CD70 CAR+	5x10 ⁶ células/ratón	1x10 ⁷ células/ratón	5
5	Células T 4X KO (CD70, PD1), CD70 CAR+	5x10 ⁶ células/ratón	1x10 ⁷ células/ratón	5

Se midió el volumen tumoral 2 veces a la semana desde el día de inicio del tratamiento. Para el día 4 de tratamiento, solo las células T 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70 y las células T 4X KO (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) CAR+ anti-CD70 comenzaron a mostrar una disminución en el volumen tumoral (**FIG. 27C**). En cambio, el crecimiento tumoral para animales tratados con células T 2X KO (TRAC-/β2M-) CAR+ anti-CD70 o células T 3X KO (TRAC-/β2M-/PD1-) CAR+ anti-CD70 era similar al grupo sin tratamiento. Para el día 23 de tratamiento, las células T 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70 eliminaron completamente los tumores de cáncer de riñón CD70+ *in vivo*. Para el día 23 de tratamiento, la eliminación de los tumores en respuesta a las células T 4X KO (TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-) CAR+ anti-CD70 era casi completa, no presentando 4 de 5 ratones tumores de cáncer de riñón detectables *in vivo*.

Estos datos muestran que las células T 3X KO (TRAC-
/β2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70 y las células T 4X KO (TRAC-
/β2M-/PD1-/CD70-) CAR+ anti-CD70 pueden producir una
regresión significativa de tumores de cáncer de riñón CD70+
grandes *in vivo*.

Modelo tumoral *in vivo* para CAR anti-BCMA en el contexto de
PD1, CD70, y PD1 con desactivaciones de CD70.

Se evaluó la eficacia de células T TRAC-/β2M-/(4-1BB
co-stim) CAR+ anti-BCMA, TRAC-/β2M-/PD-1-/anti-BCMA (4-1BB
co-stim), TRAC-/β2M-/CD70-/anti-BCMA (4-1BB co-stim) y TRAC-
/β2M-/PD-1-/CD70-/(4-1BB co-stim) CAR+ anti-BCMA contra el
modelo de xenoinjerto de tumor MM.1S subcutáneo en ratones
NOG. En resumen, se alojaron individualmente 25 ratones
hembra de 5-8 semanas de edad CIEA NOG (NOD.Cg-
Prkdc^{scid}Il12rg^{tm1Sug}/ JicTac) en jaulas de microaislamiento
ventiladas, mantenidas en condiciones libres de patógeno, 5-
7 días antes del inicio del estudio. El día 1, 25 ratones
recibieron una inoculación subcutánea en el costado derecho
de 5x10⁶ células MM.1S en el 50% de Matrigel/ratón. Cuando
el volumen tumoral medio alcanzó entre 75 y 125 mm³, los
ratones se dividieron en 5 grupos de tratamiento (N=5) y se
dosificaron con poblaciones de células T que comprenden ~
50% de células T CAR+ anti-BCMA, tal como se indica en la
Tabla 18.

Tabla 18. Dosificación

Grupo	Célula CAR T	N.º de células inyectadas	Células T CAR+ anti-BCMA	N
1	N/A	N/A	N/A	5

Grupo	Célula CAR T	N.º de células T inyectadas	Células T CAR+ anti-BCMA	N
2	TRAC-/β2M-/anti-BCMA	1x10 ⁷ células/ratón	5 x10 ⁶ (5 millones)	5
3	TRAC-/β2M-/PD-1-/anti-BCMA	1x10 ⁷ células/ratón	5 x10 ⁶ (5 millones)	5
4	TRAC-/β2M-/CD70-/anti-BCMA	1x10 ⁷ células/ratón	5 x10 ⁶ (5 millones)	5
5	TRAC-/β2M-/PD-1-/CD70-/anti-BCMA	1x10 ⁷ células/ratón	5 x10 ⁶ (5 millones)	5

Se midieron volumen del tumor y el peso corporal dos veces por semana y se sacrificaron ratones individuales cuando su volumen tumoral alcanzó $\geq 2000 \text{ mm}^3$.

Para el día 16, todos los grupos de tratamiento mostraron una regresión tumoral de los volúmenes iniciales, mientras que los animales del grupo de control tenían tumores con un promedio de más de 1500 mm^3 . Para el día 27, todos los animales del grupo de control habían alcanzado el punto final de volumen tumoral de $\geq 2000 \text{ mm}^3$ mientras que todos los grupos de tratamiento tenían un volumen tumoral promedio inferior a 20 mm^3 (**Fig. 28A**). El día 45, todos los ratones de cada grupo de tratamiento (grupos 2-5) se sometieron adicionalmente a una exposición tumoral secundaria (reexposición). Los ratones recibieron una segunda inoculación subcutánea en el costado izquierdo de 5×10^6 células MM.1S en el 50% de Matrigel/ratón. Se introdujo un

nuevo grupo de ratones de control (N=5) y también recibieron una inoculación de 5×10^6 células MM.1S en el 50% de matrigel/ratón en el costado izquierdo.

5 Se monitorizó el crecimiento tumoral de todos los ratones tanto en el tumor del costado derecho inicial como en el tumor de reexposición en el costado izquierdo. Todos los grupos de tratamiento inhibieron con éxito el crecimiento tumoral en el tumor inicial del costado derecho en la mayoría de los sujetos (**Fig: 28A; Tabla 19**). Se inhibió el
10 crecimiento tumoral por todos los tratamientos antes y después de la reexposición tumoral durante la duración del experimento hasta el día 77. Solo un sujeto tratado con células T TRAC-/ β 2M-/CD70-/PD1-/CAR⁺ anti-BCMA presentaba crecimiento tumoral desde la exposición a células cancerosas
15 inicial (**Tabla 19**).

Sorprendentemente, el crecimiento del tumor después de reexposición en el costado izquierdo también se inhibió significativamente por todos los grupos de tratamiento desde la fecha de reexposición (día 45) hasta el día 77 (**Fig. 28B; Tabla 19**). Estos datos demuestran que las células T CAR⁺
20 persisten en vivo inhibiendo el crecimiento tumoral inicial, así como inhibiendo el crecimiento de nuevos tumores después de una reexposición con células cancerosas adicionales, aun cuando no se administraran células CAR-T adicionales a estos
25 ratones. Por ejemplo, tres de los cuatro ratones inicialmente tratados con poblaciones de células TRAC-/ β 2M-/CAR⁺ anti-BCMA, tres de los cinco ratones inicialmente tratados con células T TRAC-/ β 2M-/CD70-/CAR⁺ anti-BCMA y tres de los cinco ratones inicialmente tratados con células T TRAC-/ β 2M-/PD1-
30 /CAR⁺ anti-BCMA no presentaban nuevo crecimiento tumoral a pesar de una secuencia exposición (reexposición) a nuevas

células cancerosas. Estos datos demuestran que, inesperadamente, las células T CAR⁺ anti-BCMA son capaces de persistir durante largos períodos de tiempo *in vivo*, por ejemplo, hasta al menos 77 días tras la inyección, y conservan su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales y reducir los volúmenes tumorales durante largos períodos *in vivo*. Estos sorprendentes resultados indican que el uso de tales células T TRAC-/β2M-/CAR⁺ anti-BCMA lograría un efecto anticancerígeno a largo plazo superior *in vivo*.

Se cuantificaron células CD45⁺ humanas a partir de sangre de ratón usando tubos BD Trucount siguiendo el protocolo del fabricante y se detectaron usando anticuerpo anti-CD45 humano conjugado con Brilliant Violet 786 (n.º de cat. de Biolegend 368528). Todos los grupos mostraron valores de menos de 100 células huCD45⁺/μl en la semana 1. Dos semanas después de la dosificación, el número de CD45⁺ circulantes en todos los grupos alcanzó un máximo antes de caer hasta valores anteriores a la semana 1 en la semana 3 (**Fig. 29**). Tras la reexposición el día 45, los sujetos tratados con células T CAR⁺ anti-BCMA pudieron eliminar o inhibir el crecimiento tumoral sin expansión posterior de células CAR T circulantes después de la reexposición al cáncer. Estos datos demuestran además que, inesperadamente, las células T CAR⁺ anti-BCMA son capaces de persistir durante largos períodos de tiempo *in vivo*, por ejemplo, hasta al menos 77 días tras la inyección, y conservan su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales y reducir los volúmenes tumorales durante largos períodos *in vivo*. Estos sorprendentes resultados indican que el uso de células T TRAC-/β2M-/CAR⁺ anti-BCMA, células T TRAC-/β2M-/CD70-/CAR⁺ anti-BCMA y células T TRAC-/β2M-/PD1-/CAR⁺ anti-BCMA

lograría un efecto anticancerígeno a largo plazo superior *in vivo*.

Tabla 19. Tamaño de tumores en ratones no tratados o ratones tratados con células CAR T anti-BCMA

5	Tratamiento	Ratón	Volumen tumoral el día 45 (mm ³)	Volumen tumoral el día 77 (mm ³)	
			Costado derecho	Costado derecho	Costado izquierdo
10	Sin tratamiento	1	TS	TS	TS
		2	TS	TS	TS
		3	TS	TS	TS
		4	TS	TS	TS
		5	TS	TS	TS
15	TRAC-/β2M-/anti-BCMA	1	0	0 (MS el día 59)	0 (MS el día 59:)
		2	0	0	0
		3	0	0	0
		4	0	0	297
		5	FD-T el día 16	FD-T el día 16	FD-T el día 16
20	TRAC-/β2M-/PD1-/anti-BCMA	1	0	0	1820
		2	0	0	0
		3	0	0	487
		4	0	0	0
		5	0	0	0
25		1	10	0	0
		2	0	0	0

5

10

15

Tratamiento	Ratón	Volumen tumoral el día 45 (mm ³)	Volumen tumoral el día 77 (mm ³)	
		Costado derecho	Costado derecho	Costado izquierdo
TRAC-/β2M-/CD70-/anti-BCMA	3	0	0 (TS el día 77)	2349 (TS el día 77)
	4	0	0	0
	5	0	0	258
TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-/anti-BCMA	1	0	0	1157
	2	0	0	1842
	3	0	0	1664
	4	0	0	0
	5	89	1583 (TS el día 73)	1560 (TS el día 73)

20

TS = sacrificado debido al volumen tumoral; MS = sacrificio de moribundos; FD-T = animal encontrado muerto.

Modelo tumoral *in vivo* para CAR anti-BCMA en el contexto de desactivación de CD70: efecto de CD70 KO sobre la dosificación de CAR T moderada

25

30

Se evaluó la eficacia de varios genotipos de células T CAR⁺ anti-BCMA, ambos con y sin desactivaciones de CD70, contra el modelo de xenoinjerto de tumor RPMI-8226 subcutáneo en ratones NOG. En resumen, se alojaron individualmente ochenta y cinco (85) ratones hembra de 5-8 semanas de edad CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Sug}/JicTac) en jaulas de microaislamiento ventiladas, mantenidas en condiciones libres de patógeno, 5-7 días antes del inicio del estudio.

El día 1, los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 10×10^6 células RPMI-8226/ratón. Diez (10) días después de la inoculación con células RPMI-8226, los ratones se dividieron en 17 grupos de tratamiento (N=5) y se les dosificaron poblaciones de células T que comprenden ~80% de células T CAR⁺ anti-BCMA, tal como se indica en la **Tabla 20**.

Tabla 20.

Grupo	Célula CAR T anti-BCMA	N.º de células T inyectadas	Células T CAR+ anti-BCMA	N
1	N/A	N/A	N/A	5
2	TRAC-/β2M-/anti-BCMA	3×10^6 células/ratón	2.4×10^6 (2.4 millones)	5
3	TRAC-/β2M-/anti-BCMA	1×10^6 células/ratón	8×10^5 (0.8 millones)	5
4	TRAC-/β2M-/anti-BCMA	3×10^5 células/ratón	2.4×10^5 (0.24 millones)	5
5	TRAC-/β2M-/anti-BCMA	1×10^5 células/ratón	8×10^4 (0.08 millones)	5
6	TRAC-/β2M-/PD1-/anti-BCMA	3×10^6 células/ratón	2.4×10^6 (2.4 millones)	5
7	TRAC-/β2M-/PD1-/anti-BCMA	1×10^6 células/ratón	8×10^5 (0.8 millones)	5

Grupo	Célula CAR T anti-BCMA	N.º de células T inyectadas	Células T CAR+ anti-BCMA	N
5	8 TRAC-/β2M-/PD1-/anti-BCMA	3x10 ⁵ células/ratón	2.4 x10 ⁵ (0.24 millones)	5
	9 TRAC-/β2M-/PD1-/anti-BCMA	1x10 ⁵ células/ratón	8 x10 ⁴ (0.08 millones)	5
10	10 TRAC-/β2M-/CD70-/anti-BCMA	3x10 ⁶ células/ratón	2.4 x10 ⁶ (2.4 millones)	5
15	11 TRAC-/β2M-/CD70-/anti-BCMA	1x10 ⁶ células/ratón	8 x10 ⁵ (0.8 millones)	5
	12 TRAC-/β2M-/CD70-/anti-BCMA	3x10 ⁵ células/ratón	2.4 x10 ⁵ (0.24 millones)	5
20	13 TRAC-/β2M-/CD70-/anti-BCMA	1x10 ⁵ células/ratón	8 x10 ⁴ (0.08 millones)	5
	14 TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-/anti-BCMA	3x10 ⁶ células/ratón	2.4 x10 ⁶ (2.4 millones)	5
25	15 TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-/anti-BCMA	1x10 ⁶ células/ratón	8 x10 ⁵ (0.8 millones)	5
30	16 TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-/anti-BCMA	3x10 ⁵ células/ratón	2.4 x10 ⁵ (0.24 millones)	5

Grupo	Célula CAR T anti-BCMA	N.º de células T inyectadas	Células T CAR+ anti-BCMA	N
17	TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-/anti-BCMA	1x10 ⁵ células/ratón	8 x10 ⁴ (0.08 millones)	5

Se midieron el volumen tumoral y el peso corporal dos veces a la semana, y se sacrificaron ratones individuales cuando el volumen tumoral era $\geq 2000 \text{ mm}^3$. Para el día 22, los datos muestran una disminución estadísticamente significativa en el volumen tumoral en respuesta a dosis superiores de células CAR T anti-BCMA (dosis de 1×10^5 – 3×10^6 células) en comparación con cualquier genotipo de células CAR T anti-BCMA dosificadas a 100,000 células (grupos 5, 9, 13 y 17) (**FIG. 30; tabla 21**).

El día 36, las células T TRAC-/β2M-/CD70-/CAR+ anti-BCMA dosificadas a una dosis moderada de 3×10^5 células presentaban un mayor efecto sobre la disminución del volumen tumoral que las células T CAR+ anti-BCMA sin una CD70 KO (por ejemplo, células T TRAC-/β2M-/CAR+ anti-BCMA, células T TRAC-/β2M-/PD1-/CAR+ anti-BCMA o células T TRAC-/β2M-/PD1-/CD70-/CAR+ anti-BCMA) (**FIG. 30**). Todas las dosis más altas de 1×10^6 o mayores de todas las células T CAR+ anti-BCMA (**FIG. 30; 1 millón, 3 millones**), mostraron una regresión completa en el volumen tumoral. Esta tendencia continuó hasta el día 57 del estudio.

Estos resultados demuestran que la inhibición de la actividad de CD70 (por ejemplo, desactivando CD70) aumenta la eficacia y potencia de células T CAR+ *in vivo*. Este efecto es independiente de la presencia de un CAR anti-CD70.

Tabla 21.

5	Grup o	Tratami ento	Célul as T CAR+ anti- BCMA/ dosis	Volumen tumoral (mm ³) el día 36					Volumen tumoral (mm ³) el día 57				
10	1	Sin tratami ento	N/A	220	220	186	173	278	179 0	179 4	938	205 5	202 9
15	2	TRAC- /β2M- /anti- BCMA	2.4 x10 ⁶ (2.4 millo nes)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	3		8 x10 ⁵ (0.8 millo nes)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	4		2.4 x10 ⁵ (0.24 millo nes)	65	65	77	56	0	516	441	257	97	337
30	5		8 x10 ⁴ (0.08 millo nes)	264	264	386	276	185	239 1	228 3	205 8	214 7	235 9

5	Grupo	Tratamiento	Células T CAR+ anti- BCMA/ dosis	Volumen tumoral (mm ³) el día 36					Volumen tumoral (mm ³) el día 57				
10	6	TRAC- /β2M- /PD1- /anti- BCMA	2.4 x10 ⁶ (2.4 millones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7		8 x10 ⁵ (0.8 millones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	8		2.4 x10 ⁵ (0.24 millones)	135	135	59	57	28	764	518	280	181	79
25	9		8 x10 ⁴ (0.08 millones)	261	261	265	287	312	153 2	155 7	221 8	201 0	209 8
	10	TRAC- /β2M-	2.4 x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Grupo	Tratamiento	Células T CAR+ anti- BCMA/ dosis	Volumen tumoral (mm ³) el día 36					Volumen tumoral (mm ³) el día 57				
5												
10	/CD70- /anti- BCMA	(2.4 millones)										
11		8 x10 ⁵ (0.8 millones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15		2.4 x10 ⁵ (0.24 millones)	47	47	0	0	0	526	58	47	0	0
20		8 x10 ⁴ (0.08 millones)	292	292	267	313	235	207 5	212 7	209 6	136 5	235 4
25	TRAC- /β2M- /PD1- /CD70-	2.4 x10 ⁶ (2.4 millones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30												

Grupo	Tratamiento	Células T CAR+ anti- BCMA/ dosis	Volumen tumoral (mm ³) el día 36					Volumen tumoral (mm ³) el día 57				
5	/anti- BCMA	8 x10 ⁵ (0.8 millones)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10		2.4 x10 ⁵ (0.24 millones)	100	100	91	19	20	478	576	82	131	289
15		8 x10 ⁴ (0.08 millones)	310	310	319	345	451	152 8	216 0	284 3	255 7	149 9
20												

Ejemplo 9. Células CAR T con desactivaciones múltiples conservan la dependencia de citocinas

Dependencia de citocinas. Para determinar si la edición génica daba como resultado una edición no deseada fuera de diana que podría generar células con propiedades adversas, tales como crecimiento celular descontrolado, se evaluó la capacidad de las células CAR T sometidas a edición génica para crecer en ausencia de citocinas y/o suero.

Células CAR T anti-CD70: Se evaluó la capacidad de células TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 para crecer en

ausencia de citocinas y/o suero. Se sembraron en placa 5×10^6 células TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 ~ 2 semanas tras la producción de células (día 0). Se enumeró el número de células viables 7 y 14 días después de la siembra en medio completo, en suero humano al 5% sin citocinas (IL-2 e IL-7) o medio base que carece de suero y citocinas. No se detectaron células a los 14 días se la siembra en placa en los cultivos que carecían de citocinas, lo que sugiere que cualquier posible efecto fuera de diana debido a la edición del genoma no indujo crecimiento/proliferación independiente de factores de crecimiento en las células (**Fig. 31**). Las células solo proliferaron en presencia de citocinas (medio completo que contiene citocinas) y no proliferaron en presencia de suero solo. Por lo tanto, *in vivo*, las células probablemente no crecerían en ausencia de citocinas, factores de crecimiento o estimulación con antígenos debido a cualquier edición genómica fuera de diana.

Se evaluó también la capacidad de las células TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD1⁻ CAR⁺ anti-CD70 para crecer en ausencia de citocinas y/o suero. Se sembraron en placa 2×10^6 células ~ 2 semanas después de la producción celular (día 0). Se enumeró el número de células viables hasta 26 días después de la siembra en medio completo, en suero humano al 5% sin citocinas (IL-2 e IL-7) o medio base que carece de suero y citocinas. No se detectaron células a los 26 días se la siembra en placa en los cultivos que carecían de citocinas, lo que sugiere que cualquier posible efecto fuera de diana debido a la edición del genoma no indujo crecimiento/proliferación independiente de factores de crecimiento en las células (**Fig. 32**). Las células solo proliferaron en presencia de citocinas (medio completo que

contiene citocinas) y no proliferaron en presencia de suero solo. Por tanto, la edición del genoma no indujo ningún evento adverso que permitiera que las células crecieran en ausencia de estimulación de citocinas, factor de crecimiento o antígeno.

Células T CAR⁺ anti-BCMA Se evaluó la capacidad de las células TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-BCMA para crecer en ausencia de citocinas y/o suero. Las células TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-BCMA también se denominan células 4X KO, BCMA CAR⁺. Se sembraron en placa 1x10⁶ células 4X KO, BCMA CAR⁺ después de las 10 reexposiciones descritas en el **Ejemplo 6**. Se enumeró el número de células viables 7 y 14 días después de la siembra en medio completo, en suero humano al 5% sin citocinas (IL-2 e IL-7) o medio base que carece de suero y citocinas. No se detectaron células a los 13 días se la siembra en placa en los cultivos que carecían de citocinas, lo que sugiere que cualquier posible efecto fuera de diana debido a la edición del genoma no indujo crecimiento/proliferación independiente de factores de crecimiento en las células (**Fig. 33**). Las células solo proliferaron en presencia de citocinas (medio completo que contiene citocinas) y no proliferaron en presencia de suero solo. Por tanto, *in vivo*, es probable que las células no crezcan de un modo descontrolado.

Otras células CAR T: Se ha mostrado previamente que las células T CAR⁺ anti-CD33 y las células T CAR⁺ anti-CD19 ejemplificadas en el presente documento solo proliferaban en presencia de citocinas y no proliferaban en presencia de suero solo. Por tanto, *in vivo*, es probable que estas células no crezcan de un modo descontrolado.

Ensayo de liberación de citocinas. Para medir la liberación de citocinas, las células T y las células diana se incubaron conjuntamente durante 24 horas a las razones indicadas. Se recogió medio sobrenadante para su uso en ELISA de IL-2 o IFN γ (RD Systems) en una placa nueva siguiendo las instrucciones del fabricante (RD Systems).

Se analizó la capacidad de las células TRAC $^{-}$ / β 2M $^{-}$ /CD70 $^{-}$ /CAR $^{+}$ anti-CD70 para producir interleucina-2 (IL-2) cuando se cocultivaron en presencia de células A498 usando el ensayo ELISA. Tanto las células T TRAC $^{-}$ / β 2M $^{-}$ /CD70 $^{-}$ /CAR $^{+}$ anti-CD70 con desactivación triple como las células T TRAC $^{-}$ / β 2M $^{-}$ /CAR $^{+}$ anti-CD70 con desactivación doble secretaban altos niveles de IL-2. Sorprendente, las células TRAC $^{-}$ / β 2M $^{-}$ /CD70 $^{-}$ /CAR $^{+}$ anti-CD70 secretaban niveles más altos de IL-2 que las células TRAC $^{-}$ / β 2M $^{-}$ /CAR $^{+}$ anti-CD70 cuando se cultivaban con células A498 (**FIG. 34**). Estos resultados sugieren que la desactivación del gen CD70 da una ventaja a las células T CAR $^{+}$ anti-CD70 para secretar más IL-2.

Ejemplo 10. Efecto de la desactivación múltiple en células T CAR $^{+}$ anti-CD70 sobre células de carcinoma renal A498

Efecto de la desactivación múltiple sobre la función de células T CAR $^{+}$ anti-CD70.

Ensayo de destrucción celular. La capacidad de edición génica múltiple para destruir células de carcinoma renal A498 se determinó usando el ensayo de destrucción celular descrito anteriormente. En resumen, se incubaron las células TRAC $^{-}$ / β 2M $^{-}$ /CAR $^{+}$ anti-CD70 (2X KO, CD70 CAR $^{+}$), TRAC $^{-}$ / β 2M $^{-}$ /PD-1 $^{-}$ /CAR $^{+}$ anti-CD70 (3X KO (PD-1), CD70 CAR $^{+}$), TRAC $^{-}$ / β 2M $^{-}$ /CD70 $^{-}$ /CAR $^{+}$ anti-CD70 (3X KO (CD70), CD70 CAR $^{+}$) y TRAC $^{-}$ / β 2M $^{-}$ /PD-1 $^{-}$ /CD70 $^{-}$ /CAR $^{+}$ anti-CD70 (4X KO, CD70 CAR $^{+}$) con una línea celular

derivada de RCC adherente a CD70⁺ (células A498) a diversas razones de células CAR T:células diana A498.

Las células TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 presentaban una destrucción celular potente de células derivadas de RCC después de una coincubación de 24 horas (FIG. 35). Las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 cuádruples demostraron una mayor potencia de destrucción celular que las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple que demostraron una mayor potencia que las células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación doble (visible a una razón baja de células T: A498 de 0.5:1 y 0.25:1). Los resultados demuestran que la desactivación de los genes tanto *CD70* como *PD-1* proporcionó a las células CAR⁺ anti-CD70 mayor potencia de destrucción celular.

Las células sometidas a edición génica también presentaban una potente destrucción celular de células derivadas de RCC después de una coincubación de 24 horas a una razón de células CAR T:células diana A948 de 0.24:1. (FIG. 36). Específicamente, las células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple y las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple demostraron mayor potencia que las células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ T anti-CD70 con desactivación doble o las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple. Estos datos indican que la desactivación de CD70 en el contexto de un CAR anti-CD70 mejoró la capacidad de destrucción celular de las células T CAR⁺ anti-CD70.

Ensayo de liberación de citocinas. Se realizó un ensayo de liberación de citocinas tal como se describió anteriormente. La capacidad de las células T CAR⁺ anti-CD70

con desactivación doble, desactivación triple y desactivación cuádruple para producir IL-2 e interferón gamma (IFN-gamma (IFN-g) cuando se cocultivan en presencia de células A498 después de una coincubación de 24 horas a una razón (célula CAR T:célula diana A498) de 0.25:1 se evaluó usando un ensayo ELISA. Se midieron IL-2 e IFN-g de los sobrenadantes de cocultivos celulares. Las células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación triple y las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple secretaron los niveles más altos de IFN-g (**FIG. 37A**) e IL-2 (**FIG. 37B**) cuando se cocultivaron con células A498.

Efecto de la desactivación de CD70 sobre la expresión de marcadores de agotamiento

Los niveles de los marcadores de agotamiento PD-1 y LAG3 se evaluaron en las células T TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 (2X KO, CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 (3X KO (PD-1), CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 (3X KO (CD70), CD70 CAR⁺) y TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 (4X KO, CD70 CAR⁺) usadas en los ejemplos anteriores. Se evaluaron células T CD4⁺ para determinar su expresión de PD-1 (**FIG. 38**) y se evaluaron tanto células T CD8⁺ como células T CD4⁺ para determinar su expresión de LAG3 (**FIG. 39A** y **FIG. 39B**, respectivamente) mediante citometría de flujo.

Los datos demuestran que CD70 KO reduce la expresión de marcadores de agotamiento en células CAR T. Los datos en la **FIG. 38** muestran que la expresión de PD-1 disminuye, tal como se esperaba, cuando se desactiva PD-1, y también disminuye cuando se desactiva CD70.

Los datos en las **FIG. 39A** y **39B** muestran que la desactivación de CD70 reduce la expresión del marcador LAG3 en células CD4 y CD8.

Los datos demuestran que la desactivación de CD70, específicamente, podría reducir el posible agotamiento de las poblaciones sometidas a edición génica de CD8⁺ y CD4⁺ de células T CAR⁺ conduciendo a mejores productos terapéuticos.

Ejemplo 11. CD70 KO mejora la destrucción celular en múltiples tipos de células

Expresión de CD70 en diversas líneas de células cancerosas. Se midió la expresión de CD70 relativa en diversas líneas de células cancerosas para evaluar adicionalmente la capacidad de células T CAR⁺ anti-CD70 para destruir diversos tipos de cáncer. Se midió la expresión de CD70 mediante análisis FACS usando el anticuerpo anti-CD70 humano Alexa Fluor 647 (n.º de cat. de BioLegend 355115). La **FIG. 40A** (gráfico izquierdo) muestra la expresión relativa de CD70 en células ACHN, tal como se mide mediante FACS, en comparación con otras líneas celulares de cáncer de riñón A498, 786-O, cacki-1 y Caki-2. Adicionalmente, se evaluaron líneas celulares distintas de cáncer de riñón para determinar su expresión de CD70 mediante análisis FACS (**Tabla 22, FIG. 40A** y **FIG. 40B**) usando o bien un anticuerpo anti-CD70 humano Alexa Fluor 647 (n.º de cat. de BioLegend 355115; **FIG. 40A**, panel derecho) o bien un anticuerpo anti-CD70 humano FITC (n.º de cat. de BioLegend 355105) en **FIG. 40B**. SNU-1 (células de cáncer intestinal) presentaban altos niveles de expresión de CD70 que eran similares a A498 (**FIG. 40A**, panel derecho). Las líneas celulares SKOV-3 (ovario), HuT78 (linfoma), NCI-H1975 (pulmón) y Hs-766T (páncreas) presentaban niveles de expresión de CD70 que eran similares

o superiores a ACHN pero inferiores a A498 (Tabla 22, FIG. 40B).

Tabla 22.

Línea celular	Tipo de cáncer	Expresión de CD70 relativa
A498	Carcinoma de riñón	Alta
ACHN	Riñón (derivado de metástasis)	Media-baja
SK-OV-3	Adenocarcinoma de ovario	Media
NCI-H1975	Adenocarcinoma de pulmón (NSCLC)	Media
Calu-1	Carcinoma de pulmón	Baja
DU 145	Carcinoma de próstata	Baja
SNU-1	Carcinoma gástrico	Alta
Hs 766T	Carcinoma pancreático	Media
MJ	Linfoma de células T	Alta
HuT78	Linfoma de células T	Media
HuT102	Linfoma de células T	Media
PANC-1	Carcinoma pancreático	Baja
U937	AML	Sin expresión
K562	Leucemia mielógena crónica	Sin expresión (control negativo)

Ensayo de destrucción celular. Se determinó la capacidad de células CAR⁺ anti-CD70 sometidas a múltiples ediciones génicas para destruir células de carcinoma renal ACHN usando el ensayo de destrucción celular descrito anteriormente. Las células TRAC⁻/β2M⁻/CAR⁺ anti-CD70 (2X KO, CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CAR⁺ anti-CD70 (3X KO (PD-1), CD70 CAR⁺), TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 (3X KO (CD70), CD70 CAR⁺) y TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 (4X KO,

CD70 CAR⁺) se incubaron con una línea celular derivada de RCC adherente que expresaba bajos niveles de antígeno CD70 (células ACHN) (la **FIG. 40A** muestra la expresión relativa de CD70 en células ACHN, tal como se mide mediante FACS, en comparación con otras líneas celulares de cáncer de riñón A498, 786-O, cacki-1 y Caki-2) a una razón de células CAR T:células diana ACHN de 0.5:1 (**FIG. 40C**) y 0.25:1 (**FIG. 40D**). Las células sometidas a edición génica presentaban una potente destrucción celular de células derivadas de RCC después de una coincubación de 24 horas (**FIG. 40C y 40D**). Las células demostraron una mayor potencia cuando se desactivó PD-1, cuando se desactivó CD70 e incluso una potencia ligeramente mayor cuando se desactivaron tanto PD-1 como CD70. En conclusión, la desactivación de PD-1 o CD70 o de tanto PD-1 como CD70 juntos mejora la capacidad de destrucción celular de las células CAR⁺ anti-CD70 en células ACHN.

Aunque se encontró que las células ACHN expresaban niveles de moderados a bajos de CD70, eran sorprendentemente susceptibles a la destrucción por células T 3X KO (PD-1), CD70 CAR⁺, células T 3X KO (CD70), CD70 CAR⁺ y células T 4X KO CD70 CAR⁺ T (**FIG. 40C y 40D**). Esto indica que una alta expresión de CD70 no es un requisito para la destrucción eficaz de una célula diana por células T sometidas a edición génica que expresan un CAR anti-CD70. Adicionalmente, dado que se encontró que los niveles de expresión de CD70 en las líneas celulares SNU-1, SK-OV-3, NCI-H1975 y HS-766T eran similares o superiores a ACHN, se esperaba que las células T CAR⁺ anti-CD70 fueran especialmente eficaces en la destrucción de estos tipos de células cancerosas también. De hecho, se encontró que TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-

CD70 (4X KO, CD70 CAR⁺) y TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 (3X KO (CD70), CD70 CAR⁺) presentaban una destrucción celular sorprendentemente potente de numerosas líneas celulares de tumores sólidos después de solo 24 horas de cocultivo (la **FIG. 40E** muestra la destrucción por células T 4X KO CAR⁺ y la **FIG. 40F** muestra la destrucción con células T 3X KO CAR⁺). Tanto células T 3X KO, CD70 CAR⁺ como 4X KO, CD70 CAR⁺ destruyeron >60% de células tumorales de riñón, páncreas y ovario (A498, ACHN, SK-OV-3 y Hs-766T) a una razón de efector:célula diana de 4:1 y >50% a una razón de efector:célula diana de 1:1. La destrucción celular de líneas de células cancerosas que tenían una expresión de CD70 de media a baja (NCI-H1975, Calu-1 y DU 145) era todavía eficaz con >30% de destrucción a una razón de efector:célula diana de 4:1 en el plazo de 24 horas de cocultivo (**FIG. 40E** y **40F**). Una exposición más prolongada (es decir, 96 horas) a células T 3X KO o 4X KO, CD70 CAR⁺ dio como resultado un aumento en destrucción de células cancerosas en todos los tipos de células, particularmente para las células SKOV-3, Hs-766T y NIC-H1975 en las que la destrucción era >80% a una razón de efector:célula diana de 1:1 (**Fig. 40G**).

Se evaluó la destrucción de células SNU-1 mediante evaluación visual.

La destrucción de células diana después de una exposición prolongada a células T CAR⁺ también se evaluó mediante microscopía para células cancerosas SNU-1. Se sembraron en placa células SNU-1 a una densidad de 1 millón de células por pocillo en una placa de 6 pocillos y se mezclaron en una razón de efector:diana de 4:1 con células T 3X KO (CD70), CAR⁺ anti-CD70. El cocultivo se incubó durante seis (6) días y se evaluó mediante microscopio la

presencia de células cancerosas viables. Todas las células diana de carcinoma gástrico (SNU-1) se eliminaron en pocillos que contenían células T TRAC⁻/β2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70, en comparación con pocillos de control, lo que indica
5 que las células cancerosas se eliminaron completamente por las células T CAR⁺ anti-CD70 con un cocultivo prolongado.

Se determinó la capacidad de las células T CAR⁺ anti-CD70 para destruir selectivamente células que expresan CD70. Se diseñó un ensayo de citometría de flujo para someter a
10 prueba la destrucción de líneas de células cancerosas en suspensión (por ejemplo, células cancerosas K562, MM.1S y HuT78 que se denominan "células diana") por células T 3X KO (CD70) (TRAC⁻/B2M⁻/CD70⁻) CAR⁺ anti-CD70. Dos de las líneas celulares diana que se usaron eran células cancerosas que
15 expresan CD70 (por ejemplo, MM.1S y HuT78), mientras que una tercera que se usó como células cancerosas de control negativo carece de expresión de CD70 (por ejemplo, K562). Las células T TRAC⁻/B2M⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 se cocultivaron con o bien las líneas celulares MM.1S o HuT78 que expresan
20 CD70 o bien la línea celular K562 negativa para CD70. Las células diana se marcaron con efluor670 5 μM (eBiosciences), se lavaron y se sembraron a una densidad de 50,000 células diana por pocillo en una placa de fondo en U de 96 pocillos. Las células diana se cocultivaron con células T TRAC⁻/B2M⁻
25 /CD70⁻ CAR⁺ anti-CD70 a razones variables (0.5:1, 1:1, 2:1 y 4:1 células T CAR⁺ con respecto a células diana) y se incubaron durante la noche. La destrucción de las células diana se determinó después de un cocultivo de 24 horas. Se lavaron las células y se añadieron a cada pocillo 200 μL de
30 medio que contenía una dilución 1:500 de DAPI 5 mg/ml (Molecular Probes) (para enumerar las células

muertas/moribundas). Entonces se analizaron las células mediante citometría de flujo y se cuantificó la cantidad de células diana vivas restantes.

Las **FIG. 40H, FIG. 40I y FIG. 40J** demuestran la destrucción de células diana selectiva por células T TRAC-/B2M-/CD70- CAR+ anti-CD70. Un cocultivo de 24 horas con células T 3X KO (CD70) CAR+ dio como resultado una destrucción casi completa de células de linfoma de células T (HuT78), incluso a una baja razón de células T CAR+ con respecto a células diana que expresan CD70 de 0.5:1 (**FIG. 40J**). Asimismo, un cocultivo de 24 horas dio como resultado una destrucción casi completa de células de mieloma múltiple (MM.1S) a todas las razones de células T CAR+ con respecto a células diana sometidas a prueba (**Fig. 40I**). Se encontró que la destrucción de células diana era selectiva porque las células T TRAC-/B2M-/CAR+ anti-CD70 no indujeron destrucción de células K562 deficientes en CD70 que estaba por encima del nivel de muestras de control (por ejemplo, o bien células cancerosas solas o bien un cocultivo sin células T RNP) a cualquier razón de efector:célula diana sometida a prueba (**FIG. 40H**).

Ensayo de liberación de citocinas. Se realizó un ensayo de liberación de citocinas tal como se describió anteriormente. La capacidad de las células T CAR+ anti-CD70 con desactivación doble, desactivación triple y desactivación cuádruple para producir IL-2 e IFN-g cuando se cocultivaron en presencia de células ACHN después de una coincubación de 24 horas a una razón (células CAR T:células diana ACHN) de 0.25:1 se evaluó usando un ensayo ELISA. Se midieron IL-2 e IFN-g de los sobrenadantes de cocultivos celulares. Las células T TRAC-/β2M-/CD70-/CAR+ anti-CD70 con

desactivación triple y las células T TRAC⁻/β2M⁻/PD-1⁻/CD70⁻/CAR⁺ anti-CD70 con desactivación cuádruple secretaron los niveles más altos de IFN-γ (**FIG.41**) e IL-2 (**FIG. 41B**) cuando se cocultivaron con células ACHN. En conclusión, la desactivación de CD70 o de tanto PD-1 como CD70 juntos mejora la capacidad de destrucción celular de las células CAR⁺ anti-CD70 en células ACHN.

**Ejemplo 12. Eficacia de CD70 KO en células T CAR⁺ anti-CD70:
El modelo de xenoinjerto tumoral en ratones NOG**

Tratamiento en el modelo de tumor de ovario

La capacidad de células T que expresan un CAR anti-CD70 para eliminar células de adenocarcinoma de ovario que expresan niveles moderados de CD70 se evaluó *in vivo* usando un modelo de xenoinjerto de tumor de carcinoma de ovario subcutáneo (SKOV-3) en ratones.

Se usaron CRISPR/Cas9 y AAV6 como anteriormente (véase, por ejemplo, el ejemplo 3) para generar células T humanas que carecen de la expresión de TCR, β2M, CD70 con expresión concomitante del locus de TRAC usando un constructo de CAR que selecciona como diana CD70 (SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46. En este ejemplo, se sometieron en primer lugar células T activadas a electroporación con 3 complejos de RNP de Cas9:ARNsg distintos que contenían ARNsg que seleccionan como diana TRAC (SEQ ID NO: 40), β2M (SEQ ID NO: 41), y CD70 (SEQ ID NO: 36 o 37). La rotura bicatenaria del ADN en el locus de TRAC se reparó mediante reparación dirigida por homología con un molde de ADN suministrado por AAV6 que comprende un molde donador (SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45) (que codifica para CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45) que contienen brazos de homología derechos e izquierdos para el locus de TRAC que

flanquean a un casete de receptor de antígeno quimérico (-/+ elementos reguladores para la expresión génica).

Las células T modificadas resultantes son células T 3X KO (TRAC-/ β 2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70. La capacidad de estas células T CAR+ anti-CD70 para mejorar la enfermedad provocada por una línea celular de carcinoma de ovario CD70+ se evaluó en ratones NOG usando métodos empleados por Translational Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). En resumen, se alojaron individualmente 12 ratones hembra de 5-8 semanas de edad CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il12rg^{tm1Sug}/ JicTac) en jaulas de microaislamiento ventiladas, mantenidas en condiciones libres de patógeno, 5-7 días antes del inicio del estudio. Los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 5×10^6 células de carcinoma de ovario SKOV-3/ratón en el costado trasero derecho. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 25-75 mm³ (objetivo de ~50 mm³), los ratones se dividieron adicionalmente en dos grupos de tratamiento tal como se muestra en la **Tabla 23**. El día 1, el grupo de tratamiento 2 recibió una única dosis intravenosa de 200 μ l de células T CAR+ anti-CD70CAR según la **Tabla 23**.

Tabla 23. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células SKOV-3	Tratamiento con células T (<i>i.v.</i>)	N
1	Ninguno	5×10^6 células/ratón	Ninguno	5
2	Células T 3X KO (CD70,) CAR+ anti-CD70	5×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	5

Se midió el volumen tumoral 2 veces a la semana desde el día de inicio del tratamiento. Para el día 9 después de la inyección, los tumores tratados con células CART anti-CD70 comenzaron a mostrar una disminución en el volumen tumoral en relación con tumores en animales no tratados. Para el día 17 después de la inyección, los tumores de cáncer de ovario CD70+ en ratones tratados con células CAR T anti-CD70 se eliminaron por completo. Esta regresión completa del crecimiento tumoral se mantuvo en los animales tratados hasta el día 44 después de la inyección, después de lo cual 4 de 5 ratones tratados con células CART anti-CD70 permanecieron libres de tumores hasta el final de la observación (día 69) (**Fig. 42A**). Estos datos demuestran que células 3X KO (TRAC-/ β 2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70 son altamente potentes *in vivo* para tratar tumores de ovario humanos.

Tratamiento en el modelo de tumor de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP)

La capacidad de células T que expresan un CAR para CD70 para eliminar células de adenocarcinoma de pulmón que expresan niveles moderados de CD70 se evaluó *in vivo* usando un modelo de xenoinjerto de tumor de carcinoma de pulmón subcutáneo (NCI-H1975) en ratones.

Se usaron CRISPR/Cas9 y AAV6 como anteriormente (véase, por ejemplo, el ejemplo 3) para crear células T humanas que carecen de la expresión de TCR, β 2M, CD70 con expresión concomitante del locus de TRAC usando un constructo de CAR que selecciona como diana CD70 (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44). En este ejemplo, se sometieron en primer lugar células T activadas a electroporación con 3 complejos de RNP de Cas9:ARNsg distintos que contenían ARNsg que seleccionan como diana TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), y CD70

(SEQ ID NO: 36 o 37). La rotura bicatenaria de ADN en el locus de TRAC se reparó mediante reparación dirigida por homología con un molde de ADN suministrado por AAV6 (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44) (que codifica para CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45) que contienen brazos de homología derechos e izquierdos para el locus de TRAC que flanquean a un casete de receptor de antígeno quimérico (+/- elementos reguladores para la expresión génica).

Las células T modificadas resultantes son células T 3X KO (TRAC-/ β 2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70 (con dominio coestimulador 41BB). La capacidad de estas células T CAR+ anti-CD70 para mejorar la enfermedad provocada por una línea celular de carcinoma de pulmón CD70+ se evaluó en ratones NOG usando métodos empleados por Translational Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). En resumen, se alojaron individualmente 12 ratones hembra de 5-8 semanas de edad CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il12rg^{tm1Sug}/ JicTac) en jaulas de microaislamiento ventiladas, mantenidas en condiciones libres de patógeno, 5-7 días antes del inicio del estudio. Los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 5×10^6 células de carcinoma de pulmón NCI-H1975/ratón en el costado trasero derecho. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 25-75 mm³ (objetivo de ~50 mm³), los ratones se dividieron adicionalmente en 2 grupos de tratamiento tal como se muestra en la **Tabla 24**. El día 1, el grupo de tratamiento 2 recibió una única dosis intravenosa de 200 μ l de células T CAR+ anti-CD70CAR según la **Tabla 24**.

Tabla 24. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células NCI-H1975	Tratamiento con células T (<i>i.v.</i>)	N
1	Ninguno	5x10 ⁶ células/ratón	Ninguno	5
2	Células T 3X KO (CD70,) CAR+ anti-CD70	5x10 ⁶ células/ratón	1x10 ⁷ células/ratón	5

Se midió el volumen tumoral 2 veces a la semana desde el día de inicio del tratamiento. Para el día 12 después de la inyección, los tumores tratados con células CAR T anti-CD70 comenzaron a mostrar una disminución en el volumen tumoral en relación con tumores en animales no tratados. Esta regresión completa de los tumores en los animales tratados continúa hasta el día 33 después de la inyección. El tratamiento con células CAR T anti-CD70 dio como resultado una potente actividad contra xenoinjertos de cáncer de pulmón H1975 establecidos durante 40 días después de la inyección (el recrecimiento tumoral se suprimió en todos los ratones hasta el día 40 con un tamaño tumoral <100 mm³), tras lo cual los tumores comenzaron a crecer. (**FIG. 42B**). Estos datos demuestran que células 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70 tienen una potente actividad contra tumores de cáncer de pulmón CD70+ humanos in vivo.

Tratamiento en el modelo de tumor de páncreas

La capacidad de células T que expresan un CAR para CD70 para eliminar células de carcinoma de páncreas que expresan niveles moderados de CD70 se evaluó in vivo usando un modelo de xenoinjerto de tumor de páncreas subcutáneo (Hs 766T) en ratones.

Se usaron CRISPR/Cas9 y AAV6 como anteriormente (véase, por ejemplo, el ejemplo 3) para crear células T humanas que carecen de la expresión de TCR, β 2M, CD70 con expresión concomitante del locus de TRAC usando un constructo de CAR que selecciona como diana CD70 (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44). En este ejemplo, se sometieron en primer lugar células T activadas a electroporación con 3 complejos de RNP de Cas9:ARNsg distintos que contenían ARNsg que seleccionan como diana TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), y CD70 (SEQ ID NO: 36 o 37). La rotura bicatenaria de ADN en el locus de TRAC se reparó mediante reparación dirigida por homología con un molde de ADN suministrado por AAV6 (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44) (que codifica para CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45) que contienen brazos de homología derechos e izquierdos para el locus de TRAC que flanquean a un casete de receptor de antígeno quimérico (+/- elementos reguladores para la expresión génica).

Las células T modificadas resultantes son células T 3X KO (TRAC-/ β 2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70. La capacidad de estas células T CAR+ anti-CD70 para mejorar la enfermedad provocada por una línea celular de carcinoma de páncreas CD70+ se evaluó en ratones NOG usando métodos empleados por Translational Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). En resumen, se alojaron individualmente 12 ratones hembra de 5-8 semanas de edad CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Sug}/JicTac) en jaulas de microaislamiento ventiladas, mantenidas en condiciones libres de patógeno, 5-7 días antes del inicio del estudio. Los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 5×10^6 células de carcinoma de páncreas Hs766T en el costado trasero derecho. Cuando el tamaño tumoral medio

alcanzó 25-75 mm³ (objetivo de ~50 mm³), los ratones se dividieron adicionalmente en 2 grupos de tratamiento tal como se muestra en la **Tabla 25**. El día 1, el grupo de tratamiento 2 recibió una única dosis intravenosa de 200 µl de células T CAR+ anti-CD70 según la **Tabla 25**.

Tabla 25. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células Hs766T	Tratamiento con células T (i.v.)	N
1	Ninguno	5x10 ⁶ células/ratón	Ninguno	5
2	Células T 3X KO (CD70,) CAR+ anti-CD70	5x10 ⁶ células/ratón	1x10 ⁷ células/ratón	5

Se midió el volumen tumoral 2 veces a la semana desde el día de inicio del tratamiento. Para el día 15 después de la inyección, los tumores tratados con células CAR T anti-CD70 comenzaron a mostrar una disminución en el volumen tumoral en todos los ratones tratados. El tratamiento con células T CAR+ anti-CD70 redujo eficazmente el tamaño de los tumores de cáncer de páncreas CD70+, en todos los ratones sometidos a prueba (<37 mm³) sin evidencia de crecimiento adicional durante la duración del estudio (hasta el día 67) (**Fig. 42C**). Estos datos demuestran que células 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70 inducen la regresión de tumores de cáncer de páncreas CD70+ humanos *in vivo*, con una potente actividad contra xenoinjertos de cáncer de páncreas Hs766T establecidos y respuestas duraderas más allá de 60 días tras el inicio del tratamiento.

Tratamiento en el modelo de xenoinjerto de tumor de linfoma de células T cutáneo

La capacidad de células T que expresan un CAR anti-CD70 para eliminar el linfoma de células T se evaluó *in vivo* usando un modelo de xenoinjerto de tumor de linfoma de células T subcutáneo (Hu T78) en ratones.

5 Se usaron CRISPR/Cas9 y AAV6 como anteriormente (véase, por ejemplo, el ejemplo 3) para crear células T humanas que carecen de la expresión de TCR, β 2M, CD70 con expresión concomitante del locus de TRAC usando un constructo de CAR que selecciona como diana CD70 (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 10 44). En este ejemplo, se sometieron en primer lugar células T activadas a electroporación con 3 complejos de RNP de Cas9:ARNsg distintos que contenían ARNsg que seleccionan como diana TRAC (SEQ ID NO: 40), β 2M (SEQ ID NO: 41), y CD70 (SEQ ID NO: 36 o 37). La rotura bicatenaria de ADN en el 15 locus de TRAC se reparó mediante reparación dirigida por homología con un molde de ADN suministrado por AAV6 (SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44) (que codifica para CAR anti-CD70 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45) que contienen brazos de homología derechos e izquierdos para el 20 locus de TRAC que flanquean a un casete de receptor de antígeno quimérico (+/- elementos reguladores para la expresión génica).

Las células T modificadas resultantes son células T 3X KO (TRAC-/ β 2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70. La capacidad de estas 25 células T CAR+ anti-CD70 para mejorar la enfermedad provocada por una línea celular de linfoma de células T CD70+ se evaluó en ratones NOG usando métodos empleados por Translational Drug Development, LLC (Scottsdale, AZ). En resumen, se alojaron individualmente 12 ratones hembra de 5-8 semanas de 30 edad CIEA NOG (NOD.Cg-Prkdc^{scid}I12rg^{tm1Sug}/ JicTac) en jaulas de microaislamiento ventiladas, mantenidas en condiciones

libres de patógeno, 5-7 días antes del inicio del estudio. Los ratones recibieron una inoculación subcutánea de 3×10^6 células de linfoma de células T HuT78 en el costado trasero derecho. Cuando el tamaño tumoral medio alcanzó 25-75 mm³ (objetivo de ~50 mm³), los ratones se dividieron adicionalmente en 2 grupos de tratamiento tal como se muestra en la **Tabla 26**. El día 1, el grupo de tratamiento 2 recibió una única dosis intravenosa de 200 µl de células T CAR+ anti-CD70 según la **Tabla 26**.

Tabla 26. Grupos de tratamiento

Grupo	CAR-T	Células HuT78	Tratamiento con células T (i.v.)	N
1	Ninguno	3×10^6 células/ratón	Ninguno	5
2	Células T 3X KO (CD70,) CAR+ anti-CD70	3×10^6 células/ratón	1×10^7 células/ratón	4

Se midió el volumen tumoral 2 veces a la semana desde el día de inicio del tratamiento. Para el día 12 después de la inyección, los tumores tratados con células CAR T anti-CD70 comenzaron a mostrar una disminución en el volumen tumoral en todos los ratones tratados. El tratamiento con células T CAR+ anti-CD70 redujo eficazmente el tamaño de los tumores de linfoma de células T CD70+ en todos los ratones sometidos a prueba el día 15 (**Fig. 42C**). Estos datos demuestran que células 3X KO (TRAC-/β2M-/CD70-) CAR+ anti-CD70 inducen la regresión de tumores de linfoma de células T CD70+ humanos *in vivo*, con una potente actividad contra xenoinjertos de linfoma de células T HuT78 establecidos.

Resumen de secuencias

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
5	1 Indel de TRAC	AAGAGCAACAAATCTGACT
	2 Indel de TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT
10	3 Indel de TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGGAGCAACAAATCTGACTAAGAGCAACAATCTGACT
	4 Indel de TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGGAGCAACAAATCTGACTAAGAGCAACAATCTGACT
15	5 Indel de TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT
	6 Indel de TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGTGGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT
20	7 Indel de TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT
	8 Indel de TRAC	AAGAGCAACAGTGCTGTGTGCCTGGAGCAACAAATCTGACTAAGAGCAACAAATCTGACT
25	9 Indel de B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT
30	10 Indel de B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGCCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT

5	11	Indel de B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGAGGC TATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT
	12	Indel de B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGATAG CCTGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT
	13	Indel de B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCC TACCCTCCCGCT
10	14	Indel de B2M	CGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGTGGCC TGGAGGCTATCCAGCGTGAGTCTCTCCTACCCTCCCGCT
15	15	ARNsg	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuagagcuagaaauagcaag uuaaaaaauaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcuuuu
	16	ARNsg	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuagagcuagaaauagcaag uuaaaaaauaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugc
20	17	ARNsg	n ₍₁₇₋ 30) guuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaggcuagucc guuaucaacuugaaa aaguggcaccgagucggugcu ₍₁₋₈₎
25	18	Secuenci a de nucleót idos de 4-1BB	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAG CTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
30			

5

10

15

20

25

30

19	Secuenc ia de aminoác idos de 4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL
20	Secuenc ia de aminoác idos de CD28	SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
21	Secuenc ia de nucleót idos de CD3-z	CGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGC AAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCG CGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCG GAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGAC TCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTC AGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCAC GATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGT ACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGA
22	Secuenc ia de aminoác idos de CD3-z	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
23	ARNsg de CD70 (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACCAAUguuuuagagcuagaaauagcaag uuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU

5	24	ARNsg de CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGACCAAguuuuagagcuagaaauagcaag uuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU
	25	ARNsg de CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCCUAguuuuagagcuagaaauagcaag uuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU
10	26	ARNsg de CD70 (E1_T7)	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGguuuuagagcuagaaauagcaag uuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU
	27	ARNsg de CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCAUAguuuuagagcuagaaauagcaag uuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU
15	28	ARNsg de CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCGCACguuuuagagcuagaaauagcaag uuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU
	29	ARNsg de CD70 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCGUGAguuuuagagcuagaaauagcaag uuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU
20	30	ARNsg de TRAC	AGAGCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaag uuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU

5	31	ARNsg de β2M	GCUACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaaauagcaag uuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU
	32	ARNsg de PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACACAUGuuuuagagcuagaaauagcaag uuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcacc gagucggugcUUUU
10	33	ARNsg de CD70 (E1_T1)	U*C*A*CCAAGCCCGCGACCAUguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U
15	34	ARNsg de CD70 (E1_T3)	A*U*C*ACCAAGCCCGCGACCAAguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U
20	35	ARNsg de CD70 (E1_T4)	C*G*G*UGCGGCGCAGGCCCUAguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U
	36	ARNsg de CD70 (E1_T7)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGCGuuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U
25	37	ARNsg de CD70 (E1_T8)	G*C*C*CGCAGGACGCACCCAUAguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U
30	38	ARNsg de CD70 (E1_T10)	G*U*G*CAUCCAGCGCUUCGCACguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U

5	39	ARNsg de CD70 (E3_T1)	C*A*G*CUACGUAUCCAUCGUGAguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U
	40	ARNsg de TRAC	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCCguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U
	41	ARNsg de β 2M	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCCguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U
	42	ARNsg de PD-1	C*U*G*CAGCUUCUCCAACACAUguuuuagagcuagaaauagc aaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggc accgagucggugcU*U*U*U
10			
15			
20	43	CD70 rAAV (CD70B scFV con 41BB)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCC GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTGCCTCCGGCCTCAGTGAGCGAG CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGT TCCTGCGGCCGCACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACT TGCTCAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTT AGACGCAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAAT GAGAGAGCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTA ATGCCAACATAACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGC CTAAGTTGGGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTT GCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCA GAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAA AAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTT CCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAA ATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCC TGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTA
25			
30			

5

10

15

20

25

30

TTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACA
GAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCT
GGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGTCCTAACCCCTG
ATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGT
GTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTG
CCTATTACCGATTTTGGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAG
TAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTGCTAGA
CATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGG
CAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAG
GGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGG
TAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTTC
CCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCG
TGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG
TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGG
GTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCA
GTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTG
GGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCG
TGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGT
GCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGA
TAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTTTGATGACCTGCTGCGAC
GCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGA
TCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGA
CGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGG
CCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA
AGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTG
TATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACC
AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGC
AGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGC
GGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTC
AGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC

5

10

15

20

25

30

CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC
TTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCA
CACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTT
GATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATC
TTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTT
TCTTCCATTTCAGGTGTCGTGACCACCATGGCGCTTCCGGTG
ACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCA
AGGCCGCAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAA
AAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGGT
TATACGTTACGAACCTACGGGATGAATTGGGTTCCGCAAGCG
CCGGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATACCTAC
ACCGGCGAACCTACATACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTC
ACTATGACGCGGATACCAGCATATCCACCGCATACATGGAG
CTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGT
GCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAG
GGTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCAGTGGC
GGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGGTGACATAGTTATG
ACCCAATCCCCAGATAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGG
GCAACGATTAATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGC
GGATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACAA
CCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCT
GGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGAAGTAC
TTTACGCTCACGATCAGTTCACTGCAGGCTGAGGATGTAGCG
GTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACCTTC
GGTCAAGGCACGAAAGTAGAAATTAAAAGTGCTGCTGCCTTT
GTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCC
CCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCT
CTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCCGGGGGT
GCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTAC
ATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTTG

5

10

15

20

25

30

TCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAA
 CGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTT
 ATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGC
 TGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGA
 GTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAA
 GGACAGAATCAGCTGTATAACGAAGTGAATTTGGGACGCCGC
 GAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCG
 GAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGA
 CTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
 TCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGT
 CACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGAT
 ACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAA
 TAATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTT
 TTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACG
 CCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCA
 GCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCC
 TTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAA
 TGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCC
 ATTGCCACCAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCT
 TGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATG
 AAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTC
 TCTCCAAGTGAAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGT
 TTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTC
 TCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAAT
 CTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATT
 ACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGG
 TGTTGAAGTGGAGGAATTAAGAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCC
 CAGAGGAAGCACCATTTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGC
 TGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTAAAC
 TCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGG

5			AAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTA CCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAG CTCAATGAGAAAGGTAACCACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCG TCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCC CTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAG CGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
10	44	CD70 LHA a RHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCG AGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTT ATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAA TGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTC CCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAG 15 ATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATG CCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAG AAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGC CCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCG TGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAG CTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT 20 TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTT GCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCATCACTGGCATCTG GACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGT CCTAACCCCTGATCCTCTTGTCACAGATATCCAGAACCCCTGA CCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAG 25 TCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGT CACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGT GCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCA GTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGG GGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCG 30 GGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTT

5

10

15

20

25

30

TCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC
 GTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG
 TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG
 TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGT
 ACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGA
 GAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCT
 TGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAA
 TCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTC
 TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTT
 TTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA
 CTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCCG
 TGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCG
 CGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGC
 CTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCC
 CTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAGTTGCGTGAGCG
 GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAAT
 GGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCAC
 ACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGT
 GACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGT
 TCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG
 GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
 GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAT
 TTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCA
 GACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA
 CCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGC
 GCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCGAGGTCCAGTTGGTGCAA
 AGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACCGGCGCTTCCGTGAAGGTGT
 CCTGTAAGGCGTCCGGTTATACGTTACGAACCTACGGGATGAA
 TTGGGTTCGCCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGG
 TGGATAAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCGACGCTT

5

10

15

20

25

30

TTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCGCGATACCAGCATATCCAC
CGCATACATGGAGCTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCT
GTCTACTATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATGGACT
ACTGGGGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGG
CGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGGTTCTGGTGAC
ATAGTTATGACCCAATCCCCAGATAGTTTGGCGGTTTCTCTGG
GCGAGAGGGCAACGATTAATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTC
AACGAGCGGATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCC
GGACAACCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTG
AGTCTGGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGAAC
TGACTTTACGCTCACGATCAGTTCAGTGCAGGCTGAGGATGTA
GCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACCT
TCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAATTAAAAGTGCTGCTGCCTT
TGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCC
CCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTC
TTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCGGGGTGC
TGTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTACATT
TGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTGAC
TCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGG
CAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGA
CCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGAT
TTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTT
TTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAAT
CAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATG
ACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGAAATGGGGGG
TAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAA
CTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTA
TGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTA
CCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTACGATGCACTG
CATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCGCTATC

5			CATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAAC AAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTA TTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTT TGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGG TTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGA TTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCTCTTTT TACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTCTGGCAGTCCAGAGAATGA CACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCA CGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGGAGTTCCCTGCCTGCCT 10GCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCT CATTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCC TGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCAC GCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACA TGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAAGTCAGAT 15GAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCC CATCTGTCTAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAAT GTGTTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAA AAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAC CAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGG 20ACAGGAGCTCAATGAGAAAGG
25	45	Secuenc ia de nucleót idos de CAR para CD70	ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGT TGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGG GGCGGAGGTGAAAAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGTGTCTGT AAGGCGTCCGGTTATACGTTACGAACTACGGGATGAATTGGG TTCGCCAAGCGCCGGGGCAGGGACTGAAATGGATGGGGTGGAT AAATACCTACACCGGCGAACCTACATACGCCGACGCTTTTAAA GGGCGAGTCACTATGACGCGCGATACCAGCATATCCACCGCAT ACATGGAGCTGTCCCGACTCCGGTCAGACGACACGGCTGTCTA 30CTATTGTGCTCGGGACTATGGCGATTATGGCATGGACTACTGG

5	(CD70B scFV con 41BB)	GGTCAGGGTACGACTGTAACAGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCA GTGGCGGGGGGGAAGCGGAGGAGGGGTTCTGGTGACATAGT TATGACCCAATCCCCAGATAGTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAG AGGGCAACGATTAATTGTCGCGCATCAAAGAGCGTTTCAACGA GCGGATATTCTTTTATGCATTGGTACCAGCAAAAACCCGGACA ACCGCCGAAGCTGCTGATCTACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCT GGGGTGCCGGACCGATTTTCTGGTAGTGGAAGCGGAACTGACT TTACGCTCACGATCAGTTCCTGCTGAGGCTGAGGATGTAGCGGT CTATTATTGCCAGCACAGTAGAGAAGTCCCCTGGACCTTCGGT 10 CAAGGCACGAAAGTAGAAATTAAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCC CGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCG CCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTAACCTCTTAGT CTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTC ATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGC 15 TCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTT ATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAA AGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGT ACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTCCC 20 GAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCT GTATAACGAAGTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTG CTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGAAATGGGGGGTAAAC CCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCA GAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAG 25 GGCGAACGACGACGGGGAAGGTACGATGGCCTCTACCAAG GGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATAT GCAGGCCCTGCCTCCCAGATAA
30	46 Secuenc ia de	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLKWMGWINTYTGTEPTYADAFK

5	aminoác idos de CAR para CD70 (CD70B scFV con 41BB)	GRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARDYGDYGM DYW GQGT TVTVSSGGGSGGGGSGGGSGDIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFG QGTKVEIKSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCNHRNRKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
10		
15	47 CD70A Secuenc ia de nucleót idos de scFv	GATATAGTTATGACCCAATCACCCGATAGTCTTGCGGTAAGCC TGGGGGAGCGAGCAACAATAAACTGTCGGGCATCAAAATCCGT CAGTACAAGCGGGTATTCATTCATGCACTGGTATCAACAGAAA CCCGGTCAGCCACCCAAGCTCCTGATTTATCTTGCGTCTAATC TTGAGTCCGGCGTCCCAGACCGGTTTTCCGGCTCCGGGAGCGG CACGGATTTTACTCTTACTATTTCTAGCCTTCAGGCCGAAGAT GTGGCGGTATACTACTGCCAGCATTCAAGGGAAGTTCCTTGGA CGTTCCGGTCAGGGCACGAAAGTGGAATTAAGGCGGGGGGGG ATCCGGCGGGGAGGGTCTGGAGGAGGTGGCAGTGGTCAGGTC CAACTGGTGCAGTCCGGGGCAGAGGTAAAAAACCCGGCGCGT CTGTAAAGTTTCATGCAAGGCCAGTGGATATACTTTCACCAA TTACGGAATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGTCAAGGCCTG AAATGGATGGGATGGATAAACACGTACACCGGTGAACCTACCT ATGCCGATGCCTTTAAGGGTCGGGTACGATGACGAGAGACAC CTCCATATCAACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGATTGAGGAGT GACGATACGGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGACTACGGCGATT ATGGCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACTACAGTAACCGTTTC CAGC
20		
25		
30		

5	48	CD70A Secuenc ia de aminoác idos de scFv (Ligado r subraya do)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQOK PGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAED VAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGSGQV QLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGL KWMGWINTYTGTEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRS DDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TVTVSS
10	49	CD70B Secuenc ia de nucleót idos de scFv	CAGGTCCAGTTGGTGCAAAGCGGGGCGGAGGTGAAAAAACCCG GCGCTTCCGTGAAGGTGTCCTGTAAGGCGTCCGTTATACGTT CACGAACTACGGGATGAATTGGGTTCCGCAAGCGCCGGGGCAG GGACTGAAATGGATGGGGTGGATAAATACCTACACCGGCGAAC CTACATACGCCGACGCTTTTAAAGGGCGAGTCACTATGACGCG CGATACCAGCATATCCACCGCATACATGGAGCTGTCCCGACTC CGGTCAGACGACACGGCTGTCTACTATTGTGCTCGGGACTATG GCGATTATGGCATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGACTGTAAC AGTTAGTAGTGGTGGAGGCGGCAGTGGCGGGGGGGGAAGCGGA GGAGGGGGTTCTGGTGACATAGTTATGACCCAATCCCCAGATA GTTTGGCGGTTTCTCTGGGCGAGAGGGCAACGATTAATTGTGCG CGCATCAAAGAGCGTTTCAACGAGCGGATATTCTTTTATGCAT TGGTACCAGCAAAAACCCGGACAACCGCCGAAGCTGCTGATCT ACTTGGCTTCAAATCTTGAGTCTGGGGTGCCGGACCGATTTTC TGGTAGTGGAAGCGGAAGTACTTTACGCTCACGATCAGTTCA CTGCAGGCTGAGGATGTAGCGGTCTATTATTGCCAGCACAGTA GAGAAGTCCCCTGGACCTTCGGTCAAGGCACGAAAGTAGAAAT TAAA
15			
20			
25			
30			

5	50	CD70B Secuenc ia de aminoác idos de scFv (Ligado r subraya do)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TVTVSS <u>GGGGSGGGGSG</u> <u>GGGSGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMH</u> WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS LQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK
10	51	VH de CD70	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQ GLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TVTVSS
15	52	VL de CD70	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQK PGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAED VAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIK
20	53	Ligador	GGGGSGGGGSGGGGSG
25	54	rAAV de BCMA	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCC TGCGGCCGCACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCT CAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACG CAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAACCTCTATCAATGAGAGA GCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAA CATAACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTG GGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTG 30

5

10

15

20

25

30

GCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCA
GTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCA
GGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTT
GGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCA
TCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGC
ATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTC
CATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTGGGGCAAAGAGG
GAAATGAGATCATGTCCTAACCCTGATCCTCTTGTCACAGA
TATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCT
AAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATT
CTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATAT
CACAGACAAAACGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGG
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTC
CCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCT
AGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA
CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATA
AGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTG
CCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCC
TGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACT
TCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT
TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCC
CCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGG
GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGC
TGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTGATGACCT
GCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGG
GCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGG
CGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGG
CGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT
CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCC
GTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCA

5	CCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTG CAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGC GGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCA GCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCA GGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTT AGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACT GAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGT AATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTTGAGTTTGATCTTGTT CATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCA 10 TTTCAAGTGTCGTGACCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACT GCTCCTCCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGAG GTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAG CCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCAACACCCTGAC CAACTACGTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGGCCAAAGG 15 CTGGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGACCTGACCA AGTACAGCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATCACCAGGGA TAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGG AGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGTACAAGGTGGGACTGGG ACGGCTTCTTTGACCCCTGGGGCCAGGGCACAACAGTGACCGT 20 CAGCAGCGGCGGCGGAGGCAGCGGCGGCGGCGGAGCGGCGGA GGCGGAAGCGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACACTGA GCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTGCAGGGCTAG CCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAACACCCACCTGCACTGG TACCAGCAGAGACCCGGACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTACA 25 GCGTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCAGGTTTAGCGG CAGCGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAGCGTG GAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCC ACATCCCTTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAA AAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCG 30 ACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCA
---	--

5

10

15

20

25

30

TCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACC
CGCCGCCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCT
TGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCG
TCCTTTTGTGTGCTACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAG
GAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAA
CAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATG
GCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGA
ACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATAT
CAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGAC
GCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGA
CCCGGAAATGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAA
GGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCT
ACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGG
TCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGAT
ACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAAT
AATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTT
TGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCT
TCAACAACAGCATTTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCC
AGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCT
TCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGT
CTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCA
CCAAAACCCTCTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGG
CAGTCCAGAGAAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGG
TGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACTG
AGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTAC
TGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCT
CTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCA
CTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACT
GATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGA
ATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATT

5		CTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATA ACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAG CTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAAT GCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACC CTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGTAACCAC GTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTA GTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA CTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCGGGCTTTGC CCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAG G
10		
15	55	BCMA RHA a LHA
20		GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCG AGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTT ATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAA TGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTC CCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAG ATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATG CCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAG AAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGC CCTGCATTTTCAAGTTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCG TGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAG CTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTT GCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCATCACTGGCATCTG GACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGT CCTAACCTGATCCTCTTGTCACAGATATCCAGAACCCTGA CCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAG TCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGT CACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGT GCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCA
25		
30		

5

10

15

20

25

30

GTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGG
GGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCG
GGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTT
TCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC
GTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG
TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG
TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGT
ACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGA
GAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCT
TGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAA
TCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC
TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTT
TTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA
CTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCG
TGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCG
CGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGC
CTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATCGCCCCGCC
CTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCG
GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAAT
GGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCAC
ACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGT
GACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGT
TCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG
GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAAT
TTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCA
GACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCGTGA
CCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGC
GCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGCGAGGTGCAGCTGGTGCAG
AGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTGAAGGTGA

5

10

15

20

25

30

GCTGCAAGGCCAGCGGCAACACCCTGACCAACTACGTGATCCA
CTGGGTGAGACAAGCCCCCGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGC
TACATCCTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAAGT
TCCAGGGCAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCTCCAC
CGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCT
GTGTACTACTGTACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACC
CCTGGGGCCAGGGCACAACAGTGACCGTCAGCAGCGGCGGCGG
AGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGAGGCGGAAGCGAAATC
GTGATGACCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCG
AGAGGGCCAGCATCTCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGCA
CAGCAACGGCAACACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCC
GGACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGT
TCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCAC
CGACTTTACCCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTCCGAGGACTTC
GCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCAGCCACATCCCTTACACCT
TCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAAGTGCTGCTGCCTT
TGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCC
CCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTC
TTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGC
TGTTTCATACGAGGGGCTTGGA CTTCGCTTGTGATATTTACATT
TGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTGCAC
TCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGG
CAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGA
CCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGAT
TTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTT
TTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAAT
CAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATG
ACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGAAATGGGGGG
TAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAA
CTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTA

5			TGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTA CCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTG CATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCGCTATC CATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAAC AAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTA TTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTT TGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGG TTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGA TTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCCCTCTTTT 10 TACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGA CACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCA CGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACTGAGTTCCTGCCTGCCT GCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCT CATTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCC 15 TGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCAC GCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACA TGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAAGTCAGAT GAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCC CATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAAT 20 GTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAA AAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATAC CAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGG ACAGGAGCTCAATGAGAAAGG
25	56	Secuenc ia nucleót idos de CAR para BCMA	ATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGGCGCTGT TGCTCCACGCAGCAAGGCCGCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGG AGCCGAGCTCAAGAAGCCCGGAGCCTCCGTGAAGGTGAGCTGC AAGGCCAGCGGCAACACCCTGACCAACTACGTGATCCACTGGG TGAGACAAGCCCCCGGCCAAAGGCTGGAGTGGATGGGCTACAT 30 CCTGCCCTACAACGACCTGACCAAGTACAGCCAGAAGTTCCAG

5

10

15

20

25

30

GGCAGGGTGACCATCACCAGGGATAAGAGCGCCTCCACCGCCT
ATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTA
CTACTGTACAAGGTGGGACTGGGACGGCTTCTTTGACCCCTGG
GGCCAGGGCACAACAGTGACCGTCAGCAGCGGCGGGAGGCA
GCGGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGAGGCGGAAGCGAAATCGTGAT
GACCCAGAGCCCCGCCACACTGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGG
GCCAGCATCTCCTGCAGGGCTAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCA
ACGGCAACACCCACCTGCACTGGTACCAGCAGAGACCCGGACA
GGCTCCCAGGCTGCTGATCTACAGCGTGAGCAACAGGTTCTCC
GAGGTGCCTGCCAGGTTTAGCGGCAGCGGAAGCGGCACCGACT
TTACCCTGACCATCAGCAGCGTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGT
GTATTACTGCAGCCAGACCAGCCACATCCCTTACACCTTCGGC
GGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAAGTGCTGCTGCCTTTGTCC
CGGTATTTCTCCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCCGCCCCGCG
CCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGT
CTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTC
ATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGC
TCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTT
ATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAA
AGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGT
ACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA
GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCC
GAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCT
GTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTG
CTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAAC
CCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCA
GAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAG
GGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAG
GGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATAT
GCAGGCCCTGCCTCCCAGA

5	57	Secuenc ia de aminoác idos de CAR para BCMA
10		MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAELKKPGASVKVSC KASGNTLTNYVIHWVRQAPGQRLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQ GRVTITRDKSASTAYMELSSLRSED TAVYYCTRWDWDGFFDPW GQGT TVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSVSPGER ASISCRASQSLVHSNGNTHLHWYQQRPGQAPRLLIYSVSNRFS EVPARFSGSGSGTDFTLTISSEVEDFAVYYCSQTSHIPYTFG GGTKLEIKSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCNHRNRKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
15	58	BCMA Secuenc ia de nucleót idos de scFv
20		CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGCTCAAGAAGCCCCG GAGCCTCCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGCAACACCCT GACCAACTACGTGATCCACTGGGTGAGACAAGCCCCCGGCCAA AGGCTGGAGTGGATGGGCTACATCCTGCCCTACAACGACCTGA CCAAGTACAGCCAGAAGTTCCAGGGCAGGGTGACCATCACCAG GGATAAGAGCGCCTCCACCGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTG AGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGTACAAGGTGGGACT GGGACGGCTTCTTTGACCCCTGGGGCCAGGGCACAACAGTGAC CGTCAGCAGCGGCGGCGGAGGCAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGC GGAGGCGGAAGCGAAATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACAC TGAGCGTGAGCCCTGGCGAGAGGGCCAGCATCTCCTGCAGGGC TAGCCAAAGCCTGGTGCACAGCAACGGCAACACCCACCTGCAC TGGTACCAGCAGAGACCCGGACAGGCTCCCAGGCTGCTGATCT ACAGCGTGAGCAACAGGTTCTCCGAGGTGCCTGCCAGGTTTAG CGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCAGC GTGGAGTCCGAGGACTTCGCCGTGTATTACTGCAGCCAGACCA
25		
30		

		GCCACATCCCTTACACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGAT CAAA	
5	59	BCMA Secuenc ia de aminoác idos de scFv (Ligado r subraya do)	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCASGNTLTNYVIHWVRQAPGQ RLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSL RSED TAVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTTVTVSS <u>GGGGSGGGGSG</u> <u>GGGSEIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHLH</u> WYQQRPQGAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGTDFTLTISS VESEDFAVYYCSQTSHIPYTFGGGTKLEIK
10			
15	60	VH de BCMA	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCASGNTLTNYVIHWVRQAPGQ RLEWMGYILPYNDLTKYSQKFQGRVTITRDKSASTAYMELSSL RSED TAVYYCTRWDWDGFFDPWGQGTTVTVSS
20	61	VL de BCMA	EIVMTQSPATLSVSPGERASISCRASQSLVHSNGNTHLHWYQQ RPGQAPRLLIYSVSNRFSEVPARFSGSGSGTDFTLTISSVESE DFAVYYCSQTSHIPYTFGGGTKLEIK
25	62	CDR1 de VL de CD70 (Kabat)	RASKSVSTSGYSFMH
30	63	CDR1 de VL de CD70 (Chothi a)	<u>SKSVSTSGYSF</u>

5
10
15
20
25
30

5

10

15

20

25

30

	(Kabat)	
71	CDR2 de VH de CD70 (Chothi a)	NTYTGE
72	CDR3 de VH de CD70 (Kabat)	DYGDYGMDY
73	CDR3 de VH de CD70 (Chothi a)	CARDYGDYGMDYWG
74	CDR1 de VL de BCMA (Kabat)	RASQSLVHSNGNTHLH
75	CDR1 de VL de BCMA (Chothi a)	RASQSLVHSNGNTHLH
76	CDR2 de VL de BCMA (Kabat)	SVSNR

5	77	CDR2 de VL de BCMA (Chothi a)	SVSNR
10	78	CDR3 de VL de BCMA (Kabat)	SQTSHIPYT
15	79	CDR3 de VL de BCMA (Chothi a)	SQTSHIPYT
20	80	CDR1 de VH de BCMA (Kabat)	NYVIH
25	81	CDR1 de VH de BCMA (Chothi a)	GNTLTNY
30	82	CDR2 de VH de BCMA (Kabat)	YILPYNDLTKYSQKFQG
	83	CDR2 de VH de BCMA	LPYNDL

	(Chothi a)	
5	84 CDR3 de VH de BCMA (Kabat)	WDWDGFFDP
10	85 CDR3 de VH de BCMA (Chothi a)	WDWDGFFDP
15	86 Secuenc ia diana de TRAC	AGAGCAACAGTGCTGTGGCC
20	87 rAAV de CAR anti- CD33	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCC TGCGGCCGCACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCT CAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACG CAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGA GCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAA CATAACATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTG GGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTG 25 GGCTTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATT GCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCA GTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCA GGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTT GGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCA 30 TCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGC

5		ATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTC CATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGG GAAATGAGATCATGTCCTAACCCTGATCCTCTTGTTCCACAGA TATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCT AAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATT CTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATAT CACAGACAAAACCTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAgg
10		ctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtc cccgagaagttggggggaggggtcggcaattgaaccggtgcct agagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgta ctggctccgcctttttcccgaggggtgggggagaaccgtatata agtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttg ccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcc tggcctctttacgggttatggcccttgcggtgccttgaattact
15		tccactggctgcagtagctgattcttgatcccgagcttcgggt tggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagcc ccttcgcctcggtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggg gccgccgctgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgc tgctttcgataagtccttagccattttaaatttttgatgacct
20		gctgcgacgctttttttctggcaagatagtccttgtaaagtgcgg gccaaagatctgcacactgggtatttcgggtttttggggccgcggg cggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgagg cggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcggaacgggggtagt
25		ctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgcgcc gtgtatcgccccgccctgggcggcaaggctggcccggctcggca ccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctg cagggagctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggc
30		gggtgagtcacccacacaaaggaaaaggcctttccgtcctca gccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgcgtcca ggcacctcgattagttctcgagcttttgagtagcgtcgtcttt

5

10

15

20

25

30

aggttgggggggaggggttttatgcgatggagtttccccacact
 gagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgt
 aattctccttggaattttgccctttttgagtttgatccttggtt
 cattctcaagcctcagacagtgggtcaaagtttttttcttcca
 tttcaggtgtcgtgaCCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACT
 GCTCCTCCCCCTTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGAA
 ATCGTCCTCACACAATCCCCGGGGAGCCTCGCAGTCAGTCCTG
 GGAACGAGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTGTTTT
 TTTCTCAAGTAGCCAGAAGAACTACCTCGCATGGTACCAACAA
 ATACCGGGGCAATCTCCCCGCTTGCTTATATACTGGGCAAGTA
 CCCGCGAATCCGGCGTACCGGATCGATTACGGGATCTGGGTC
 AGGTACTGATTTCACTTTGACTATCAGCTCTGTTTCAGCCTGAA
 GATTTGGCAATTTACTACTGTCACCAATACTTGAGTAGCCGAA
 CTTTCGGCCAGGGCACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGG
 AGGTTCTGGTGGGGGCGGTTCTGGCGGTGGAGGAAGCCAAGTA
 CAGTTGCAACAGCCAGGGGCGGAGGTCGTAACCTGGGGCGT
 CTGTCAAGATGAGCTGTAAAGCAAGTGGATACACCTTCACCTC
 CTACTATATACATTGGATTAAGCAAACCTCCGGGTCAGGGGCTG
 GAATGGGTTGGCGTTATATACCCCGGAACGATGATATATCAT
 ACAACCAAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCCGATAA
 GAGTAGCACAACAGCTTACATGCAGCTTTCTTCCCTGACCAGC
 GAAGATTCAGCAGTTTACTACTGCGCTCGGGAAGTGCGCCTGC
 GATACTTTGATGTCTGGGGTCAAGGAACTACAGTTACTGTATC
 AAGCAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAA
 CCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCA
 CCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCG
 ACCCGCCGCCGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCTTGGAATTC
 GCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCG
 GCGTCCTTTTGTGTCACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCA
 CAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTC

5

10

15

20

25

30

AAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG
ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGGAGGATG
TGAAGTGCAGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCA
TATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGG
GACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAG
AGACCCGGAAATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAA
GAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGG
CCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAA
AGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAA
GATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGAT
AATAATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTT
TTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACG
CCTTCAACAACAGCATTATTCAGAAAGACACCTTCTTCCCCAG
CCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTT
GCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGA
TGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTG
CCACCAAAACCTCTTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTT
TGGCAGTCCAGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGA
AGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAA
CTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTT
TACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTG
CCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTCCCAGC
TCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATC
ACTGATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGA
GGAATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACC
ATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAA
ATAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAA
CAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGA
AATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGG
ACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGTAAC

5			CACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCC CTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGC TCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTT TGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTG CAGG
	88	péptido señal	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP
	89	péptido señal	MALPVTALLLPLALLHAARP
10	90	Dominio transme mbrana CD8a	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR
15	91	Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T1)	UCACCAAGCCCGCGACCAAU
20	92	Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T3)	AUCACCAAGCCCGCGACCAA
25	93	Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T4)	CGGUGCGGCGCAGGCCCUAU
30	94	Espacia dor de	GCUUUGGUCCCAUUGGUCGC

	ARNsg de CD70 (E1_T7)	
5	95 Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCAUA
10	96 Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T10)	GUGCAUCCAGCGCUUCGCAC
15	97 Espacia dor de ARNsg de CD70 (E3_T1)	CAGCUACGUAUCCAUCGUGA
20	98 Espacia dor de TRAC	AGAGCAACAGUGCUGUGGCC
25	99 Espacia dor de ARNsg de β 2M	GCUACUCUCUCUUUCUGGCC
30	100 Espacia dor de ARNsg de PD-1	CUGCAGCUUCUCCAACACAU

5	101	Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T3)	U*C*A*CCAAGCCCGCGACCAAU
10	102	Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T4)	A*U*C*ACCAAGCCCGCGACCAA
15	103	Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T7)	C*G*G*UGCGGCGCAGGCCCUAU
20	104	Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T8)	G*C*U*UUGGUCCCAUUGGUCGC
25	105	Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T10)	G*C*C*CGCAGGACGCACCCAUA
30	106	Espacia dor de ARNsg de CD70	G*U*G*CAUCCAGCGCUUCGCAC

	(E3_T10)	
5	107 Espacia dor de ARNsg de CD70 (E1_T3)	C*A*G*CUACGUAUCCAUCGUGA
10	108 Espacia dor de TRAC	A*G*A*GCAACAGUGCUGUGGCC
15	109 Espacia dor de ARNsg de β 2M	G*C*U*ACUCUCUCUUUCUGGCC
20	110 Espacia dor de ARNsg de PD-1	C*U*G*CAGCUUCUCCAACACAU
25	111 ARNsg de CD70 (E1_T1) con PAM	TCACCAAGCCCGCGACCAAT <u>GGG</u>
30	112 ARNsg de CD70 (E1_T3) con PAM	ATCACCAAGCCCGCGACCAAT <u>GG</u>
	113 ARNsg de CD70 (E1_T4) con PAM	CGGTGCGGCGCAGGCCCTAT <u>GGG</u>

5	114	ARNsg de CD70 (E1_T7) con PAM	GCTTTGGTCCCATTTGGTCGC <u>GGG</u>
	115	ARNsg de CD70 (E1_T8) con PAM	GCCCGCAGGACGCACCCATAG <u>GG</u>
10	116	ARNsg de CD70 (E1_T10) con PAM	GTGCATCCAGCGCTTCGCAC <u>AGG</u>
15	117	ARNsg de CD70 (E3_T1) con PAM	CAGCTACGTATCCATCGTGAT <u>GG</u>
20	118	ARNsg de TRAC con PAM	AGAGCAACAGTGCTGTGGCCT <u>GG</u>
	119	ARNsg de β 2M con PAM	GCTACTCTCTCTTTCTGGCCT <u>GG</u>
25	120	ARNsg de PD-1 con PAM	CTGCAGCTTCTCCAACACATC <u>GG</u>
30	121	Secuenc ia de nucleót	TCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGA CTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTA TGCCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCC

	idos de CD28	
5	122 TRAC- LHA	GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCG AGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTT ATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAA TGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATAACCATAAACCTC CCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAG ATTCCAAGATGTACAGTTTGGCTTTGCTGGGCCTTTTCCCATG CCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAG 10 AAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGC CCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCG TGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAG CTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTT 15 GCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCCATCACTGGCATCTG GACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGT CCTAACCCTGATCCTCTTGTCCCACAGATATCCAGAACCCTGA CCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAG TCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGT 20 CACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGT GCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCA
25	123 Promoto r EF1 α	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAG TCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCTGGCAATTGAACCGGTGC CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTG TACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATA TAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGAACGGGTT TGCCGCCAGAACACAGGTAAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGG CCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCCTGAATTA 30 CTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGG

5		GTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAG CCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTC GCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGAC CTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGC GGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCG GGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCGA GGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTA GTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCG 10 CCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCTGG CACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGC TGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGG GCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGTCCT 15 CAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCT TTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACA CTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGG 20 TTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTC CATTTCAGGTGTCGTGA
25	124 Señal de poli (A) sintéti ca	AATAAAATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTT TTGTGTG
30	125 TRAC- RHA	TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACA ACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAA GGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGA ATGGCCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAA

5			CTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAA CCCTCTTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCC AGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAG GAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGGATTCC TGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCCTTACTGCTCT TCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTT ATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGT CAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGT GCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAA 10AAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTT GGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCA GATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCT TCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACT TGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAG 15AGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG
20	126	transmembrana CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
	127	Cebador directo de CD70	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGcccaactttt ccatctcaactcaccccaagtg
25	128	cebador inverso de CD70	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGcccctcctg cgctagcgga
	129	Indel de CD70	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG— CAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG
30	130	Indel de CD70	CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG A ACCAATGGGACC AAAGCAGCCCGCAGGACG

5	131	Indel de CD70
		CACACCACGAGGCAGATC----- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG
	132	Indel de CD70
		CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGCG- CCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG
10	133	Indel de CD70
		CACACCACGAGGCAGATCACCAAGCCCGC- ACCAATGGGACCAAAGCAGCCCGCAGGACG
	134	Indel de CD70
		CACACCACGAGGCAGATCACCA----- ----AGCCCGCAGGACG
15	135	CAR
		Anti-
		CD33
		Donador
		LHA a
		RHA
20		Coestim
		. 41BB
		GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATC GAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGAT TTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGG TAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAA CCTCCCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCAC TCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTT CCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGT TTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTAT TAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGCCAG GCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCA AGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCAC GAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATG AGACCGTGA CT TGGCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTTCCA TCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTGGGGCAAAGAGGG AAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTCCCACAGA TATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTC TAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTTTGA TTCTCAAACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTA
25		
30		

5	TATCACAGACAAAACGTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTT CAggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgccca cagtccccgagaagttggggggaggggtcggcaattgaaccg gtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatg tcgtgtactggctccgcctttttcccgagggtgggggagAAC cgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgca acggggttgccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggtt cccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgctgtc cttgaattacttccactggctgcagtacgtgattcttgatcc 10 cgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggccttg cgcttaaggagccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctg gcctgggcgctggggccgcgcgtgcgaatctggtggcacct tcgcgcctgtctcgtgctttcgataagtctctagccattta aaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaaga 15 tagtcttgtaaattgcgggccaagatctgcacactggatattc ggtttttggggccgcgggcgacggggcccggtgcgtccca gcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccacc gagaatcggaacgggggtagtctcaagctggccggcctgctct ggtgccctggcctcgcgcgcgcgtgtatcgccccgcctgggc 20 ggcaaggctggcccggctcggcaccagttgcgtgagcggaaag atggccgcttcccgccctgctgcaggagctcaaaatggag gacgcggcgctcgggagagcgggcggtgagtcacccacaca aaggaaaagggcctttcgtcctcagccgtcgttcatgtga ctccacggagtaccgggcgcgcgtccaggcacctcgattagtt 25 ctcgagcttttgagtagctcgtcttttaggttggggggaggg gttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagac tgaagttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttgga atgtgccctttttgagtttgatcttggttcattctcaagcc tcagacagtgggttcaaagtttttttcttccatttcagggtgc 30 gtgaCCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCC
---	---

5

10

15

20

25

30

TTGGCGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGAAATCGTCCTC
ACACAATCCCCGGGAGCCTCGCAGTCAGTCCTGGGGAACGA
GTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTGTTTTTTTCTCA
AGTAGCCAGAAGAACTACCTCGCATGGTACCAACAAATACCG
GGGCAATCTCCCCGCTTGCTTATATACTGGGCAAGTACCCGC
GAATCCGGCGTACCGGATCGATTACGGGATCTGGGTACAGGT
ACTGATTTCACTTTGACTATCAGCTCTGTTACAGCCTGAAGAT
TTGGCAATTTACTACTGTACCAATACTTGAGTAGCCGAACT
TTCGGCCAGGGCACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGA
GGTTCTGGTGGGGGCGGTTCTGGCGGTGGAGGAAGCCAAGTA
CAGTTGCAACAGCCAGGGGCGGAGGTCGTAAAACCTGGGGCG
TCTGTCAAGATGAGCTGTAAAGCAAGTGGATACACCTTCACC
TCCTACTATATACATTGGATTAAGCAAACCTCCGGGTCAGGGG
CTGGAATGGGTTGGCGTTATATACCCCGGGAACGATGATATA
TCATACAACCAAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCC
GATAAGAGTAGCACAACAGCTTACATGCAGCTTTCTTCCCTG
ACCAGCGAAGATTCAGCAGTTTACTACTGCGCTCGGGAAGTG
CGCCTGCGATACTTTGATGTCTGGGGTCAAGGAACTACAGTT
ACTGTATCAAGCAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTC
CCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACA
CCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCC
GAGGCATGCCGACCCGCCGCGGGGGTGCTGTTTCATACGAGG
GGCTTGGACTIONCGCTTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTG
GCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTTGTCACTCGTTATTACT
TTGTATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAAA
CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAA
ACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA
GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTCCCGA
AGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTG
TATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTG

5		CTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAA CCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTC CAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATG AAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTAC CAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTG CATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCGCTAT CCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCA ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCA TTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCA 10 GCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGG CCAGGTTCTGCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTC CTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAACC CTCTTTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCA GAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAG 15 GAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAACTGAGTTC CTGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCT CTTCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTC CTTATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCAGTCACT AAGTCAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTG 20 ATTGTGCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGA ATTAAAAAGTCAGATGAGGGGTGTGCCAGAGGAAGCACCAT TCTAGTTGGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAA TAACTTCAGATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAA CAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAG 25 AAATGCTACTTGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGA GGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGG
30	136 CAR Anti- CD33	CCACCATGGCGCTTCCGGTGACAGCACTGCTCCTCCCCTTGG CGCTGTTGCTCCACGCAGCAAGGCCGGAATCGTCCTCACAC AATCCCCGGGGAGCCTCGCAGTCAGTCCTGGGGAACGAGTCA CTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTGTTTTTTTCTCAAGTA

	Coestim	GCCAGAAGAACTACCTCGCATGGTACCAACAAATACCGGGGC
	. 41BB	AATCTCCCCGCTTGCTTATATACTGGGCAAGTACCCGCGAAT
		CCGGCGTACCGGATCGATTACGGGATCTGGGTCAGGTACTG
5		ATTTCACTTTGACTATCAGCTCTGTTCAGCCTGAAGATTTGG
		CAATTTACTACTGTCACCAATACTTGAGTAGCCGAACTTTCG
		GCCAGGGCACGAAGCTCGAAATCAAGGGCGGAGGGGGAGGTT
		CTGGTGGGGGCGGTTCTGGCGGTGGAGGAAGCCAAGTACAGT
		TGCAACAGCCAGGGGCGGAGGTCTGTAACCTGGGGCGTCTG
10		TCAAGATGAGCTGTAAAGCAAGTGGATACACCTTCACCTCCT
		ACTATATACATTGGATTAAGCAAACCTCCGGGTCAGGGGCTGG
		AATGGGTTGGCGTTATATACCCCGGGAACGATGATATATCAT
		ACAACCAAAAATTTCAAGGCAAGGCGACTCTGACTGCCGATA
		AGAGTAGCACAAACAGCTTACATGCAGCTTTCTTCCCTGACCA
15		GCGAAGATTCAAGCAGTTTACTACTGCGCTCGGGAAGTGCGCC
		TGCGATACTTTGATGTCTGGGGTCAAGGAACTACAGTTACTG
		TATCAAGCAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCAG
		CCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCG
		CTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGG
20		CATGCCGACCCGCCGCCGGGGTGCTGTTTCATACGAGGGGCT
		TGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGG
		GTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTGTCACCTCGTTATTACTTTGT
		ATTGTAATCACAGGAATCGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCC
		TGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTA
25		CTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAG
		AAGAAGGAGGATGTGAACTGCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCG
		CAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATA
		ACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTG
		ATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCC
30		GAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGA
		AGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGG

		GCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAG GGTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATA TGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCAT CGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG
5	137	Anti- CD33 scFv Ligador subraya do
10		EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWY QQIPGQSPRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISV QPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKGGGGGSGGGGSGGG GSQVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQT PGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTAYMQ LSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTITVTVSS
15	138	Anti- CD33 scFv
20		GAAATCGTCCTCACACAATCCCCGGGGAGCCTCGCAGTCAGT CCTGGGGAACGAGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGT GTTTTTTTCTCAAGTAGCCAGAAGAACTACCTCGCATGGTAC CAACAAATACCGGGGCAATCTCCCGCTTGCTTATATACTGG GCAAGTACCCGCGAATCCGGCGTACCGGATCGATTACGGGA TCTGGGTCAGGTACTGATTTCACTTTGACTATCAGCTCTGTT CAGCCTGAAGATTTGGCAATTTACTACTGTCACCAATACTTG AGTAGCCGAACCTTTCGGCCAGGGCACGAAGCTCGAAATCAAG GGCGGAGGGGGAGGTTCTGGTGGGGGCGGTTCTGGCGGTGGA GGAAGCCAAGTACAGTTGCAACAGCCAGGGGCGGAGGTCGTA AAACCTGGGGCGTCTGTCAAGATGAGCTGTAAAGCAAGTGGA TACACCTTCACCTCCTACTATATACATTGGATTAAGCAAACCT CCGGGTCAGGGGCTGGAATGGGTTGGCGTTATATACCCCGGG AACGATGATATATCATACAACCAAAAATTTCAAGGCAAGGCG ACTCTGACTGCCGATAAGAGTAGCACACAGCTTACATGCAG CTTTCTTCCCTGACCAGCGAAGATTCAGCAGTTTACTACTGC GCTCGGGAAGTGCGCCTGCGATACTTTGATGTCTGGGGTCAA GGAACCTACAGTTACTGTATCAAGC

5	139	CAR anti- CD33 Coestim . 41BB	MALPVTALLLPLALLLHAARPEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMS CKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFTLTISVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTK LEIKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCK ASGYTFTSYIIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQG KATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWG QGTTVTVSSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPL SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCNHRNRKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
15	140	VH de anticue rpo anti- CD33 CDR subraya das y en negrita	QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFT <u>SYIIH</u> WIKQTPGQ GLEWVG <u>VIYPGNDDISYNQKFQG</u> KATLTADKSSTTAYMQLSSL TSEDSAVYYCARE <u>EVRLRYFDV</u> WGQGTTVTVSS
25	141	VL de anticue rpo anti- CD33 CDR subraya	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCK <u>KSSQSVFFSSSQKNYLAWYQ</u> QIPGQSPRLLIY <u>WASTRES</u> GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQ EDLAIYYC <u>HQYLSSRT</u> FGQGTKLEIK

30

	das y en negrita	
5	142 Anticue rpo anti- CD33 CDR1 de VH (Kabat)	<u>SYYIH</u>
10	143 Anticue rpo anti- CD33` CDR2 de VH (Kabat)	<u>VIYPGNDDISYNQKFQG</u>
15		
20	144 Anticue rpo anti- CD33 CDR3 de VH (Kabat)	<u>EVRLRYFDV</u>
25	145 Anticue rpo anti- CD33 CDR1 de VL (Kabat	<u>KSSQSVFFSSSQKNYLA</u>
30		

	& Chothia)	
5	146 Anticue rpo anti- CD33 CDR2 de VL (Kabat & Chothia	<u>WASTRES</u>
10		
15	147 Anticue rpo anti- CD33 CDR3 de VL (Kabat & Chothia)	<u>HQYLSSRT</u>
20		
25	148 CAR anti- CD19 CD8 [tm] - CD28 [do minio	ATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACTTCCTC ATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGATGACTCAGAC CACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAGACCGAGTAACAATC TCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCTCAATTGGT ACCAGCAGAAGCCCGACGGAACGGTAAACTCCTCATCTATCA TACGTCAAGGTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTTTCAGGT TCTGGGAGCGGAACTGACTATTCCTTGACTATTTCAAACCTCG AGCAGGAGGACATTGCGACATATTTTGTCAACAAGGTAATAC
30		

	coestim ulador] -CD3z)	CCTCCCTTACACTTTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAATTACC GGGTCCACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGAAGGTT CCACTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGCCCCGGTCT CGTTGCCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACGTGCACAGTGAGT 5 GGTGTATCATTGCCTGATTATGGCGTCTCCTGGATAAGGCAGC CCCCGCGAAAGGGTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGGGGCTC AGAGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAAGTCGCTTGACG ATAATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAATGA ACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTATATATTATTGTGCTAA 10 ACATTATTACTACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATTGGGGG CAGGGGACTTCTGTCACAGTCAGTAGTGCTGCTGCCTTTGTCC CGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCCCCGCG CCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTCTTAGT CTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGGTGCTGTTC 15 ATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATTTGGGC TCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTCACTCGTT ATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCGGAGTA GGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGCCGGCC TGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCCCCCCCACGA 20 GACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAGTGAAGTTTTCCCGAAGCG CAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTGTATAA CGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGCTTGAT AAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAATGGGGGGTAAACCCCGAA GAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAGAAGGA 25 TAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGGGCGAA CGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGGGTTGA GTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATGCAGGC CCTGCCTCCCAGA 30
--	------------------------------	--

5	149	CAR anti- CD19 CD8 [tm] - CD28 [do minio coestim ulador] -CD3z) Aminoác ido	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSG SGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLT I IKDNSKSQVFLKMNSLQTD DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWG QGTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYCNHRNRSKR S RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL D KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
15	150	scFv anti- CD19	GATATTCAGATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCAC TGGGAGACCGAGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACAT TAGCAAATACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACG GTAAAACTCCTCATCTATCATACGTCAAGGTTGCATTCCGGAG TACCGTCACGATTTTCAGGTTCTGGGAGCGGAACTGACTATTC CTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACATAT TTTTGTCAACAAGGTAATAACCCTCCCTTACACTTTTCGGAGGAG GAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTCCACCAGTGGCTCTGGGAA GCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAAAGGCGAGGTGAAGCTC CAGGAGAGCGGCCCCGGTCTCGTTGCCCCCAGTCAAAGCCTCT CTGTAACGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGG CGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGGTCTTGAATGG CTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTATTATAACTCCG CTCTCAAAGTCGCTTGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAG TCAAGTTTTCTTAAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACC GCTATATATTATTGTGCTAAACATTATTACTACGGCGGTAGTT

		ACGCGATGGATTATTGGGGGCAGGGGACTTCTGTCACAGTCAG TAGT
5	151	secuenc ia de aminoác idos de scFv para CD19 Ligador subraya do
10		DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT <u>GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKL</u> QESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEW LGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
15	152	VH Anti- CD19
		EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRK GLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQ TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS
20	153	VL Anti- CD19
		DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGT VKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATY FCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT
25	154	Ligador de scFv anti- CD19
		GSTSGSGKPGSGEGSTKG
30	155	rAAV de CAR anti- CD19
		CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTC TGCGGCCGCACGCGTGAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCT

5

10

15

20

25

30

CAAGGCCTTATATCGAGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACG
CAGGTGTTCTGATTTATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGA
GCAATCTCCTGGTAATGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAA
CATACCATAAACCTCCCATTCTGCTAATGCCAGCCTAAGTTG
GGGAGACCACTCCAGATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTG
GGCCTTTTTTCCCATGCCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATT
GCTGGGGTTTTGAAGAAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCA
GTATTATTAAGTAGCCCTGCATTTTCAGGTTTCCTTGAGTGGA
GGCCAGGCCTGGCCGTGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTT
GGCCAAGATTGATAGCTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCA
TCACGAGCAGCTGGTTTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGC
ATGAGACCGTGACTTGCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTC
CATCACTGGCATCTGGACTCCAGCCTGGGTGGGGCAAAGAGG
GAAATGAGATCATGTCCTAACCTGATCCTCTTGTCACACAGA
TATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCT
AAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATT
CTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATAT
CACAGACAAAACGTGTCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGG
CTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTC
CCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCT
AGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA
CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATA
AGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTG
CCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCC
TGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCCCTGAATTACT
TCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGT
TGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCC
CCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGG
GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGC
TGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCT

5

10

15

20

25

30

GCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGG
GCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGG
CGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTGCGGCGAGG
CGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT
CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCC
GTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCA
CCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTG
CAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGC
GGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCTCA
GCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCA
GGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTT
AGGTTGGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACT
GAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGT
AATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTG GTT
CATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCA
TTTCAGGTGTCGTGACCACCATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCT
GTTGCTTTGCGAACTTCCTCATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCC
GATATTCAGATGACTCAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCAC
TGGGAGACCGAGTAACAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACAT
TAGCAAATACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACG
GTAAACTCCTCATCTATCATACTCAAGGTTGCATTCCGGAG
TACCGTCACGATTTTCAGGTCTGGGAGCGGAACTGACTATTC
CTTGACTATTTCAAACCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACATAT
TTTTGTCAACAAGGTAATACCCTCCCTTACACTTTCGGAGGAG
GAACCAAACCTCGAAATTACCGGGTCCACCAGTGGCTCTGGGAA
GCCTGGCAGTGGAGAAGGTTCCACTAAAGGCGAGGTGAAGCTC
CAGGAGAGCGGCCCCGGTCTCGTTGCCCCAGTCAAAGCCTCT
CTGTAACGTGCACAGTGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGG
CGTCTCCTGGATAAGGCAGCCCCCGCGAAAGGGTCTTGAATGG
CTTGGGGTAATATGGGGCTCAGAGACAACGTATTATAACTCCG

5

10

15

20

25

30

CTCTCAAAGTCGCTTGACGATAATAAAAGATAAAGTCCAAGAG
 TCAAGTTTTCTTAAATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACC
 GCTATATATTATTGTGCTAAACATTATTACTACGGCGGTAGTT
 ACGCGATGGATTATTGGGGGCAGGGGACTTCTGTCACAGTCAG
 TAGTGCTGCTGCCTTTGTCCCGGTATTTCTCCCAGCCAAACCG
 ACCACGACTCCCGCCCCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCA
 TCGCCTCTCAACCTCTTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACC
 CGCCGCCGGGGGTGCTGTTTATACGAGGGGCTTGGACTTCGCT
 TGTGATATTTACATTTGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCG
 TCCTTTTGTGTGCTACTCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAG
 GAATCGCTCAAAGCGGAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATG
 AATATGACTCCTCGCCGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACC
 AACCTATGCCCCCCCACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCG
 AGTGAAGTTTTCCCGAAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAA
 GGACAGAATCAGCTGTATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCG
 AGGAGTATGACGTGCTTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGA
 AATGGGGGGTAAACCCCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTC
 TACAATGAACTCCAGAAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAG
 AAATAGGTATGAAGGGCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGA
 TGGCCTCTACCAAGGGTTGAGTACGGCAACCAAGATACGTAC
 GATGCACTGCATATGCAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAA
 ATCGCTATCCATCGAAGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG
 TGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACA
 ACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAA
 GGGCAGCTTTGGTGCCTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGA
 ATGGCCAGGTTCTGCCCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAA
 CTCCTCTGATTGGTGGTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAAA
 CCCTCTTTTACTAAGAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCC
 AGAGAATGACACGGGAAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAG
 GAGAGGGCACGTGGCCCAGCCTCAGTCTCTCCAAGTGAAGTTCC

5		TGCCTGCCTGCCTTTGCTCAGACTGTTTGCCCTTACTGCTCT TCTAGGCCTCATTCTAAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTT ATTTCTCCCTGTCTGCCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGT CAGTCTCACGCAGTCACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGT GCCGGCACATGAATGCACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAA AAGTCAGATGAGGGGTGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTT GGGGGAGCCCATCTGTCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCA GATTGGAATGTGTTTTAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCT TCAGGACAAAAGTCAGGGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACT 10 TGAAGATACCAGCCCTACCAAGGGCAGGGAGAGGACCCTATAG AGGCCTGGGACAGGAGCTCAATGAGAAAGGTAACCACGTGCGG ACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATG GAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG 15 CCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGC GGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG
20	156	CAR anti- CD19 LHA a RHA GAGATGTAAGGAGCTGCTGTGACTTGCTCAAGGCCTTATATCG AGTAAACGGTAGTGCTGGGGCTTAGACGCAGGTGTTCTGATTT ATAGTTCAAAACCTCTATCAATGAGAGAGCAATCTCCTGGTAA TGTGATAGATTTCCCAACTTAATGCCAACATACCATAAACCTC CCATTCTGCTAATGCCCAGCCTAAGTTGGGGAGACCACTCCAG ATTCCAAGATGTACAGTTTGCTTTGCTGGGCCTTTTTCCCATG CCTGCCTTTACTCTGCCAGAGTTATATTGCTGGGGTTTTGAAG AAGATCCTATTAAATAAAAGAATAAGCAGTATTATTAAGTAGC CCTGCATTTTCAAGTTTTCTTGAGTGGCAGGCCAGGCCTGGCCG 25 TGAACGTTCACTGAAATCATGGCCTCTTGGCCAAGATTGATAG CTTGTGCCTGTCCCTGAGTCCCAGTCCATCACGAGCAGCTGGT TTCTAAGATGCTATTTCCCGTATAAAGCATGAGACCGTGACTT GCCAGCCCCACAGAGCCCCGCCCTTGTCATCACTGGCATCTG GACTCCAGCCTGGGTTGGGGCAAAGAGGGAAATGAGATCATGT 30 CCTAACCTGATCCTCTTGTCCACAGATATCCAGAACCCTGA

5	CCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAG TCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGT CACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGT GCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAGGCTCCGGTGCCCGTCA GTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGG GGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCG GGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTT TCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC GTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG 10TAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGT ACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGA GAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCT TGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAA 15TCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTT TTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACA CTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCG TGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCG 20CGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGC CTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCC CTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAGTTGCGTGAGCG GAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAAT GGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCAC 25ACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGT GACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGT TCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAT 30TTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCAATTCTCAAGCCTCA
---	--

5

10

15

20

25

30

GACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA
CCACCATGCTTCTTTTGGTTACGTCTCTGTTGCTTTGCGAACT
TCCTCATCCAGCGTTCTTGCTGATCCCCGATATTCAGATGACT
CAGACCACCAGTAGCTTGTCTGCCTCACTGGGAGACCGAGTAA
CAATCTCCTGCAGGGCAAGTCAAGACATTAGCAAATACCTCAA
TTGGTACCAGCAGAAGCCCGACGGAACGGTAAAACCTCATC
TATCATACGTCAAGGTTGCATTCCGGAGTACCGTCACGATTTT
CAGGTTCTGGGAGCGGAACTGACTATTTCCTTGACTATTTCAA
CCTCGAGCAGGAGGACATTGCGACATATTTTTGTCAACAAGGT
AATACCCTCCCTTACACTTTCGGAGGAGGAACCAAACCTCGAAA
TTACCGGGTCCACCAGTGGCTCTGGGAAGCCTGGCAGTGGAGA
AGGTTCCTAAAGGCGAGGTGAAGCTCCAGGAGAGCGGCCCC
GGTCTCGTTGCCCCCAGTCAAAGCCTCTCTGTAACTGCACAG
TGAGTGGTGTATCATTGCCTGATTATGGCGTCTCCTGGATAAG
GCAGCCCCCGCGAAAGGGTCTTGAATGGCTTGGGGTAATATGG
GGCTCAGAGACAACGTATTATAACTCCGCTCTCAAAAGTCGCT
TGACGATAATAAAAGATAACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAA
AATGAACAGTTTGCAGACTGACGATACCGCTATATATTATTGT
GCTAAACATTATTACTACGGCGGTAGTTACGCGATGGATTATT
GGGGGCAGGGGACTTCTGTACAGTCAGTAGTGCTGCTGCCTT
TGTCCCGGTATTTCTCCAGCCAAACCGACCACGACTCCCGCC
CCGCGCCCTCCGACACCCGCTCCCACCATCGCCTCTCAACCTC
TTAGTCTTCGCCCCGAGGCATGCCGACCCGCCGCCGGGGTGC
TGTTCATACGAGGGGCTTGGACTTCGCTTGTGATATTTACATT
TGGGCTCCGTTGGCGGGTACGTGCGGCGTCCTTTTGTGTGAC
TCGTTATTACTTTGTATTGTAATCACAGGAATCGCTCAAAGCG
GAGTAGGTTGTTGCATTCCGATTACATGAATATGACTCCTCGC
CGGCCTGGGCCGACAAGAAAACATTACCAACCCTATGCCCCC
CACGAGACTTCGCTGCGTACAGGTCCCGAGTGAAGTTTTCCCG
AAGCGCAGACGCTCCGGCATATCAGCAAGGACAGAATCAGCTG

5		TATAACGAACTGAATTTGGGACGCCGCGAGGAGTATGACGTGC TTGATAAACGCCGGGGGAGAGACCCGGAAATGGGGGGTAAACC CCGAAGAAAGAATCCCCAAGAAGGACTCTACAATGAACTCCAG AAGGATAAGATGGCGGAGGCCTACTCAGAAATAGGTATGAAGG GCGAACGACGACGGGGAAAAGGTCACGATGGCCTCTACCAAGG GTTGAGTACGGCAACCAAAGATACGTACGATGCACTGCATATG CAGGCCCTGCCTCCCAGATAATAATAAAATCGCTATCCATCGA AGATGGATGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGTGGAGCAACAAATCT GACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAG 10 AAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGGTAAGGGCAGCTTTGGTG CTTCGCAGGCTGTTTCCTTGCTTCAGGAATGGCCAGGTTCTGC CCAGAGCTCTGGTCAATGATGTCTAAAACTCCTCTGATTGGTG GTCTCGGCCTTATCCATTGCCACCAAACCCTCTTTTTACTAA GAAACAGTGAGCCTTGTTCTGGCAGTCCAGAGAATGACACGGG 15 AAAAAAGCAGATGAAGAGAAGGTGGCAGGAGAGGGCACGTGGC CCAGCCTCAGTCTCTCCAACTGAGTTCCTGCCTGCCTGCCTTT GCTCAGACTGTTTGCCCCTTACTGCTCTTCTAGGCCTCATTCT AAGCCCCTTCTCCAAGTTGCCTCTCCTTATTTCTCCCTGTCTG CCAAAAAATCTTTCCCAGCTCACTAAGTCAGTCTCACGCAGTC 20 ACTCATTAACCCACCAATCACTGATTGTGCCGGCACATGAATG CACCAGGTGTTGAAGTGGAGGAATTAAAAAGTCAGATGAGGGG TGTGCCCAGAGGAAGCACCATTCTAGTTGGGGGAGCCCATCTG TCAGCTGGGAAAAGTCCAAATAACTTCAGATTGGAATGTGTTT TAACTCAGGGTTGAGAAAACAGCTACCTTCAGGACAAAAGTCA 25 GGAAGGGCTCTCTGAAGAAATGCTACTTGAAGATACCAGCCC TACCAAGGGCAGGAGAGGACCCTATAGAGGCCTGGGACAGGA GCTCAATGAGAAAGG
30	157 ARNsg de CD70 (E1_T1)	TCACCAAGCCCGCGACCAAT

5	158	ARNsg de CD70 (E1_T3)	ATCACCAAGCCCGCGACCAA
	159	ARNsg de CD70 (E1_T4)	CGGTGCGGCGCAGGCCCTAT
	160	ARNsg de CD70 (E1_T7)	GCTTTGGTCCCATTTGGTCGC
10	161	ARNsg de CD70 (E1_T8)	GCCCGCAGGACGCACCCATA
15	162	ARNsg de CD70 (E1_T10)	GTGCATCCAGCGCTTCGCAC
20	163	ARNsg de CD70 (E3_T1)	CAGCTACGTATCCATCGTGA
	164	ARNsg de β 2M	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC
	165	ARNsg de PD-1	CTGCAGCTTCTCCAACACAT
25	166	CDR1 de VL anti- CD19 (Kabat)	RASQDISKYLN
30	167	CDR2 de VL	HTSRLHS

	anti- CD19 (Kabat)	
5	168 CDR3 de VL anti- CD19 (Kabat)	QQGNTLPYT
10	169 CDR1 de VH anti- CD19 (Kabat)	DYGVS
15	170 CDR2 de VH anti- CD19 (Kabat)	VIWGSETTYNSALKS
20	171 CDR3 de VH anti- CD19 (Kabat)	HYYYGGSYAMDY
25	172 CDR1 de VL anti- CD19 (Chothi a)	RASQDISKYLN
30		

5	173	CDR2 de VL anti- CD19 (Chothi a)	HTSRLHS
10	174	CDR3 de VL anti- CD19 (Chothi a)	QQGNTLPYT
15	175	CDR1 de VH anti- CD19 (Chothi a)	GVSLPDY
20	176	CDR2 de VH anti- CD19 (Chothi a)	WGSET
25	177	CDR3 de VH anti- CD19 (Chothi a)	HYYYGGSYAMDY
30			

5	178	CDR1 de VH anti- CD33 (Chothi a)	GYTFTSY
10	179	CDR2 de VH anti- CD33 (Chothi a)	YPGNDD
15	180	CDR3 de VH anti- CD33 (Chothi a)	EVRLRYFDV

20 Todas las referencias, patentes y solicitudes de patente dadas a conocer en el presente documento se incorporan como referencia con respecto a la materia para la que se cita cada una, que en algunos casos puede abarcar la totalidad del documento.

25 Los artículos indefinidos "un" y "una", tal como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, debe entenderse que significan "al menos uno".

30 También debe entenderse que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluya más de una etapa o acto, el orden de las etapas o actos del método no se limita

necesariamente al orden en el que las etapas o actos del método se mencionan.

5 En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, todas las frases de transición tales como "que comprende", "que incluye", "que lleva", "que tiene", "que contiene", "que implica", "que mantiene", "compuesto por" y similares debe entenderse que son de extremos abiertos, es decir, que significan que incluyen pero no se limitan a. Solo las frases de transición "que
10 consiste en" y "que consiste esencialmente en" serán frases de transición cerradas o semicerradas, respectivamente, tal como se establece en el Manual de procedimientos de examen de patentes de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos, Sección 2111.03.

15 Los términos "aproximadamente" y "sustancialmente" que preceden a un valor numérico significan $\pm 10\%$ del valor numérico mencionado.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, cada valor entre los extremos superior e inferior del intervalo
20 se contempla y describe específicamente en el presente documento.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente
25 descripción de la invención.