

CÉLULAS DONANTES UNIVERSALES

SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 62/728 529, presentada el 7 de septiembre de 2018, cuya descripción se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La invención se refiere al campo de la edición de genes y, en algunas realizaciones, a modificaciones genéticas con el fin de generar células que sean compatibles con múltiples sujetos, p. ej., células donantes universales.

ANTECEDENTES

[0003] Se han propuesto diversos enfoques para superar el rechazo allogénico de células trasplantadas o injertadas, incluyendo la histocompatibilidad (*HLA-matching*, siglas del inglés *Human Leukocyte Antigens*, antígenos leucocitarios humanos), las vías de bloqueo que desencadenan la activación de los linfocitos T con anticuerpos, el uso de un cóctel de fármacos inmunosupresores, y la terapia con células autólogas. Otra estrategia para amortiguar el rechazo de los injertos implica la minimización de las diferencias allogénicas entre las células trasplantadas o injertadas y el receptor. Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) expresados en la superficie celular, moléculas codificadas por genes ubicados en el complejo principal de histocompatibilidad humano en el cromosoma 6, son los principales mediadores del rechazo inmunitario. La falta de coincidencia de un solo gen HLA entre el donante y el sujeto puede provocar una fuerte respuesta inmunitaria (Fleischhauer K. *et al.* "Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in

HLA-B44", *N Engl J Med.*, 1990, 323:1818-1822). Los genes HLA se dividen en MHC (*Major Histocompatibility Complex*, complejo principal de histocompatibilidad) de clase I (MHC-I) y MHC de clase II (MHC-II). Los genes MHC-I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) se expresan en casi todos los tipos de células tisulares, presentando péptidos procesados con antígenos "no propios" a los linfocitos T CD8+, potenciando así su activación en los linfocitos T CD8+ citolíticos. Las células trasplantadas o injertadas que expresan moléculas MHC-I "no propias" provocarán una potente respuesta inmunitaria celular dirigida a estas células y, en última instancia, producirán su desaparición por medio de los linfocitos T CD8+ citolíticos activados. Las proteínas MHC-I están íntimamente asociadas con la beta-2-microglobulina (B2M) en el retículo endoplásmico, que es esencial para formar moléculas MHC-I funcionales en la superficie celular.

[0004] En contraste con la amplia expresión celular de los genes MHC-I, la expresión de los genes MHC-II está restringida a las células presentadoras de antígenos tales como las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B. Los genes de antígenos HLA son los genes más polimórficos observados en el genoma humano (Rubinstein P., "HLA matching for bone marrow transplantation--how much is enough?" *N Engl J Med.*, 2001, 345:1842-1844). La generación de una célula "donante universal" que sea compatible con cualquier genotipo de HLA proporciona una estrategia alternativa que podría resolver el rechazo inmunitario y los costes económicos asociados de las metodologías actuales para la evasión inmunitaria.

[0005] Para generar tal estirpe de célula/s donante/s universal/es, un enfoque previo ha sido interrumpir funcionalmente la expresión de los genes de clase MHC-I y

MHC-II. Esto podría lograrse mediante la alteración genética, p. ej., de ambos alelos genéticos que codifican la cadena ligera de MHC-I, B2M. Cabría esperar que la estirpe de células con KO (*Knock-Out*, desactivación) de B2M resultante y sus derivados presenten MHC-I de superficie muy reducida y, por lo tanto, inmunogenicidad reducida hacia los linfocitos T CD8+ alogénicos. El enfoque de la manipulación dirigida de nucleasas basadas en efectores y similares al activador de la transcripción (TALEN, *Transcription Activator-Like Effector Nuclease*) se ha utilizado para generar estirpes de hESC (*human Embryonic Stem Cell*, células madre embrionarias humanas) deficientes en B2M mediante la delección de algunos nucleótidos en el exón 2 del gen B2M (Lu, P. *et al.*, "Generating hypoinmunogenic human embryonic stem cells by the disruption of beta 2-microglobulin", *Stem Cell Rev.* 2013, 9:806-813). Aunque las estirpes de hESC dirigidas a B2M parecían ser deficientes en HLA-I superficial, se encontró que todavía contenían ARNm específicos de B2M y MHC-I. Los ARNm de B2M y MHC-I se expresaron a niveles equivalentes a los de las hESC dirigidas (tanto constitutivas como inducidas por IFN γ). Por lo tanto, existe la preocupación de que estas estirpes de hESC dirigidas a B2M por TALEN puedan expresar MHC-I de superficie celular residual que sería suficiente para provocar rechazo inmunitario, como se ha observado con células de ratón B2M2/2 que también expresan ARNm de B2M (Gross, R. y Rappuoli, R. "Pertussis toxin promoter sequences involved in modulation", *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90:3913-3917). Aunque las estirpes de hESC dirigidas a B2M por TALEN no se examinaron para detectar escisiones fuera de diana, la aparición de escisiones inespecíficas cuando se utilizan las TALEN sigue siendo un problema significativo que supondría una preocupación de

seguridad importante en su uso clínico (Grau, J. *et al.* "TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction", *Bioinformatics*, 2013, 29:2931-2932; Guilinger J. P. *et al.* "Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity", *Nat Methods* 2014, 11:429-435). Además, otro informe generó células iPSC (*induced Pluripotent Stem Cell*, células madre pluripotentes inducidas) que escaparon al reconocimiento alogénico mediante la desactivación de un primer alelo B2M y la inserción de un gen HLA-E en un segundo alelo B2M, lo que produjo la expresión superficial de dímeros o trímeros de HLA-E en ausencia de expresión superficial de HLA-A, HLA-B o HLA-C (Gornalusse, G.G. *et al.*, "HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells", *Nature Biotechnology*, 2017, 35, 765-773).

[0006] Una posible limitación de algunas de las estrategias anteriores es que las células negativas en MHC de clase I son susceptibles a la lisis por los linfocitos citolíticos naturales (NK, *Natural Killer*), ya que las moléculas HLA sirven como inhibidores de ligandos principales para los linfocitos citolíticos naturales (NK). Se ha demostrado que los linfocitos NK del hospedador eliminan las células donantes B2M -/- injertadas o trasplantadas, y ocurre un fenómeno similar *in vitro* con las estirpes leucémicas humanas negativas en MHC de clase I (Bix, M. *et al.*, "Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice", *Nature*, 1991, 349, 329-331; Zarcone, D. *et al.*, "Human leukemia-derived cell lines and clones as models for mechanistic analysis of natural killer cell-mediated cytotoxicity", *Cancer Res.* 1987, 47, 2674-2682). Por tanto, existe la necesidad de mejorar los métodos anteriores para generar

células donantes universales que puedan evadir la respuesta inmunitaria, así como la necesidad de generar células que puedan sobrevivir después del injerto. Como se describe en el presente documento, la supervivencia celular después del
5 injerto puede estar mediada por una serie de otras vías independientes de rechazo allogénico, p. ej., hipoxia, especies reactivas de oxígeno, privación de nutrientes y estrés oxidativo. También, como se describe en el presente documento, la introducción genética de factores de
10 supervivencia (genes y/o proteínas) puede ayudar a las células a sobrevivir después del injerto. Como se describe en el presente documento, una estirpe celular donante universal puede combinar propiedades que abordan tanto el rechazo allogénico como la supervivencia después del
15 injerto.

SUMARIO

[0007] En algunos aspectos, la presente divulgación abarca métodos para generar células donantes universales. Un primer método comprende modificar genéticamente una célula
20 mediante (i) la introducción de una delección y/o inserción de al menos un par de bases en el genoma de la célula en un sitio dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más de entre un antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II, o un componente o un regulador de la transcripción de
25 un complejo de MHC-I o MHC-II; y (ii) la introducción en el genoma de la célula de una inserción de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico, en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de (i),
30 generando así la célula donante universal. Un segundo método comprende modificar genéticamente una célula mediante (i) la introducción de una delección y/o inserción de al menos un par de bases en el genoma de la célula en un

sitio dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más de entre un antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II, o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo de MHC-I o MHC-II; y (ii) la introducción en el
5 genoma de la célula de una inserción de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en un locus seguro, generando así la célula donante universal. En algunas realizaciones, la célula donante universal ha aumentado la evasión inmunitaria y/o la supervivencia
10 celular en comparación con una célula no modificada.

[0008] En algunas realizaciones, el al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I o MHC-II, o el componente o el regulador de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II es un gen MHC-I seleccionado
15 entre HLA-A, HLA-B o HLA-C, un gen MHC-II seleccionado entre HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ o HLA-DR, o un gen seleccionado entre B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP o RFXANK.

[0009] En algunas realizaciones, el al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico es uno o
20 más polinucleótidos que codifican uno o más de entre PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 o CD47. En algunas realizaciones, el al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico está unido operativamente a un promotor
25 exógeno. En algunas realizaciones, el promotor exógeno es un promotor constitutivo, inducible, temporal, específico del tejido o específico del tipo de célula, en donde, opcionalmente, el promotor exógeno es un promotor de CMV, EF1a, PGK, CAG o UBC.

[00010] En algunas realizaciones, la delección y/o inserción
30 de (i) está dentro o cerca de B2M, y la inserción de (ii) es un polinucleótido que codifica PD-L1 o HLA-E.

[00011] En algunas realizaciones, el método comprende además introducir al menos una modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada. En algunas realizaciones, la al menos una modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un factor de supervivencia es una inserción de un polinucleótido que codifica MANF, lo cual aumenta la expresión de MANF en relación con la célula no modificada; o una delección y/o inserción de al menos un par de bases dentro o cerca de un gen que codifica ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK, lo cual reduce o elimina la expresión de ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK en relación con la célula no modificada. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica MANF se inserta en un locus seguro o en un gen que pertenece a un MHC-I, MHC-II o regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II.

[00012] En algunas realizaciones, la modificación genética de la célula comprende administrar al menos un sistema de endonucleasa guiado por ARN a la célula. En algunas realizaciones, el al menos un sistema de endonucleasa guiado por ARN es un sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) que comprende una nucleasa CRISPR y un ARN guía. En algunas realizaciones, la nucleasa CRISPR es Cas9, Cpf1, un homólogo de las mismas, una versión modificada de las mismas, una versión con optimización de codones de las mismas o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la nucleasa CRISPR es una Cas9 de *S. pyogenes*. En algunas realizaciones, la nucleasa CRISPR comprende una señal de localización nuclear del extremo N (NLS, *Nuclear Localization Signal*) y/o una NLS del extremo

C. En algunas realizaciones, la nucleasa CRISPR y el ARN guía están presentes en una proporción en peso de 1:1.

[00013] En algunas realizaciones, la delección y/o inserción de (i) está dentro o cerca de un locus del gen B2M, y la
5 inserción de (ii) es un polinucleótido que codifica PD-L1. En algunas realizaciones, el ARN guía usado para (i) y (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una de las SEQ ID NO: 1-3 o SEQ ID NO: 35-44. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica PD-L1
10 está flanqueado por (a) una secuencia de nucleótidos que tiene homología de secuencia con una región ubicada a la izquierda del sitio en (i) y (b) una secuencia de nucleótidos que tiene homología de secuencia con una región ubicada a la derecha del sitio en (i). En algunas
15 realizaciones, el polinucleótido que codifica PD-L1 se inserta en el locus del gen B2M dentro de 50 pares de bases del sitio en (i). En algunas realizaciones, (a) del polinucleótido consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13, y (b) del polinucleótido
20 consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica PD-L1 está unido operativamente a un promotor exógeno, en donde, opcionalmente, el promotor exógeno es un promotor CAG.

25 **[00014]** En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero, en donde, opcionalmente, la célula es una célula humana. En algunas realizaciones, la célula es una célula madre, en donde, opcionalmente, la célula madre es una célula madre pluripotente (PSC, *Pluripotent Stem Cell*),
30 una célula madre embrionaria (ESC), una célula madre adulta (ASC, *Adult Stem Cell*), una célula madre pluripotente inducida (iPSC), o una célula madre y progenitora hematopoyética (HSPC, *Hematopoietic Stem and Progenitor*

Cell). En algunas realizaciones, la célula es una célula diferenciada o una célula somática.

[00015] En algunas realizaciones, la célula donante universal es capaz de diferenciarse en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas. En algunas realizaciones, las células progenitoras de linaje restringido son células progenitoras endodérmicas pancreáticas, células progenitoras endocrinas pancreáticas, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras musculares, blastocitos o células progenitoras neuronales. En algunas realizaciones, las células somáticas completamente diferenciadas son células secretoras endocrinas tales como células beta pancreáticas, células epiteliales, células endodérmicas, macrófagos, hepatocitos, adipocitos, células renales, células sanguíneas o células del sistema inmunitario.

[00016] En otros aspectos, la presente divulgación abarca una pluralidad de células donantes universales generadas mediante cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, la pluralidad de células donantes universales se puede mantener durante un tiempo y en condiciones suficientes para que las células se sometan a diferenciación.

[00017] En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona una composición de células que comprenden (i) al menos una delección dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo de MHC-I o MHC-II; y (ii) al menos una inserción de un polinucleótido que codifica al menos un factor tolerogénico en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de una delección genética de (i).

[00018] En aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona métodos de administración de cualquiera de las células donantes universales desveladas en el presente documento a sujetos que necesitan tratamiento. En algunas realizaciones, los métodos comprenden obtener o haber obtenido una pluralidad de células donantes universales como se desvela en el presente documento después de la diferenciación en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas; y administrar al sujeto las células progenitoras de linaje restringido o las células somáticas completamente diferenciadas. La presente divulgación también proporciona un método de obtención de células para su administración a un sujeto que las necesita. El método comprende (i) obtener o haber obtenido cualquiera de las células donantes universales desveladas en el presente documento y (ii) mantener las células donantes universales durante un tiempo y en condiciones suficientes para que las células se diferencien en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas. En algunas realizaciones, las células progenitoras de linaje restringido son células progenitoras endodérmicas pancreáticas, células progenitoras endocrinas pancreáticas, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras musculares, blastocitos o células progenitoras neuronales. En algunas realizaciones, las células somáticas completamente diferenciadas son células secretoras endocrinas tales como células beta pancreáticas, células epiteliales, células endodérmicas, macrófagos, hepatocitos, adipocitos, células renales, células sanguíneas o células del sistema inmunitario. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad, en donde la

enfermedad puede ser una enfermedad genéticamente hereditaria.

[00019] Si bien la divulgación es susceptible de diversas modificaciones y formas alternativas, las realizaciones específicas de la misma se muestran a modo de ejemplo en los dibujos y se describirán detalladamente en el presente documento. Debe entenderse, sin embargo, que los dibujos y la descripción detallada presentados en el presente documento no pretenden limitar la divulgación a las realizaciones particulares develadas, sino que, por el contrario, la intención es cubrir todas las modificaciones, equivalentes y alternativas que pertenecen al espíritu y alcance de la presente divulgación tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

[00020] Otras características y ventajas de esta invención resultarán evidentes en la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de esta invención, tomadas con referencia a los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[00021] Las FIG. 1A-1C proporcionan estrategias de edición de genes específicas de la evasión inmunitaria. La FIG. 1A es una tabla que describe modificaciones ilustrativas para la evasión inmunitaria en tipos de células específicos. La FIG. 1B proporciona estrategias ilustrativas para modificar un locus de B2M. La FIG. 1C proporciona estrategias ilustrativas para modificar los locus de HLA-A, HLA-B/C y CIITA.

[00022] La FIG. 2 representa una parte del gen B2M (SEQ ID NO: 6) y ubicaciones de los ARNg (B2M-1, B2M-2 y B2M-3) para dirigirse al exón 1. También se muestran las ubicaciones de los cebadores de PCR (*Polymerase Chain*

Reaction, reacción en cadena de la polimerasa) (B2MF2 y B2MR2).

[00023] Las FIG. **3A-3C** muestran los resultados del cribado de ARNg de B2M en una estirpe de células iPSC TC-1133. La FIG. **3A** es un gráfico que muestra las frecuencias de indel (inserciones+ deleciones) de cada ARNg de B2M. El ARNg de B2M-1 proporcionó una frecuencia de indel del $2.5\% \pm 1.1\%$ ($n = 2$). El ARNg de B2M-2 proporcionó una frecuencia de indel del $87.6\% \pm 14.1\%$ ($n = 2$). El ARNg de B2M-3 proporcionó una frecuencia de indel del $63.9\% \pm 0.9\%$ ($n = 2$). Las FIG. **3B** y **3C** son gráficos que muestran un resumen de la distribución de los resultados de indel para los ARNg de B2M-2 (FIG. **3B**) y B2M-3 (Fig. **3C**).

[00024] Las FIG. **4A-4B** muestran los resultados de las desactivaciones (KO) de B2M en iPSC utilizando ARNg de B2M-2. La FIG. **4A** es un gráfico que muestra un resumen de la distribución de los resultados de indel para el ARNg de B2M-2 en las iPSC. La FIG. **4B** presenta los clones homocigotos ("Homo") para la desactivación (KO) de B2M y los clones heterocigotos ("Het") para KO de B2M.

[00025] La FIG. **5** muestra una evaluación de clones iPSC con KO de B2M. Los tres clones con KO de B2M probados mostraron una expresión de ARNm disminuida de B2M en relación con una célula de tipo silvestre o no modificada.

[00026] Las FIG. **6A-6D** muestran la expresión de B2M y HLA-ABC en clones de iPSC con KO de B2M después de un tratamiento de 47 horas con interferón-gamma. La FIG. **6A** presenta expresión en células de tipo silvestre. La FIG. **6B** muestra la expresión en el clon C4 con KO de B2M. La FIG. **6C** presenta la expresión en el clon C9 con KO de B2M. La FIG. **6D** muestra la expresión en el clon C12 con KO de B2M.

[00027] Las FIG. **7A-7D** demuestran la pluripotencia de los clones de iPSC con KO de B2M mediante la evaluación de los

niveles de expresión de SSEA-4 y TRA-1-60. La FIG. **7A** presenta expresión en células de tipo silvestre. La FIG. **7B** muestra la expresión en el clon C4 con KO de B2M. La FIG. **7C** presenta la expresión en el clon C9 con KO de B2M. La FIG. **7D** muestra la expresión en el clon C12 con KO de B2M.

[00028] La FIG. **8** muestra el análisis de TIDE (*Tracking of Indels by Decomposition*, rastreo de indel mediante descomposición) del corte con ARNg de B2M en células CyT49. Se probaron los ARNg de B2M-1, -2 o -3.

[00029] Las FIG. **9A-9B** muestran la evaluación por citometría de flujo de la expresión de B2M con y sin IFN- γ en células CyT49 WT (FIG. **9A**) y células CyT49 editadas (Fig. **9B**).

[00030] La FIG. **10** muestra el mapa de plásmido del vector donante B2M-CAGGS-PD-L1 para la HDR (*Homology-Directed Repair*, reparación dirigida por homología).

[00031] La FIG. **11** muestra el análisis de citometría de flujo para la pluripotencia de las células madre CyT49 con KO de B2M + KI (*Knock-In*, inserción) de PD-L1. Los clones derivados fueron > 99% doble positivos en OCT4 y SOX2, dos factores de transcripción vitales para la pluripotencia. Se utilizó IgG como control negativo.

[00032] Las FIG. **12A-12B** muestran el análisis de citometría de flujo de CyT49 WT (FIG. **12A**) y clones de células madre derivados con KO de B2M/KI de PD-L1 (FIG. **12B**). Las células WT regulan positivamente la expresión de B2M en respuesta a IFN γ . Los clones con KO de B2M/KI de PD-L1 expresan completamente PD-L1 y no expresan B2M con o sin tratamiento con IFN γ . NT-1 = sin tratamiento. INTG-1 = 50 ng/mL de células tratadas con IFN γ durante 48 horas.

[00033] La FIG. **13** muestra el mapa de plásmido del vector donante B2M-CAGGS-HLA-E para la HDR (*Homology-Directed Repair*, reparación dirigida por homología).

[00034] La FIG. 14 muestra el análisis de citometría de flujo para la pluripotencia de las células madre CyT49 con KO de B2M + KI de HLA-E. Los clones derivados fueron > 99% doble positivos en OCT4 y SOX2, dos factores de transcripción vitales para la pluripotencia. Se utilizó IgG como control negativo.

[00035] La FIG. 15 muestra el análisis de citometría de flujo de CyT49 WT y un clon de células madre CyT49 con KO de B2M/KI de HLA-E. Las células WT regulan positivamente la expresión de HLA-A, B, C en respuesta a IFN γ . El clon con KO de B2M/KI de HLA-E no expresa HLA-A, B, C con o sin tratamiento con IFN γ . IFN γ = 50 ng/mL. Las células se trataron con IFN γ durante 48 horas.

[00036] La FIG. 16 muestra el análisis de citometría de flujo para la expresión de HLA-E de un clon de células madre CyT49 con KO de B2M/KI de HLA-E. Se usó un clon sin editar como control para la expresión de HLA-E.

[00037] La FIG. 17 muestra la citometría de flujo para FOXA2 y SOX17 en las células en fase 1 (endodermo definitivo) diferenciadas a partir de hESC de tipo silvestre, con KI de PD-L1/KO de B2M o KO de B2M.

[00038] La FIG. 18 muestra el porcentaje cuantitativo de la expresión de FOXA2 y SOX17 en células en fase 1 (endodermo definitivo) diferenciadas a partir de células de tipo silvestre, con KI de PD-L1/KO de B2M o KO de B2M.

[00039] La FIG. 19 muestra el porcentaje cuantitativo de la expresión de CHGA, PDX1 y NKX6.1 en las células en fase 4 (PEC, *Pancreatic Endoderm progenitor Cells*, células progenitoras endodérmicas pancreáticas) diferenciadas a partir de células de tipo silvestre, con KO de B2M, KI de PD-L1/KO de B2M (V1A) o con KI de HLA-E/KO de B2M (V2A).

[00040] La FIG. 20 muestra poblaciones heterogéneas de células en fase 4 (PEC).

[00041] Las FIG. **21A-21B** muestran la expresión génica seleccionada en el transcurso de la diferenciación en células diferenciadas a partir de células de tipo silvestre, con KI de PD-L1/KO de B2M o KO de B2M (FIG. **21A**) y células diferenciadas a partir de células con KO de B2M/KI de HLA-E (V2A) (FIG. **21B**).

[00042] Las FIG. **22A-22F** muestran la expresión de B2M y PD-L1 en la fase de PEC en células diferenciadas a partir de células de tipo silvestre, con KI de PD-L1/KO de B2M o KO de B2M. La FIG. **22A** muestra la expresión de B2M en células de tipo silvestre. La FIG. **22B** muestra la expresión de B2M en células con KO de B2M. La FIG. **22C** muestra la expresión de B2M en células con KI de PD-L1/KO de B2M. La FIG. **22D** muestra la expresión de PD-L1 en células de tipo silvestre. La FIG. **22E** muestra la expresión de PD-L1 en células con KO de B2M. La FIG. **22F** muestra la expresión de PD-L1 en células con KI de PD-L1/KO de B2M.

[00043] Las FIG. **23A-23F** muestran la expresión de MHC de clase I y de clase II en la fase de PEC en células diferenciadas a partir de células de tipo silvestre, con KI de PD-L1/KO de B2M o KO de B2M. La FIG. **23A** muestra la expresión de MHC de clase I en células de tipo silvestre. La FIG. **23B** muestra la expresión de MHC de clase I en células con KO de B2M. La FIG. **23C** muestra la expresión de MHC de clase I en células con KI de PD-L1/KO de B2M. La FIG. **23D** muestra la expresión de PD-L1 de MHC de clase II en células de tipo silvestre. La FIG. **23E** muestra la expresión de MHC de clase II en células con KO de B2M. La FIG. **23F** muestra la expresión de MHC de clase II en células con KI de PD-L1/KO de B2M.

[00044] Las FIG. **24A-24D** muestran un análisis de citometría de flujo para la activación de linfocitos T utilizando el ensayo de proliferación de CFSE (*CarboxyFluorescein*

Succinimidyl Ester, éster de succinimidil-carboxifluoresceína). Se incubaron linfocitos T CD3+ primarios humanos junto con PEC derivadas de clones CyT49 WT, con KO de B2M o cpm KO de B2M/KI de PD-L1. La FIG. **24A** muestra la activación en células de tipo silvestre. La FIG. **24B** muestra la activación en células con KI de PD-L1/KO de B2M. La FIG. **24C** muestra la activación en células con KO de B2M. La FIG. **24D** resume la activación de los linfocitos T en las diversas células. ANOVA unidireccional ($\alpha = 0.05$ con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett) con "CFSE-T solo" establecido como control. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. n.s.=no significativo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones

[00045] Delección: Como se usa en el presente documento, el término "delección", que puede utilizarse indistintamente con la expresión "delección genética" o el término "desactivación", se refiere, en general, a una modificación genética en donde se retira un sitio o una región de ADN genómico mediante cualquier método de biología molecular, p. ej., métodos descritos en el presente documento, p.e j., mediante la administración a un sitio de ADN genómico de una endonucleasa y al menos un ARNg. Se puede delecionar cualquier número de nucleótidos. En algunas realizaciones, una delección implica la retirada de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos diez, al menos quince, al menos veinte o al menos 25 nucleótidos. En algunas realizaciones, una delección implica la retirada de 10-50, 25-75, 50-100, 50-200 o más de 100 nucleótidos. En algunas realizaciones, una delección implica la retirada de un gen diana completo, p. ej., un gen B2M. En algunas realizaciones, una delección implica la

retirada de parte de un gen diana, p. ej., todo o parte de un promotor y/o una secuencia codificante de un gen B2M. En algunas realizaciones, una delección implica la retirada de un regulador de la transcripción, p. ej., una región

5 promotora, de un gen diana. En algunas realizaciones, una delección implica la retirada de toda o parte de una región codificante de manera que el producto normalmente expresado por la región codificante ya no se expresa, se expresa como una forma truncada o se expresa a un nivel reducido. En

10 algunas realizaciones, una delección conduce a una disminución en la expresión de un gen en relación con una célula no modificada.

[00046] Endonucleasa: Como se usa en el presente documento, el término "endonucleasa" se refiere, en

15 general, a una enzima que escinde enlaces fosfodiéster dentro de un polinucleótido. En algunas realizaciones, una endonucleasa escinde específicamente enlaces fosfodiéster dentro de un polinucleótido de ADN. En algunas realizaciones, una endonucleasa es una nucleasa con dedo de

20 cinc (ZFN, *Zinc Finger Nuclease*), una nucleasa basada en efectores y similar al activador de la transcripción (TALEN), endonucleasa de asentamiento (HE, *Homing Endonuclease*), meganucleasa, MegaTAL o una endonucleasa asociada a CRISPR. En algunas realizaciones, una

25 endonucleasa es una endonucleasa guiada por ARN. En determinados aspectos, la endonucleasa guiada por ARN es una nucleasa CRISPR, p. ej., una endonucleasa CRISPR Cas9 de Tipo II o una endonucleasa CRISPR Cpf1 de Tipo V. En algunas realizaciones, una endonucleasa es una Cas1, Cas1B,

30 Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocida como Csn1 y Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3,

Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, o Cpf1 endonucleasa, o un homólogo de las mismas, una recombinación de la molécula de origen natural de las mismas, una versión con optimización de codones de las mismas o una versión modificada de las mismas, o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, una endonucleasa puede introducir una o más roturas monocatenarias (SSB, *Single-Stranded Breaks*) y/o una o más roturas bicatenarias (DSB, *Double-Stranded Breaks*).

10 **[00047] Modificación genética:** Como se usa en el presente documento, la expresión "modificación genética" se refiere, en general, a un sitio de ADN genómico que se ha editado o manipulado genéticamente utilizando cualquier método de biología molecular, p. ej., métodos descritos en el presente documento, p. ej., mediante la administración a un sitio de ADN genómico de una endonucleasa y al menos un ARNg. Las modificaciones genéticas de ejemplo incluyen inserciones, deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones, y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, una modificación genética es una delección. En algunas realizaciones, una modificación genética es una inserción. En otras realizaciones, una modificación genética es una mutación por inserción-delección (o indel), de modo que el marco de lectura del gen diana se desplaza conduciendo a un producto génico alterado o a ningún producto génico.

25 **[00048] ARN guía (ARNg):** Como se usa en el presente documento, la expresión "ARN guía" o el término "ARNg" se refiere, en general, a ácido ribonucleico corto que puede interactuar con, p. ej., unirse a una endonucleasa y unirse o hibridarse a un sitio genómico o región genómica diana. En algunas realizaciones, un ARNg es un ARN guía de una sola molécula (ARNsg). En algunas realizaciones, un ARNg

puede comprender una región de extensión espaciadora. En algunas realizaciones, un ARNg puede comprender una región de extensión de ARNtracr. En algunas realizaciones, un ARNg es monocatenario. En algunas realizaciones, un ARNg comprende nucleótidos de origen natural. En algunas realizaciones, un ARNg es un ARNg modificado químicamente. En algunas realizaciones, un ARNg modificado químicamente es un ARNg que comprende al menos un nucleótido con una modificación química, p. ej., una modificación de 2'-O-metil-azúcar. En algunas realizaciones, un ARNg modificado químicamente comprende una cadena principal de ácido nucleico modificado. En algunas realizaciones, un ARNg modificado químicamente comprende un resto de 2'-O-metil-fosforotioato. En algunas realizaciones, un ARNg se puede complejar previamente con una ADN endonucleasa.

[00049] Inserción: Como se usa en el presente documento, el término "introducción" que se puede utilizar indistintamente con la expresión "inserción genética" o "inserción", se refiere, en general, a una modificación genética en donde un polinucleótido se introduce en o se añade a un sitio o una región de ADN genómico mediante cualquier método de biología molecular, p. ej., los métodos descritos en el presente documento, p. ej., mediante la administración a un sitio de ADN genómico de una endonucleasa y al menos un ARNg. En algunas realizaciones, una inserción puede ocurrir dentro o cerca de un sitio de ADN genómico que ha sido el sitio de una modificación genética previa, p. ej., una delección o mutación de inserción-delección. En algunas realizaciones, se produce una inserción en un sitio de ADN genómico que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro de un sitio de una modificación genética previa, p. ej., una delección o mutación de inserción-

delección. En algunas realizaciones, se produce una inserción en un locus seguro. En algunas realizaciones, una inserción implica la introducción de un polinucleótido que codifica una proteína de interés. En algunas realizaciones, una inserción implica la introducción de un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico. En algunas realizaciones, una inserción implica la introducción de un polinucleótido que codifica un factor de supervivencia. En algunas realizaciones, una inserción implica la introducción de un promotor exógeno, p. ej., un promotor constitutivo, p. ej., un promotor CAG. En algunas realizaciones, una inserción implica la introducción de un polinucleótido que codifica un gen no codificante. En general, un polinucleótido que se va a insertar está flanqueado por secuencias (p. ej., brazos de homología) que tienen una homología de secuencia sustancial con el ADN genómico en o cerca del sitio de inserción.

[00050] Complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I): Como se usan en el presente documento, la expresión "complejo principal de histocompatibilidad de clase I" o el término "MHC-I" se refieren, en general, a una clase de biomoléculas que se encuentran sobre la superficie celular de todas las células nucleadas en vertebrados, incluyendo mamíferos, p. ej., seres humanos; y que funcionan para mostrar péptidos de antígenos foráneos o no propios, p. ej., proteínas, desde el interior de la célula (es decir, citosólicos) a linfocitos T citotóxicos, p. ej., linfocitos T CD8+, con el fin de estimular una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, una biomolécula de MHC-I es un gen MHC-I o una proteína MHC-I. La complejación de las proteínas MHC-I con la proteína beta-2-microglobulina (B2M) es necesaria para la expresión en la superficie celular de todas las proteínas MHC-I. En

algunas realizaciones, la disminución de la expresión de un antígeno leucocitario humano (HLA) MHC-I en relación con una célula no modificada implica una disminución (o reducción) en la expresión de un gen MHC-I. En algunas
5 realizaciones, la disminución de la expresión de un antígeno leucocitario humano (HLA) MHC-I en relación con una célula no modificada implica una disminución (o reducción) en la expresión en la superficie celular de una proteína MHC-I. En algunas realizaciones, una biomolécula
10 de MHC-I es HLA-A (ID génico del NCBI n.º: 3105), HLA-B (ID génico del NCBI n.º: 3106), HLA-C (ID génico del NCBI n.º: 3107) o B2M (ID génico del NCBI n.º: 567).

[00051] Complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II): Como se usa en el presente documento, la
15 expresión "complejo principal de histocompatibilidad de clase II" o el término "MHC-II" se refiere, en general, a una clase de biomoléculas que se encuentran normalmente en la superficie celular de células presentadoras de antígeno en vertebrados, incluyendo mamíferos, p. ej., seres
20 humanos; y que funcionan para mostrar péptidos de antígenos no propios o foráneos, p. ej., proteínas, desde fuera de la célula (extracelular) a los linfocitos T citotóxicos, p. ej., linfocitos T CD8+, con el fin de estimular una respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones, una célula
25 presentadora de antígeno es una célula dendrítica, un macrófago o un linfocito B. En algunas realizaciones, una biomolécula de MHC-II es un gen MHC-II o una proteína MHC-II. En algunas realizaciones, la disminución de la expresión de un antígeno leucocitario humano (HLA) MHC-II
30 en relación con una célula no modificada implica una disminución (o reducción) en la expresión de un gen MHC-II. En algunas realizaciones, la disminución de la expresión de un antígeno leucocitario humano (HLA) MHC-II en relación

con una célula no modificada implica una disminución (o reducción) en la expresión en la superficie celular de una proteína MHC-II. En algunas realizaciones, una biomolécula de MHC-II es HLA-DPA (ID génico del NCBI n.º: 3113), HLA-DPB (ID génico del NCBI n.º: 3115), HLA-DMA (ID génico del NCBI n.º: 3108), HLA-DMB (ID génico del NCBI n.º: 3109), HLA-DOA (ID génico del NCBI n.º: 3111), HLA-DOB (ID génico del NCBI n.º: 3112), HLA-DQA (ID génico del NCBI n.º: 3117), HLA-DQB (ID génico del NCBI n.º: 3119), HLA-DRA (ID génico del NCBI n.º: 3122) o HLA-DRB (ID génico del NCBI n.º: 3123).

[00052] Polinucleótido: Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido", que puede utilizarse indistintamente con la expresión "ácido nucleico", se refiere, en general, a una biomolécula que comprende dos o más nucleótidos. En algunas realizaciones, un polinucleótido comprende al menos dos, al menos cinco, al menos diez, al menos veinte, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 250, al menos 500, o cualquier número de nucleótidos. Un polinucleótido puede ser una molécula de ADN o ARN, o una molécula híbrida de ADN/ARN. Un polinucleótido puede ser monocatenario o bicatenario. En algunas realizaciones, un polinucleótido es un sitio o una región de ADN genómico. En algunas realizaciones, un polinucleótido es un gen endógeno que está comprendido dentro del genoma de una célula no modificada o una célula donante universal. En algunas realizaciones, un polinucleótido es un polinucleótido exógeno que no está integrado en el ADN genómico. En algunas realizaciones, un polinucleótido es un polinucleótido exógeno que está integrado en el ADN genómico. En algunas realizaciones, un polinucleótido es un plásmido o un vector vírico adenoasociado. En algunas

realizaciones, un polinucleótido es una molécula circular o lineal.

[00053] Locus seguro: Como se usa en el presente documento, la expresión "locus seguro" se refiere, en general, a cualquier ubicación, sitio o región de ADN genómico que pueda acomodar una inserción genética en dicha ubicación, sitio o región sin que se produzcan efectos adversos en una célula. En algunas realizaciones, un locus seguro es una región intragénica o extragénica. En algunas realizaciones, un locus seguro es una región de ADN genómico que normalmente es transcripcionalmente silenciosa. En algunas realizaciones, un locus seguro es un locus de AAVS1 (PPP1 R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX (F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF o TTR. En algunas realizaciones, un locus seguro se describe en Sadelain, M. *et al.*, "Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome" *Nature Reviews Cancer*, 2012, Vol 12, páginas 51-58.

[00054] Interruptor de seguridad: Como se usa en el presente documento, la expresión "interruptor de seguridad" se refiere, en general, a una biomolécula que conduce a una célula a someterse a apoptosis. En algunas realizaciones, un interruptor de seguridad es una proteína o un gen. En algunas realizaciones, un interruptor de seguridad es un gen suicida. En algunas realizaciones, un interruptor de seguridad, p. ej., timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-tk, *Herpes Simplex Virus thymidine kinase*), conduce a una célula a someterse a apoptosis mediante la metabolización de un profármaco, p. ej., ganciclovir. En algunas realizaciones, la presencia sobreexpresada de un interruptor de seguridad por sí solo conduce a una célula a someterse a apoptosis. En algunas realizaciones, un

interruptor de seguridad es una molécula basada en p53, HSV-tk o caspasa-9 inducible.

[00055] Sujeto: Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero. En algunas realizaciones, un sujeto es un primate no humano o un roedor. En algunas realizaciones, un sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, un sujeto tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad o un trastorno. En algunas realizaciones, un sujeto tiene uno o más síntomas de una enfermedad o un trastorno.

[00056] Factor de supervivencia: Como se usa en el presente documento, la expresión "factor de supervivencia" se refiere, en general, a una proteína (p. ej., expresada por un polinucleótido como se describe en el presente documento) que, cuando aumenta o disminuye en una célula, permite que la célula, p. ej., una célula donante universal, sobreviva después del trasplante o injerto en un sujeto hospedador con tasas de supervivencia superiores en relación con una célula no modificada. En algunas realizaciones, un factor de supervivencia es un factor de supervivencia humano. En algunas realizaciones, un factor de supervivencia es un miembro de una vía crítica que participa en la supervivencia celular. En algunas realizaciones, una vía crítica que participa en la supervivencia celular tiene implicaciones sobre la hipoxia, las especies reactivas de oxígeno, la privación de nutrientes y/o el estrés oxidativo. En algunas realizaciones, la modificación genética, p. ej., delección o inserción, de al menos un factor de supervivencia permite que una célula donante universal sobreviva durante un período de tiempo más largo, p. ej., al menos 1.05, al menos 1.1, al menos 1.25, al menos 1.5, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20 o

al menos 50 veces más tiempo que una célula no modificada después del injerto. En algunas realizaciones, un factor de supervivencia es ZNF143 (ID génico del NCBI n.º: 7702) o TXNIP (ID génico del NCBI n.º: 10628) o FOXO1 (ID génico del NCBI n.º: 2308) o JNK (ID génico del NCBI n.º: 5599) o MANF (ID génico del NCBI n.º: 7873). En algunas realizaciones, se inserta un factor de supervivencia en una célula, p. ej., una célula donante universal. En algunas realizaciones, se deleciona un factor de supervivencia de una célula, una célula donante universal. En algunas realizaciones, una inserción de un polinucleótido que codifica MANF permite que una célula, p. ej., una célula donante universal, sobreviva después del trasplante o injerto en un sujeto hospedador con tasas de supervivencia superiores en relación con una célula no modificada. En algunas realizaciones, una mutación por deleción o por inserción-deleción dentro o cerca de un gen ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK permite que una célula, p. ej., una célula donante universal, sobreviva después del trasplante o injerto en un sujeto hospedador con tasas de supervivencia superiores en relación con a una célula no modificada.

[00057] Factor tolerogénico: Como se usa en el presente documento, la expresión "factor tolerogénico" se refiere, en general, a una proteína (p. ej., expresada por un polinucleótido como se describe en el presente documento) que, cuando aumenta o disminuye en una célula, permite que la célula, p. ej., una célula donante universal, inhiba o evada el rechazo inmunitario después del trasplante o injerto en un sujeto hospedador a tasas superiores en relación con una célula no modificada. En algunas realizaciones, un factor tolerogénico es un factor tolerogénico humano. En algunas realizaciones, la modificación genética de al menos un factor tolerogénico

(p. ej., la inserción o delección de al menos un factor tolerogénico) permite a una célula, p. ej., una célula donante universal, inhibir o evadir el rechazo inmunitario con tasas de al menos 1.05, al menos 1.1, al menos 1.25, al menos 1.5, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20 o al menos al menos 50 veces superiores a las de una célula no modificada después del injerto. En algunas realizaciones, un factor tolerogénico es HLA-E (ID génico del NCBI n.º: 3133), HLA-G (ID génico del NCBI n.º: 3135) o CTLA-4 (ID génico del NCBI n.º: 1493) o CD47 (ID génico del NCBI n.º: 961) o PD-L1 (ID génico del NCBI n.º: 29126). En algunas realizaciones, se inserta un factor tolerogénico en una célula, p. ej., una célula donante universal. En algunas realizaciones, se deleciona un factor tolerogénico de una célula, p. ej., una célula donante universal. En algunas realizaciones, una inserción de un polinucleótido que codifica HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 y/o PD-L1 permite que una célula, p. ej., una célula donante universal, inhiba o evite el rechazo inmunitario después del trasplante o injerto en un sujeto hospedador.

[00058] Regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II:

Como se usa en el presente documento, la expresión "regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II" se refiere, en general, a una biomolécula que modula, p. ej., aumenta o disminuye, la expresión de un antígeno leucocitario humano MHC-I y/o MHC-II. En algunas realizaciones, una biomolécula es un polinucleótido, p. ej., un gen o una proteína. En algunas realizaciones, un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II aumentará o disminuirá la expresión en la superficie celular de al menos una proteína MHC-I o MHC-II. En algunas realizaciones, un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II aumentará o disminuirá la expresión de al menos un

gen MHC-I o MHC-II. En algunas realizaciones, el regulador de la transcripción es CIITA (ID génico del NCBI n.º: 4261) o NLRC5 (ID génico del NCBI n.º: 84166). En algunas realizaciones, la delección o reducción de la expresión de

5 CIITA o NLRC5 disminuye la expresión de al menos un gen MHC-I o MHC-II.

[00059] Célula donante universal: Como se usa en el presente documento, la expresión "célula donante universal" se refiere, en general, a una célula modificada

10 genéticamente que es menos susceptible al rechazo allogénico durante un trasplante celular y/o demuestra una mayor supervivencia después del trasplante, en relación con una célula no modificada. En algunas realizaciones, una célula modificada genéticamente como se describe en el presente

15 documento es una célula donante universal. En algunas realizaciones, la célula donante universal ha aumentado la evasión inmunitaria y/o la supervivencia celular en comparación con una célula no modificada. En algunas realizaciones, la célula donante universal ha aumentado la

20 supervivencia celular en comparación con una célula no modificada. En algunas realizaciones, una célula donante universal puede ser una célula madre. En algunas realizaciones, una célula donante universal puede ser una célula madre embrionaria (ESC), una célula madre adulta

25 (ASC), una célula madre pluripotente inducida (iPSC) o una célula madre o progenitora hematopoyética (HSPC). En algunas realizaciones, una célula donante universal puede ser una célula diferenciada. En algunas realizaciones, una célula donante universal puede ser una célula somática (p.

30 ej., células del sistema inmunitario). En algunas realizaciones, se administra una célula donante universal a un sujeto. En algunas realizaciones, se administra una célula donante universal a un sujeto que tiene, se sospecha

que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad. En algunas realizaciones, la célula donante universal es capaz de diferenciarse en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas. En algunas realizaciones, las células progenitoras de linaje restringido son células progenitoras endodérmicas pancreáticas, células progenitoras endocrinas pancreáticas, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras musculares, blastocitos o células progenitoras neuronales. En algunas realizaciones, las células somáticas completamente diferenciadas son células secretoras endocrinas tales como células beta pancreáticas, células epiteliales, células endodérmicas, macrófagos, hepatocitos, adipocitos, células renales, células sanguíneas o células del sistema inmunitario.

[00060] Célula no modificada: Como se usa en el presente documento, la expresión "célula no modificada" se refiere a una célula que no ha sido sometida a una modificación genética en la que participe un polinucleótido o un gen que codifica un MHC-I, un MHC-II, un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II, un factor de supervivencia y/o un factor tolerogénico. En algunas realizaciones, una célula no modificada puede ser una célula madre. En algunas realizaciones, una célula no modificada puede ser una célula madre embrionaria (ESC), una célula madre adulta (ASC), una célula madre pluripotente inducida (iPSC) o una célula madre o progenitora hematopoyética (HSPC). En algunas realizaciones, una célula no modificada puede ser una célula diferenciada. En algunas realizaciones, una célula no modificada puede seleccionarse de células somáticas (p. ej., células del sistema inmunitario, p. ej., un linfocito T, p. ej., un linfocito T CD8+). Si una célula donante universal se compara "en relación con una célula no

modificada", la célula donante universal y la célula no modificada son del mismo tipo de célula o comparten una estirpe celular parental común, p. ej., una iPSC donante universal se compara con una iPSC no modificada.

5 **[00061] Dentro o cerca de un gen:** Como se usa en el presente documento, la expresión "dentro o cerca de un gen" se refiere a un sitio o una región de ADN genómico que es un componente intrónico o extrónico de dicho gen o que está ubicado próximo a dicho gen. En algunas realizaciones, un
10 sitio de ADN genómico está dentro de un gen si comprende al menos una parte de un intrón o exón de dicho gen. En algunas realizaciones, un sitio de ADN genómico ubicado cerca de un gen puede estar en el extremo 5' o 3' de dicho gen (p. ej., el extremo 5' o 3' de la región codificante de
15 dicho gen). En algunas realizaciones, un sitio de ADN genómico ubicado cerca de un gen puede ser una región promotora o una región represora que module la expresión de dicho gen. En algunas realizaciones, un sitio de ADN genómico ubicado cerca de un gen puede estar en el mismo
20 cromosoma que dicho gen. En algunas realizaciones, un sitio o una región de ADN genómico está cerca de un gen si está dentro de 50Kb, 40Kb, 30Kb, 20Kb, 10Kb, 5Kb, 1Kb, o más cerca del extremo 5' o 3' de dicho gen (p. ej., el extremo 5' o 3' de la región codificante de dicho gen).

25

II. Métodos de edición genómica

[00062] La edición genómica se refiere, en general, al proceso de modificar la secuencia de nucleótidos de un genoma, preferentemente de un modo preciso o
30 predeterminado. En algunas realizaciones, los métodos de edición genómica como se describen en el presente documento, p. ej., el sistema de endonucleasa CRISPR, pueden usarse para modificar genéticamente una célula como

se describe en el presente documento, p. ej., para crear una célula donante universal. En algunas realizaciones, los métodos de edición genómica como se describen en el presente documento, p. ej., el sistema de endonucleasa CRISPR, pueden utilizarse para modificar genéticamente una célula como se describe en el presente documento, p. ej., para introducir al menos una modificación genética dentro o cerca de al menos un gen que disminuya la expresión de uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y/o MHC-II u otros componentes del complejo de MHC-I o MHC-II en relación con una célula no modificada; para introducir al menos una modificación genética que aumenta la expresión de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en relación con una célula no modificada; y/o para introducir al menos una modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un gen que codifica un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada.

[00063] Los ejemplos de métodos de edición genómica descritos en el presente documento incluyen métodos para usar nucleasas de sitio dirigido para cortar el ácido desoxirribonucleico (ADN) en ubicaciones diana precisas en el genoma, creando de este modo roturas de ADN monocatenarias o bicatenarias en ubicaciones particulares en el genoma. Dichas roturas pueden repararse y se reparan de manera regular mediante procesos celulares endógenos naturales, tales como la reparación dirigida por homología (HDR) y la unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*), como se describe en Cox *et al.*, "Therapeutic genome editing: prospects and challenges", *Nature Medicine*, 2015, 21(2), 121-31. Estos dos principales procesos de reparación del ADN consisten en una familia de vías alternativas. La NHEJ une directamente los extremos de

ADN resultantes de una rotura bicatenaria, en ocasiones con la pérdida o adición de secuencia de nucleótidos, lo que puede alterar o potenciar la expresión génica. La HDR utiliza una secuencia homóloga o secuencia donante como

5 molde para insertar una secuencia de ADN definida en el punto de rotura. La secuencia homóloga puede estar en el genoma endógeno, tal como una cromátida hermana. Como alternativa, la secuencia donante puede ser un

10 polinucleótido exógeno, tal como un oligonucleótido monocatenario, un oligonucleótido bicatenario, un oligonucleótido dúplex o un virus, que tiene regiones (p. ej., brazo de homología derecho e izquierdo) de alta homología con el locus escindido por nucleasa, pero que también puede contener una secuencia adicional o cambios de

15 secuencia, incluyendo delecciones que pueden incorporarse en el locus diana escindido. Un tercer mecanismo de reparación puede ser la unión de extremos mediada por microhomología (MMEJ, *Microhomology-Mediated End Joining*), también denominada "NHEJ alternativa", en la que el resultado

20 genético es similar a la NHEJ en que pueden producirse pequeñas delecciones e inserciones en el sitio de escisión. La MMEJ puede hacer uso de secuencias homólogas de unos pocos pares de bases que flanquean al sitio de rotura del ADN para impulsar un resultado de la reparación de unión de

25 extremos de ADN más favorecido y estudios recientes han dilucidado adicionalmente el mecanismo molecular de este proceso; véase, p. ej., Cho y Greenberg, *Nature*, 2015, 518, 174-76; Kent *et al.*, *Nature Structural and Molecular Biology*, 2015, 22(3):230-7; Mateos-Gomez *et al.*, *Nature*,

30 2015, 518, 254-57; Ceccaldi *et al.*, *Nature*, 2015, 528, 258-62. En algunos casos, puede ser posible predecir los resultados de reparación probables basándose en el análisis

de las microhomologías potenciales en el sitio de rotura del ADN.

[00064] Cada uno de estos mecanismos de edición genómica se puede utilizar para crear las modificaciones genéticas
5 deseadas. Una etapa en el proceso de edición genómica puede ser crear una o dos roturas de ADN, siendo las últimas roturas bicatenarias o dos roturas monocatenarias, en el locus diana lo más cerca posible del sitio previsto para la mutación. Esto se puede lograr mediante el uso de
10 endonucleasas, como se describe e ilustra en el presente documento.

Sistema de endonucleasa CRISPR

[00065] El sistema de endonucleasa CRISPR es un mecanismo de defensa que se produce de manera natural en procariotas
15 que se ha readaptado como una plataforma dirigida al ADN guiado por ARN usada para la edición génica. Los sistemas CRISPR incluyen sistemas de Tipos I, II, III, IV, V y VI. En algunos aspectos, el sistema CRISPR es un sistema CRISPR/Cas9 de Tipo II. En otros aspectos, el sistema
20 CRISPR es un sistema CRISPR/Cprf de Tipo V. Los sistemas CRISPR se basan en una endonucleasa de ADN, p. ej., Cas9, y dos ARN no codificantes, ARN de CRISPR (ARNcr) y ARN trans-activador (ARNtracr), para dirigirse a la escisión del ADN.

[00066] El ARNcr dirige el reconocimiento de la secuencia y
25 la especificidad del complejo de CRISPR-endonucleasa 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 la dirección del complejo de CRISPR-endonucleasa a
30 locus específicos. El complejo de CRISPR-endonucleasa se une solo a secuencias de ADN que contienen una coincidencia de secuencia con los primeros 20 nt del ARN simple guía (ARNsg), si la secuencia diana va seguida por un motivo de

ADN corto específico (con la secuencia NGG) denominado motivo adyacente de protoespaciador (PAM, *Protospacer Adjacent Motif*).

[00067] 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 para formar el complejo de CRISPR-endonucleasa catalíticamente activo, que entonces puede escindir el ADN diana.

[00068] Una vez que el complejo de CRISPR-endonucleasa se une a ADN en un sitio diana, dos dominios nucleasa independientes dentro de la endonucleasa escinden cada uno una de las cadenas de ADN a tres bases en el sentido de 5' del sitio de PAM, dejando una rotura bicatenaria (DSB) donde ambas cadenas del ADN terminan en un par de bases (un extremo romo).

[00069] En algunas realizaciones, la endonucleasa es una Cas9 (proteína 9 asociada a CRISPR). En algunas realizaciones, la endonucleasa Cas9 es de *Streptococcus pyogenes*, aunque se pueden utilizar otros homólogos de Cas9, p. ej., Cas9 de *S. aureus*, Cas9 de *N. meningitidis*, CRISPR 1 Cas9 de *S. thermophilus*, CRISPR 3 Cas9 de *S. thermophilus* o Cas9 de *T. denticola*. En otros casos, la endonucleasa CRISPR es Cpf1, p. ej., Cpf1 ND2006 de *L. bacteria* o Cpf1 BV3L6 de *Acidaminococcus* sp. En algunas realizaciones, la endonucleasa es Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocida como Csn1 y Csx12), endonucleasa Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, o Cpf1. En algunas realizaciones, se pueden utilizar variantes de tipo silvestre. En algunas realizaciones, se pueden utilizar versiones modificadas (p.

ej., uno de sus homólogos, una recombinación de su molécula de origen natural, una versión con optimización de codones de las mismas o versiones modificadas de las mismas) de las endonucleasas precedentes.

5 **[00070]** La nucleasa CRISPR se puede unir a al menos una señal de localización nuclear (NLS). La al menos una NLS puede estar ubicada en o dentro de 50 aminoácidos del extremo amino de la nucleasa CRISPR y/o al menos una NLS puede ubicarse en o dentro de 50 aminoácidos del extremo
10 carboxi de la nucleasa CRISPR.

[00071] Los polipéptidos CRISPR/Cas ilustrativos incluyen los polipéptidos Cas9 según lo publicado en Fonfara *et al.*, "Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas
15 systems", *Nucleic Acids Research*, 2014, 42: 2577-2590. El sistema de nomenclatura del gen CRISPR/Cas ha sufrido una extensa rescritura desde que se descubrieron los genes Cas. Fonfara et al. también proporcionan secuencias de PAM para los polipéptidos Cas9 de diversas especies.

20 ***Nucleasas de dedo de cinc***

[00072] Las nucleasas de dedo de cinc (ZFN) son proteínas modulares formadas por un dominio de unión a ADN de dedo de cinc diseñado unido al dominio catalítico de la
25 endonucleasa FokI de tipo II. Debido a que FokI funciona únicamente como un dímero, ha de diseñarse un par de ZFN para que se unan a secuencias de "semisitio" diana afines en cadenas opuestas de ADN y con un espaciado preciso entre ellas para permitir la formación del dímero de FokI catalíticamente activo. Tras la dimerización del dominio
30 FokI, que por sí mismo no tiene especificidad de secuencia, se genera una rotura de ADN bicatenario entre los semisitios de ZFN como etapa de inicio en la edición genómica.

[00073] El dominio de unión a ADN de cada ZFN está formado normalmente por 3-6 dedos de cinc con la arquitectura Cys2-His2 abundante, reconociendo cada dedo principalmente un triplete de nucleótidos en una cadena de la secuencia de ADN diana, aunque también puede ser importante la interacción de cadena cruzada con un cuarto nucleótido. La alteración de los aminoácidos de un dedo en las posiciones que producen contactos clave con el ADN altera la especificidad de secuencia de un dedo específico. Por lo tanto, una proteína de dedo de cinc con cuatro dedos reconocerá de manera selectiva una secuencia diana de 12 pb, donde la secuencia diana es una composición de las preferencias de triplete aportadas por cada dedo, aunque la preferencia de triplete puede estar influenciada en diversos grados por dedos vecinos. Un aspecto importante de las ZFN es que pueden redirigirse fácilmente a prácticamente cualquier dirección genómica, simplemente modificando dedos individuales. En la mayoría de aplicaciones de las ZFN, se usan proteínas de 4-6 dedos, que reconocen 12-18 pb, respectivamente. Por lo tanto, un par de ZFN reconocerán normalmente una secuencia diana combinada de 24-36 pb, que no incluye el espaciador de 5-7 pb típico entre los semisitios. Los sitios de unión pueden separarse adicionalmente con espaciadores más grandes, incluyendo de 15-17 pb. Es probable que una secuencia diana de esta longitud sea única en el genoma humano, asumiendo que se excluyan secuencias repetitivas u homólogos génicos durante el proceso de diseño. Sin embargo, las interacciones de proteína ZFN-ADN no son absolutas en su especificidad, por lo que no se producen eventos de unión y escisión fuera de la diana, ya sea como un heterodímero entre las dos ZFN o como un homodímero de una o la otra de las ZFN. Esta última posibilidad se ha

eliminado eficazmente diseñando genéticamente la interfaz de dimerización del dominio FokI para crear variantes "más" y "menos", también conocidas como variantes de heterodímero obligado, que solo pueden dimerizarse entre sí y no por sí mismas. Forzar al heterodímero obligado impide la formación del homodímero. Esto ha mejorado en gran medida la especificidad de las ZFN, así como cualquier otra nucleasa que adopte estas variantes de FokI.

[00074] Se han descrito en la técnica diversos sistemas a base de ZFN, se publican regularmente modificaciones de los mismos y numerosas referencias describen reglas y parámetros que se usan para guiar el diseño de las ZFN; véase, p. ej., Segal *et al.*, *Proc Natl Acad Sci*, 1999 96(6):2758-63; Dreier B *et al.*, *J Mol Biol.*, 2000, 303(4):489-502; Liu Q *et al.*, *J Biol Chem.*, 2002, 277(6):3850-6; Dreier *et al.*, *J Biol Chem.*, 2005, 280(42):35588-97; y Dreier *et al.*, *J Biol Chem.* 2001, 276(31):29466-78.

Nucleasas basadas en efectores y similares al activador de la transcripción (TALEN)

[00075] Las TALEN representan otro formato de nucleasas modulares mediante las cuales, como con las ZFN, se enlaza un dominio de unión a ADN diseñado al dominio de nucleasa FokI y un par de TALEN funcionan en tándem para lograr la escisión del ADN diana. La principal diferencia respecto de las ZFN es la naturaleza del dominio de unión de ADN y las propiedades de reconocimiento de la secuencia de ADN diana. El dominio de unión a ADN de TALEN procede de las proteínas TALE, que se describieron originariamente en el patógeno bacteriano de plantas *Xanthomonas sp.* Las TALE están formadas por series en tándem de 33-35 repeticiones de aminoácidos, reconociendo cada repetición un solo par de bases en la secuencia de ADN diana que normalmente tiene

hasta 20 pb de longitud, proporcionando una longitud de secuencia diana de hasta 40 pb. La especificidad de nucleótidos de cada repetición se determina por el dirresto variable de repetición (RVD, *Repeat Variable Di-residue*), que incluye solo dos aminoácidos en las posiciones 12 y 13. Las bases guanina, adenina, citosina y timina se reconocen principalmente por los cuatro RVD: Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp y Asn-Gly, respectivamente. Esto constituye un código de reconocimiento mucho más simple que para los dedos de cinc y por tanto, representa una ventaja frente a estos últimos para el diseño de nucleasas. Sin embargo, como con las ZFN, las interacciones entre proteína-ADN de las TALEN no son absolutas en su especificidad y las TALEN también se han beneficiado del uso de variantes de heterodímero obligado del dominio FokI para reducir la actividad fuera de la diana.

[00076] Se han creado variantes adicionales del dominio FokI que tienen su función catalítica desactivada. En caso de que una mitad de un par de TALEN o ZFN contenga un dominio de FokI inactivo, solo se producirá una escisión de ADN monocatenario (mellado) en el sitio diana, en lugar de una DSB. El resultado es comparable al uso de las mutantes de "nickasa" de CRISPR/Cas9 o CRISPR/Cpf1 en las que se ha desactivado uno de los dominios de escisión de Cas9. Pueden usarse mellas de ADN para impulsar la edición genómica mediante HDR, pero con una eficacia menor que con una DSB. El principal beneficio es que las mellas fuera de la diana se reparan con rapidez y exactitud, a diferencia de la DSB, que es propensa a la reparación errónea mediada por NHEJ.

[00077] Se ha descrito en la técnica una variedad de sistemas basados en TALEN y regularmente se publican modificaciones de los mismos; véanse, p. ej., Boch, *Science*, 2009 326(5959):1509-12; Mak *et al.*, *Science*, 2012,

335(6069):716-9; y Moscou *et al.*, *Science*, 2009, 326(5959):1501. El uso de las TALEN basadas en la plataforma "Golden Gate", o esquema de clonación, ha sido descrito por múltiples grupos; véase, p. ej., Cermak *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(12):e82; Li *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39(14):6315-25; Weber *et al.*, *PLoS One.*, 2011, 6(2):e16765; Wang *et al.*, *J Genet Genomics*, 2014, 41(6):339-47.; y Cermak T *et al.*, *Methods Mol Biol.*, 2015 1239:133-59.

10 *Endonucleasas de asentamiento*

[00078] Las endonucleasas de asentamiento (HE) son endonucleasas específicas de secuencia que tienen largas secuencias de reconocimiento (14-44 pares de bases) y escinden el ADN con alta especificidad - normalmente en sitios únicos en el genoma. Hay al menos seis familias conocidas de HE clasificadas por su estructura, que incluyen GIY-YIG, caja His-Cis, HNH, PD-(D/E) xK y de tipo Vsr que derivan de una amplia gama de hospedadores, incluyendo eucariotas, protistas, bacterias, arqueas, cianobacterias y fagos. Al igual que con las ZFN y las TALEN, las HE pueden usarse para crear una DSB en un locus diana como etapa inicial en la edición genómica. Además, algunas HE naturales y diseñadas cortan únicamente una sola cadena de ADN, funcionando de este modo como nickasas de sitio específico. La secuencia diana grande de las HE y la especificidad que ofrecen han hecho que sean candidatos atractivos para crear DSB de sitio específico.

[00079] Se ha descrito en la técnica una variedad de sistemas basados en HE y se comunican regularmente modificaciones de los mismos; véase, p. ej., la revisión de Steentoft *et al.*, *Glycobiology*, 2014, 24(8):663-80; Belfort y Bonocora, *Methods Mol Biol.*, 2014, 1123:1-26; y Hafez y Hausner, *Genome*, 2012, 55(8):553-69.

MegaTAL/Tev-mTALEN/MegaTev

[00080] Como ejemplos adicionales de nucleasas híbridas, la plataforma MegaTAL y la plataforma Tev-mTALEN usan una fusión de dominios de unión a ADN de TALE y HE catalíticamente activas, aprovechando la unión a ADN ajustable y la especificidad de la TALE, así como la especificidad de la secuencia de escisión de la HE: véase, p. ej., Boissel *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42: 2591-2601; Kleinstiver *et al.*, *G3*, 2014, 4:1155-65; y Boissel y Scharenberg, *Methods Mol. Biol.*, 2015, 1239: 171-96.

[00081] En una variación adicional, la arquitectura de MegaTev es la fusión de una meganucleasa (Mega) con el dominio de nucleasa procedente de la endonucleasa de asentamiento GIY-YIG I-TevI (Tev). Los dos sitios activos están ubicados a ~30 pb de distancia en un sustrato de ADN y generan dos DSB con extremos cohesivos no compatibles; véase, p. ej., Wolfs *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42, 8816-29. Se prevé que evolucionarán otras combinaciones de estrategias basadas en nucleasas existentes y serán útiles para lograr las modificaciones genómicas dirigidas descritas en el presente documento.

dCas9-FokI o dCpf1-FokI y otras nucleasas

[00082] La combinación de las propiedades estructurales y funcionales de las plataformas de nucleasa descritas anteriormente ofrece una estrategia adicional para la edición genómica que puede superar potencialmente algunas de las deficiencias inherentes. A modo de ejemplo, el sistema de edición genómica de CRISPR emplea normalmente una sola endonucleasa Cas9 para crear una DSB. La especificidad de la dirección está impulsada por una secuencia de 20 o 24 nucleótidos en el ARN guía que sufre emparejamiento de bases de Watson-Crick con el ADN diana (más 2 bases adicionales en la secuencia de PAM de NAG o

NGG en el caso de Cas9 de *S. pyogenes*). Tal secuencia tiene una longitud suficiente para ser única en el genoma humano, aunque la especificidad de la interacción de ARN/ADN no es absoluta, tolerándose a veces una promiscuidad significativa, particularmente en la mitad 5' de la secuencia diana, reduciendo eficazmente el número de bases que impulsan la especificidad. Una solución para esto ha sido desactivar completamente la función catalítica de Cas9 o Cpf1 - conservando únicamente la función de unión a ADN guiada por ARN - y, en su lugar, fusionando un dominio FokI a la Cas9 desactivada; véase, p. ej., Tsai *et al.*, *Nature Biotech.*, 2014, 32: 569-76; y Guilinger *et al.*, *Nature Biotech.*, 2014, 32: 577-82. Debido a que FokI ha de dimerizarse para volverse catalíticamente activa, se necesitan dos ARN guía para anclar las fusiones de FokI muy próximas para formar el dímero y escindir el ADN. Esto esencialmente duplica el número de bases en los sitios diana combinados, aumentando de este modo la rigurosidad del direccionamiento por los sistemas basados en CRISPR.

[00083] Como ejemplo adicional, la fusión del dominio de unión a ADN de TALE a una HE catalíticamente activa, tal como I-TevI, aprovecha tanto la unión a ADN ajustable y la especificidad de la TALE, así como la especificidad de secuencia de escisión de I-TevI, esperándose que pueda reducirse adicionalmente la escisión fuera de la diana.

Endonucleasas guiadas por ARN

[00084] Los sistemas de endonucleasas guiados por ARN como se usan en el presente documento pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 99% o el 100% de

identidad de secuencia de aminoácidos con una endonucleasa ilustrativa de tipo silvestre, p. ej., Cas9 de *S. pyogenes*, ID de secuencia n.º 8 del documento US2014/0068797 o Sapranasauskas *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 39 (21): 9275-9282 (2011). La endonucleasa puede comprender al menos el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 o 100% de identidad con una endonucleasa de tipo silvestre (p. ej., Cas9 de *S. pyogenes, supra*) sobre 10 aminoácidos contiguos. La endonucleasa puede comprender como máximo: el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 o 100% de identidad con una endonucleasa de tipo silvestre (p. ej., Cas9 de *S. pyogenes, supra*) sobre 10 aminoácidos contiguos. La endonucleasa puede comprender al menos: el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 o 100% de identidad con una endonucleasa de tipo silvestre (p. ej., Cas9 de *S. pyogenes, supra*) sobre 10 aminoácidos contiguos en un dominio nucleasa HNH de la endonucleasa. La endonucleasa puede comprender como máximo: el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 o 100% de identidad con una endonucleasa de tipo silvestre (p. ej., Cas9 de *S. pyogenes, supra*) sobre 10 aminoácidos contiguos en un dominio nucleasa HNH de la endonucleasa. La endonucleasa puede comprender al menos: el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 o 100% de identidad con una endonucleasa de tipo silvestre (p. ej., Cas9 de *S. pyogenes, supra*) sobre 10 aminoácidos contiguos en un dominio nucleasa RuvC de la endonucleasa. La endonucleasa puede comprender como máximo: el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 o 100% de identidad con una endonucleasa de tipo silvestre (p. ej., Cas9 de *S. pyogenes, supra*) sobre 10 aminoácidos contiguos en un dominio nucleasa RuvC de la endonucleasa.

[00085] La endonucleasa puede comprender una forma modificada de una endonucleasa ilustrativa de tipo silvestre. La forma modificada de la endonucleasa

ilustrativa de tipo silvestre puede comprender una mutación que reduzca la actividad de escisión de ácidos nucleicos de la endonucleasa. La forma modificada de la endonucleasa ilustrativa de tipo silvestre puede tener menos del 90%,
5 menos del 80%, menos del 70%, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5% o menos del 1% de la actividad de escisión de ácidos nucleicos de la endonucleasa ilustrativa de tipo silvestre (p. ej., Cas9 de *S. pyogenes*, *supra*). La forma
10 modificada de la endonucleasa no puede tener una actividad sustancial de escisión de ácidos nucleicos. Cuando una endonucleasa es una forma modificada que no tiene una actividad de escisión de ácidos nucleicos sustancial, se denomina en el presente documento "enzimáticamente
15 inactiva".

[00086] Las mutaciones contempladas pueden incluir sustituciones, adiciones y deleciones o cualquier combinación de las mismas. La mutación convierte el aminoácido mutado en alanina. La mutación convierte el
20 aminoácido mutado en otro aminoácido (p. ej., glicina, serina, treonina, cisteína, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, asparaginas, glutamina, histidina, lisina o arginina). La mutación convierte el
25 aminoácido mutado en un aminoácido no natural (p. ej., selenometionina). La mutación convierte el aminoácido mutado en miméticos de aminoácidos (p. ej., fosfomiméticos). La mutación puede ser una mutación conservativa. Por ejemplo, la mutación convierte el
30 aminoácido mutado en aminoácidos que se asemejan en tamaño, forma, carga, polaridad, conformación y/o rotámeros a los aminoácidos mutados (p. ej., mutación de cisteína/serina, mutación de lisina/asparagina, mutación de

histidina/fenilalanina). La mutación puede provocar un desplazamiento en el marco de lectura y/o la creación de un codón de parada prematuro. Las mutaciones pueden provocar cambios en regiones reguladoras de genes o locus que afectan a la expresión de uno o más genes.

ARN guía

[00087] La presente divulgación proporciona un ARN guía (ARNg) que puede dirigir las actividades de una endonucleasa asociada a un sitio diana específico dentro de un polinucleótido. Un ARN guía puede comprender al menos una secuencia espaciadora que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana de interés y una secuencia de repetición de CRISPR. En los sistemas CRISPR de tipo II, el ARNg también comprende un segundo ARN que se denomina la secuencia de ARNtracr. En el ARN guía de CRISPR de tipo II (ARNg), la secuencia de repetición de CRISPR y la secuencia de ARNtracr se hibridan entre sí para formar un dúplex. En los sistemas CRISPR de Tipo V, el ARNg comprende un ARNcr que forma un dúplex. En algunas realizaciones, un ARNg puede unirse a una endonucleasa, de modo que el ARNg y la endonucleasa formen un complejo. El ARNg puede proporcionar especificidad diana al complejo en virtud de su asociación con la endonucleasa. Por lo tanto, el ácido nucleico dirigido al genoma puede dirigir la actividad de la endonucleasa.

[00088] Los ARN guía ilustrativos incluyen secuencias espaciadoras que comprenden de 15 a 200 nucleótidos en las que el ARNg se dirige a una ubicación del genoma basándose en el ensamblaje del genoma humano GRCh38. Como entenderá el experto en la materia, cada ARNg puede diseñarse para incluir una secuencia espaciadora complementaria a su región o sitio genómico diana. Véase Jinek *et al.*, *Science*,

2012, 337, 816-821 y Deltcheva *et al.*, *Nature*, 2011, 471, 602-607.

[00089] El ARNg puede ser un ARN guía de doble molécula. El ARNg puede ser un ARN guía de una sola molécula.

5 **[00090]** Un ARN guía de molécula doble puede comprender dos cadenas de ARN. La primera cadena comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de extensión espaciadora opcional, una secuencia espaciadora y una secuencia de repetición de CRISPR mínima. La segunda cadena
10 puede comprender 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.

[00091] Un ARN guía de una sola molécula (ARNsg) puede
15 comprender, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de extensión espaciadora opcional, una secuencia espaciadora, una secuencia de repetición de CRISPR mínima, un enlazador de guía de una sola molécula, una secuencia de ARNtracr mínima, una secuencia de ARNtracr 3' y una secuencia de
20 extensión de ARNtracr opcional. La extensión de ARNtracr opcional puede comprender elementos que aportan una funcionalidad adicional (p. ej., estabilidad) al ARN guía. El enlazador guía de una sola molécula puede enlazar la repetición de CRISPR mínima y la secuencia de ARNtracr
25 mínima para formar una estructura en horquilla. La extensión de ARNtracr opcional puede comprender una o más horquillas.

[00092] En algunas realizaciones, un ARNsg comprende un espaciador de 20 nucleótidos en el extremo 5' de la
30 secuencia de ARNsg. En algunas realizaciones, un ARNsg comprende una secuencia espaciadora de menos de 20 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia de ARNsg. En algunas realizaciones, un ARNsg comprende una secuencia

espaciadora de más de 20 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia de ARNsg. En algunas realizaciones, un ARNsg comprende una secuencia espaciadora de longitud variable con 17-30 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia de ARNsg. En algunas realizaciones, un ARNsg comprende una secuencia de extensión espaciadora con una longitud de más de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, o 200 nucleótidos. En algunas realizaciones, un ARNsg comprende una secuencia de extensión espaciadora con una longitud de menos de 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 nucleótidos.

[00093] En algunas realizaciones, un ARNsg comprende una secuencia de extensión espaciadora que comprende otro resto (p. ej., una secuencia de control de la estabilidad, una secuencia de unión a endorribonucleasa, una ribozima). El resto puede disminuir o aumentar la estabilidad de un ácido nucleico dirigido a un ácido nucleico. El resto puede ser un segmento terminador de la transcripción (es decir, una secuencia de terminación de la transcripción). El resto puede funcionar en una célula eucariota. El resto puede funcionar en una célula procariota. El resto puede funcionar tanto en células eucariotas como procariotas. Los ejemplos no limitantes de restos adecuados incluyen: una caperuza 5' (p. ej., una caperuza de 7-metilguanilato (m7G)), una secuencia de ribointerruptor (p. ej., para permitir una estabilidad regulada y/o una accesibilidad regulada por proteínas y complejos de proteínas), una secuencia que forma un dúplex de ARNbc (es decir, una horquilla), una secuencia que dirige el ARN a una ubicación subcelular (p. ej., núcleo, mitocondria, cloroplastos y similares), una modificación o secuencia que posibilita el seguimiento (p. ej., la conjugación directa a una molécula

fluorescente, conjugación a un resto que facilita la detección fluorescente, una secuencia que posibilita la detección fluorescente, etc.) y/o una modificación o secuencia que proporciona un sitio de unión para proteínas (p. ej., proteínas que actúan sobre el ADN, incluyendo activadores de la transcripción, represores de la transcripción, ADN metiltransferasas, ADN desmetilasas, histona acetiltransferasas, histona desacetilasas y similares).

5 [00094] En algunas realizaciones, un ARNsg comprende una secuencia espaciadora que se hibrida con una secuencia en un polinucleótido diana. El espaciador de un ARNg puede interactuar con un polinucleótido diana de una manera específica de secuencia mediante hibridación (es decir, 15 emparejamiento de bases). La secuencia de nucleótidos del espaciador puede variar dependiendo de la secuencia del ácido nucleico diana de interés.

[00095] En un sistema de endonucleasa CRISPR, se puede diseñar una secuencia espaciadora para hibridarse con un 20 polinucleótido diana que se ubica en 5' de un PAM de la endonucleasa utilizada en el sistema. El espaciador puede emparejarse perfectamente con la secuencia diana o puede tener emparejamientos erróneos. Cada endonucleasa, p. ej., la nucleasa Cas9, tiene una secuencia PAM particular que 25 reconoce en un ADN diana. Por ejemplo, Cas9 de *S. pyogenes* reconoce un PAM que comprende la secuencia 5'-NRG-3', donde R comprende bien A o G, donde N es cualquier nucleótido y N se encuentra inmediatamente 3' de la secuencia de ácido nucleico diana utilizada como diana por la secuencia 30 espaciadora.

[00096] Una secuencia de polinucleótidos diana puede comprender 20 nucleótidos. El polinucleótido diana puede comprender menos de 20 nucleótidos. El polinucleótido diana

puede comprender más de 20 nucleótidos. El polinucleótido diana puede comprender al menos: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 o más nucleótidos. El polinucleótido diana puede comprender como máximo: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 o más nucleótidos. La secuencia de polinucleótidos diana puede comprender 20 bases en inmediatamente 5' del primer nucleótido del PAM.

[00097] Una secuencia espaciadora que se hibrida con un polinucleótido diana puede tener una longitud de al menos aproximadamente 6 nucleótidos (nt). La secuencia espaciadora puede tener al menos aproximadamente 6 nt, al menos aproximadamente 10 nt, al menos aproximadamente 15 nt, al menos aproximadamente 18 nt, al menos aproximadamente 19 nt, al menos aproximadamente 20 nt, al menos aproximadamente 25 nt, al menos aproximadamente 30 nt, al menos aproximadamente 35 nt o al menos aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 6 nt a aproximadamente 80 nt, de aproximadamente 6 nt a aproximadamente 50 nt, de aproximadamente 6 nt a aproximadamente 45 nt, de aproximadamente 6 nt a aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 6 nt a aproximadamente 35 nt, de aproximadamente 6 nt a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 6 nt a aproximadamente 25 nt, de aproximadamente 6 nt a aproximadamente 20 nt, de aproximadamente 6 nt a aproximadamente 19 nt, de aproximadamente 10 nt a aproximadamente 50 nt, de aproximadamente 10 nt a aproximadamente 45 nt, de aproximadamente 10 nt a aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 10 nt a aproximadamente 35 nt, de aproximadamente 10 nt a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 10 nt a aproximadamente 25 nt, de aproximadamente 10 nt a

aproximadamente 20 nt, de aproximadamente 10 nt a
aproximadamente 19 nt, de aproximadamente 19 nt a
aproximadamente 25 nt, de aproximadamente 19 nt a
aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 19 nt a
5 aproximadamente 35 nt, de aproximadamente 19 nt a
aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 19 nt a
aproximadamente 45 nt, de aproximadamente 19 nt a
aproximadamente 50 nt, de aproximadamente 19 nt a
aproximadamente 60 nt, de aproximadamente 20 nt a
10 aproximadamente 25 nt, de aproximadamente 20 nt a
aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 20 nt a
aproximadamente 35 nt, de aproximadamente 20 nt a
aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 20 nt a
aproximadamente 45 nt, de aproximadamente 20 nt a
15 aproximadamente 50 nt o de aproximadamente 20 nt a
aproximadamente 60 nt. En algunos ejemplos, la secuencia
espaciadora puede comprender 20 nucleótidos. En algunos
ejemplos, el espaciador puede comprender 19 nucleótidos. En
algunos ejemplos, el espaciador puede comprender
20 18 nucleótidos. En algunos ejemplos, el espaciador puede
comprender 22 nucleótidos.

[00098] En algunos ejemplos, el porcentaje de
complementariedad entre la secuencia espaciadora y el ácido
nucleico diana es de al menos aproximadamente el 30%, al
25 menos aproximadamente el 40%, al menos aproximadamente el
50%, al menos aproximadamente el 60%, al menos
aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al
menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el
80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos
30 aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, al
menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el
98%, al menos aproximadamente el 99% o del 100%. En algunos
ejemplos, el porcentaje de complementariedad entre la

secuencia espaciadora y el ácido nucleico diana es como máximo de aproximadamente el 30%, como máximo de aproximadamente el 40%, como máximo de aproximadamente el 50%, como máximo de aproximadamente el 60%, como máximo de aproximadamente el 65%, como máximo de aproximadamente el 70%, como máximo de aproximadamente el 75%, como máximo de aproximadamente el 80%, como máximo de aproximadamente el 85%, como máximo de aproximadamente el 90%, como máximo de aproximadamente el 95%, como máximo de aproximadamente el 97%, como máximo de aproximadamente el 98%, como máximo de aproximadamente el 99% o del 100%. En algunos ejemplos, el porcentaje de complementariedad entre la secuencia espaciadora y el ácido nucleico diana es del 100% a lo largo de los seis nucleótidos contiguos más próximos al extremo 5' de la secuencia diana de la cadena complementaria del ácido nucleico diana. El porcentaje de complementariedad entre la secuencia espaciadora y el ácido nucleico diana puede ser de al menos el 60 % a lo largo de aproximadamente 20 nucleótidos contiguos. La longitud de la secuencia espaciadora y el ácido nucleico diana puede diferir en de 1 a 6 nucleótidos, lo que puede considerarse como una protuberancia o protuberancias.

[00099] Una secuencia de ARNtracr puede comprender nucleótidos que se hibridan con una secuencia de repetición CRISPR mínima en una célula. Una secuencia de ARNtracr mínima y una secuencia de repetición de CRISPR mínima pueden formar un dúplex, es decir, una estructura bicatenaria de bases emparejadas. Juntas, la secuencia de ARNtracr mínima y la repetición de CRISPR mínima pueden unirse a una endonucleasa guiada por ARN. Al menos una parte de la secuencia de ARNtracr mínima puede hibridarse con la secuencia de repetición CRISPR mínima. La secuencia de ARNtracr mínima puede ser al menos aproximadamente el

30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%,
aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%,
aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%,
aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%,
5 aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o el 100%
complementaria a la secuencia de repetición CRISPR mínima.
[000100] La secuencia de ARNtracr mínima puede tener una
longitud de aproximadamente 7 nucleótidos a aproximadamente
100 nucleótidos. Por ejemplo, la secuencia de ARNtracr
10 mínima puede tener de aproximadamente 7 nucleótidos (nt) a
aproximadamente 50 nt, de aproximadamente 7 nt a
aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 7 nt a
aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 7 nt a
aproximadamente 25 nt, de aproximadamente 7 nt a
15 aproximadamente 20 nt, de aproximadamente 7 nt a
aproximadamente 15 nt, de aproximadamente 8 nt a
aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 8 nt a
aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 8 nt a
aproximadamente 25 nt, de aproximadamente 8 nt a
20 aproximadamente 20 nt, de aproximadamente 8 nt a
aproximadamente 15 nt, de aproximadamente 15 nt a
aproximadamente 100 nt, de aproximadamente 15 nt a
aproximadamente 80 nt, de aproximadamente 15 nt a
aproximadamente 50 nt, de aproximadamente 15 nt a
25 aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 15 nt a
aproximadamente 30 nt o de aproximadamente 15 nt a
aproximadamente 25 nt de longitud. La secuencia de ARNtracr
mínima puede tener aproximadamente 9 nucleótidos de
longitud. La secuencia de ARNtracr mínima puede tener
30 aproximadamente 12 nucleótidos. El ARNtracr mínimo puede
consistir en nt 23-48 de ARNtracr descrito en Jinek *et al.*,
Supra.

- [000101] La secuencia de ARNtracr mínima puede ser al menos aproximadamente el 60 % idéntica a una secuencia de ARNtracr mínima de referencia (p. ej., ARNtracr de tipo silvestre de *S. pyogenes*) a lo largo de un tramo de al menos 6, 7 u 8 nucleótidos contiguos. Por ejemplo, la secuencia de ARNtracr mínima puede ser al menos aproximadamente el 65% idéntica, aproximadamente el 70% idéntica, aproximadamente el 75% idéntica, aproximadamente el 80% idéntica, aproximadamente el 85% idéntica, aproximadamente el 90% idéntica, aproximadamente el 95% idéntica, aproximadamente el 98% idéntica, aproximadamente el 99% idéntica o el 100% idéntica a una secuencia de ARNtracr mínima de referencia a lo largo de un tramo de al menos 6, 7 u 8 nucleótidos contiguos.
- [000102] El dúplex entre el ARN de CRISPR mínimo y el ARNtracr mínimo puede comprender una doble hélice. El dúplex entre el ARN de CRISPR mínimo y el ARNtracr mínimo puede comprender al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o más nucleótidos. El dúplex entre el ARN de CRISPR mínimo y el ARNtracr mínimo puede comprender como máximo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o más nucleótidos.
- [000103] El dúplex puede comprender un emparejamiento erróneo (es decir, las dos cadenas del dúplex no son 100% complementarias). El dúplex puede comprender al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 emparejamientos erróneos. El dúplex puede comprender como máximo aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 emparejamientos erróneos. El dúplex no puede contener más de 2 emparejamientos erróneos.
- [000104] En algunas realizaciones, un ARNtracr puede ser un ARNtracr 3'. En algunas realizaciones, una secuencia de ARNtracr 3' puede comprender una secuencia con al menos aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%,

aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%,
aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%,
aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%,
aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%,
5 aproximadamente el 95% o el 100% de identidad de secuencia
con una secuencia de ARNtracr de referencia (p. ej., un
ARNtracr de *S. pyogenes*).

[000105] En algunas realizaciones, un ARNg puede
comprender una secuencia de extensión de ARNtracr. Una
10 secuencia de extensión de ARNtracr puede tener una longitud
de aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente
400 nucleótidos. La secuencia de extensión del ARNtracr
puede tener una longitud de más de 1, 5, 10, 15, 20, 25,
30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160,
15 180, o 200 nucleótidos. La secuencia de extensión del
ARNtracr puede tener una longitud de aproximadamente 20 a
aproximadamente 5000 o más nucleótidos. La secuencia de
extensión del ARNtracr puede tener una longitud de menos de
5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o
20 100 nucleótidos. La secuencia de extensión del ARNtracr
puede comprender menos de 10 nucleótidos de longitud. La
secuencia de extensión del ARNtracr puede tener una
longitud de 10-30 nucleótidos. La secuencia de extensión
del ARNtracr puede tener una longitud de 30-70 nucleótidos.
25 **[000106]** La secuencia de extensión del ARNtracr puede
comprender un resto funcional (p. ej., una secuencia de
control de la estabilidad, ribozima, secuencia de unión a
endorribonucleasa). El resto funcional puede comprender un
segmento terminador de la transcripción (es decir, una
30 secuencia de terminación de la transcripción). El resto
funcional puede tener una longitud total de aproximadamente
10 nucleótidos (nt) a aproximadamente 100 nucleótidos, de
aproximadamente 10 nt a aproximadamente 20 nt, de

aproximadamente 20 nt a aproximadamente 30 nt, de
aproximadamente 30 nt a aproximadamente 40 nt, de
aproximadamente 40 nt a aproximadamente 50 nt, de
aproximadamente 50 nt a aproximadamente 60 nt, de
5 aproximadamente 60 nt a aproximadamente 70 nt, de
aproximadamente 70 nt a aproximadamente 80 nt, de
aproximadamente 80 nt a aproximadamente 90 nt o de
aproximadamente 90 nt a aproximadamente 100 nt, de
aproximadamente 15 nt a aproximadamente 80 nt, de
10 aproximadamente 15 nt a aproximadamente 50 nt, de
aproximadamente 15 nt a aproximadamente 40 nt, de
aproximadamente 15 nt a aproximadamente 30 nt o de
aproximadamente 15 nt a aproximadamente 25 nt.

[000107] En algunas realizaciones, un ARNsg puede
15 comprender una secuencia enlazadora con una longitud de
aproximadamente 3 nucleótidos a aproximadamente
100 nucleótidos. En Jinek *et al.*, *supra*, por ejemplo, se
usó un "tetrabucle" sencillo de 4 nucleótidos (-GAAA-),
(Jinek *et al.*, *Science*, 2012, 337(6096):816-821). Un
20 enlazador ilustrativo tiene una longitud de aproximadamente
3 nucleótidos (nt) a aproximadamente 90 nt, de
aproximadamente 3 nt a aproximadamente 80 nt, de
aproximadamente 3 nt a aproximadamente 70 nt, de
aproximadamente 3 nt a aproximadamente 60 nt, de
25 aproximadamente 3 nt a aproximadamente 50 nt, de
aproximadamente 3 nt a aproximadamente 40 nt, de
aproximadamente 3 nt a aproximadamente 30 nt, de
aproximadamente 3 nt a aproximadamente 20 nt, de
aproximadamente 3 nt a aproximadamente 10 nt. Por ejemplo,
30 el enlazador puede tener una longitud de aproximadamente
3 nt a aproximadamente 5 nt, de aproximadamente 5 nt a
aproximadamente 10 nt, de aproximadamente 10 nt a
aproximadamente 15 nt, de aproximadamente 15 nt a

- aproximadamente 20 nt, de aproximadamente 20 nt a
aproximadamente 25 nt, de aproximadamente 25 nt a
aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 30 nt a
aproximadamente 35 nt, de aproximadamente 35 nt a
5 aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 40 nt a
aproximadamente 50 nt, de aproximadamente 50 nt a
aproximadamente 60 nt, de aproximadamente 60 nt a
aproximadamente 70 nt, de aproximadamente 70 nt a
aproximadamente 80 nt, de aproximadamente 80 nt a
10 aproximadamente 90 nt o de aproximadamente 90 nt a
aproximadamente 100 nt. El enlazador de un ácido nucleico
guía de una sola molécula puede tener entre 4 y
40 nucleótidos. El enlazador puede tener al menos
aproximadamente 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000,
15 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, o 7000 o más
nucleótidos. El enlazador puede tener como máximo
aproximadamente 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000,
3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, o 7000 o más
nucleótidos.
- 20 **[000108]** Los enlazadores pueden comprender cualquiera de
una variedad de secuencias, aunque en algunos ejemplos, el
enlazador no comprenderá secuencias que tengan regiones de
homología extensas con otras partes del ARN guía, que
podrían provocar una unión intramolecular que podría
25 interferir con otras regiones funcionales de la guía. En
Jinek *et al.*, *supra*, se usó una secuencia sencilla de
4 nucleótidos -GAAA- (Jinek *et al.*, *Science*, 2012,
337(6096):816-821), pero pueden usarse igualmente numerosas
secuencias distintas, incluyendo secuencias más largas.
- 30 **[000109]** La secuencia enlazadora puede comprender un resto
funcional. Por ejemplo, la secuencia enlazadora puede
comprender una o más características, incluyendo un
aptámero, una ribozima, una horquilla que interactúa con

proteínas, un sitio de unión a proteínas, una serie de CRISPR, un intrón o un exón. La secuencia enlazadora puede comprender al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5, o más restos funcionales. En algunos ejemplos, la secuencia enlazadora puede comprender como máximo aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5, o más restos funcionales.

[000110] En algunas realizaciones, un ARNsg no comprende un uracilo, p. ej., en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. En algunas realizaciones, un ARNsg comprende uno o más uracilos, p. ej., en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg. En algunas realizaciones, un ARNsg comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 uracilos (U) en el extremo 3' de la secuencia de ARNsg.

[000111] Un ARNsg puede modificarse químicamente. En algunas realizaciones, un ARNg modificado químicamente es un ARNg que comprende al menos un nucleótido con una modificación química, p. ej., una modificación de 2'-O-metil-azúcar. En algunas realizaciones, un ARNg modificado químicamente comprende una cadena principal de ácido nucleico modificado. En algunas realizaciones, un ARNg modificado químicamente comprende un resto de 2'-O-metil-fosforotioato. En algunas realizaciones, las modificaciones químicas potencian la estabilidad, reducen la probabilidad o el grado de respuesta inmunitaria innata y/o potencian otros atributos, como se describe en la técnica.

[000112] En algunas realizaciones, un ARNg modificado puede comprender una cadena principal modificada, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, morfolinos, metilfosfonatos, enlaces interazúcares alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces interazúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta.

[000113] Se describen compuestos a base de morfolino en Braasch y David Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14): 4503-

4510; *Genesis*, 2001, Volumen 30, Edición 3; *Heasman, Dev. Biol.*, 2002, 243: 209-214; Nasevicius *et al.*, *Nat. Genet.*, 2000, 26:216-220; Lacerra *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97: 9591-9596.; y la patente de EE.UU. n.º 5 034 506, concedida el 23 de julio de 1991.

[000114] Se describen miméticos de oligonucleótidos de ácido nucleico de ciclohexenilo en Wang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122: 8595-8602.

[000115] En algunas realizaciones, un ARNg modificado puede comprender uno o más restos de azúcar sustituidos, p. ej., uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂, o O(CH₂)_n CH₃, donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior C1 a C10, alcoxialcoxi, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo indicador; un intercalador; 2'-O-(2-metoxietilo); 2'-metoxi (2'-O-CH₃); 2'-propoxi (2'-OCH₂ CH₂CH₃); y 2'-fluoro (2'-F). También pueden efectuarse modificaciones similares en otras posiciones en el ARNg, en particular la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. En algunos ejemplos, se pueden reemplazar tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, la cadena principal, de las unidades de nucleótido con nuevos grupos.

[000116] Los ARN guía también pueden incluir, además o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (normalmente citadas en la técnica simplemente como "base"). Como se usa en el presente documento, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen adenina

(A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen las nucleobases halladas únicamente de manera infrecuente o transitoria en ácidos nucleicos naturales, p. ej., hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, en particular, 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y normalmente denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glucosil-HMC y gentobiosil-HMC, así como nucleobases sintéticas, p. ej., 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazoalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-desazaguanina, N6 (6-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina. Kornberg, A., "DNA Replication", W. H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 75-77, 1980; Gebeyehu *et al.*, Nucl. *Acids Res.* 1997, 15:4513. También puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, p. ej., inosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-Me-C aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0.6-1.2°C. (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., "Antisense Research and Applications", CRC Press, Boca Ratón, 1993, pág. 276-278) y son aspectos de sustituciones de bases.

[000117] Las nucleobases modificadas pueden comprender otras nucleobases sintéticas y naturales, tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-

tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, en particular 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina.

Complejos de un ácido nucleico dirigido al genoma y una endonucleasa

[000118] Un ARNg interactúa con una endonucleasa (p. ej., una nucleasa guiada por ARN tal como Cas9), formando así un complejo. El ARNg guía a la endonucleasa hacia un polinucleótido diana.

[000119] La endonucleasa y el ARNg pueden administrarse cada uno por separado a una célula o un sujeto. En algunas realizaciones, la endonucleasa se puede complejar previamente con uno o más ARN guía, o uno o más ARNcr junto con un ARNtracr. El material previamente complejoado puede administrarse posteriormente a una célula o un sujeto. Dicho material previamente complejoado se conoce como una partícula de ribonucleoproteína (RNP, ***RiboNucleoprotein Particle***). La endonucleasa de la RNP puede ser, por ejemplo, una endonucleasa Cas9 o una endonucleasa Cpf1. La endonucleasa puede estar flanqueada en el extremo N, el extremo C, o tanto en el extremo N como en el extremo C por una o más señales de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, una endonucleasa Cas9 puede estar flanqueada por dos NLS, una NLS ubicada en el extremo N y la segunda NLS ubicada en el extremo C. La NLS puede ser cualquier NLS conocida en la técnica, tal como una NLS de SV40. La proporción en peso entre el ácido nucleico dirigido al genoma y la endonucleasa en la RNP puede ser de 1:1. Por ejemplo, la proporción en peso del ARNsg con respecto a la endonucleasa Cas9 en la RNP puede ser de 1:1.

Ácidos nucleicos que codifican componentes de sistema

- [000120]** La presente divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un ácido nucleico dirigido al genoma de la divulgación, una endonucleasa de la divulgación y/o cualquier ácido nucleico o molécula proteica necesario para llevar a cabo los aspectos de los métodos de la divulgación. Los ácidos nucleicos codificantes pueden ser ARN, ADN o una combinación de los mismos.
- 10 **[000121]** El ácido nucleico que codifica un ácido nucleico dirigido al genoma de la divulgación, una endonucleasa de la divulgación y/o cualquier ácido nucleico o molécula proteica necesaria para llevar a cabo los aspectos de los métodos de la divulgación puede comprender un vector (p. ej., un vector de expresión recombinante).
- 15 **[000122]** El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en donde pueden ligarse segmentos de ácido nucleico adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ácido nucleico adicionales en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula
- 20 hospedadora en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (p. ej., vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y de este modo, se replican junto con el
- 30 **[000123]** En algunos ejemplos, los vectores pueden ser capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los

que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" o de un modo más simple, "vectores de expresión", que cumplen funciones equivalentes.

5 **[000124]** La expresión "unida operativamente" significa que la secuencia de nucleótido de interés está unida a secuencias reguladoras de un modo que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir, p. ej., promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se conocen bien en la técnica y se describen, p. ej., en Goeddel; "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology", 1990, 185, Academic Press, San Diego, CA. Las

10 secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos únicamente en determinadas células hospedadoras (p. ej., secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula diana, el nivel de expresión deseado y similares.

[000125] Los vectores de expresión contemplados incluyen, pero sin limitación, vectores víricos basados en virus vaccinia, poliovirus, adenovirus, virus adenoasociado, SV40, virus del herpes simple, virus de la inmunodeficiencia humana, retrovirus (p. ej., virus de la leucemia murina, virus de la necrosis del bazo y vectores

25 procedentes de retrovirus, tales como el virus del sarcoma de Rous, el virus del sarcoma de Harvey, el virus de la leucosis aviar, un lentivirus, virus de la inmunodeficiencia humana, virus del sarcoma

30

mieloproliferativo y virus de tumor mamario) y otros vectores recombinantes. Otros vectores contemplados para las células diana eucariotas incluyen, pero sin limitación, los vectores pXT1, pSG5, pSVK3, pBPV, pMSG y pSVLSV40 (Pharmacia). Se pueden utilizar otros vectores, en tanto que sean compatibles con la célula hospedadora.

[000126] En algunos ejemplos, un vector puede comprender uno o más elementos de control de la transcripción y/o traducción. Dependiendo del sistema de hospedador/vector utilizado, se puede utilizar cualquiera de una serie de elementos de control de la transcripción y la traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. en el vector de expresión. El vector puede ser un vector auto-inactivante que inactive las secuencias víricas o los componentes de la maquinaria de CRISPR u otros elementos.

[000127] Los ejemplos no limitantes de promotores eucariotas adecuados (es decir, promotores funcionales en una célula eucariota) incluyen los de citomegalovirus (CMV) inmediato temprano, timidina quinasa del virus del herpes simple (VHS), SV40 temprano y tardío, repeticiones terminales largas (LTR, *Long Terminal Repeats*) de retrovirus, promotor del factor de elongación humano-1 (EF1, *Elongation Factor-1*), promotor de beta-actina de pollo (CBA, *Chicken Beta-Actin*), promotor de ubiquitina C (UBC), una construcción híbrida que comprende el potenciador de citomegalovirus fusionado con el promotor de beta-actina de pollo (CAG), una construcción híbrida que comprende el potenciador del citomegalovirus fusionado con el promotor, el primer exón y el primer intrón del gen de la beta-actina de pollo (CAG o CAGGS), el promotor del virus de células madre murinas (MSCV, *Murine Stem Cell*

Virus), el promotor del locus fosfoglicerato quinasa-1 (PGK, *PhosphoGlycerate Kinase*) y el promotor de la metalotioneína de ratón I.

[000128] Un promotor puede ser un promotor inducible (p. ej., un promotor de choque térmico, promotor regulado por tetraciclina, promotor regulado por esteroides, promotor regulado por metales, promotor regulado por estrógenos, etc.). El promotor puede ser un promotor constitutivo (p. ej., promotor de CMV, promotor de UBC, promotor de CAG). En algunos casos, el promotor puede ser un promotor espacialmente restringido y/o temporalmente restringido (p. ej., un promotor específico del tejido, un promotor específico del tipo de célula, etc.).

[000129] La introducción de los complejos, polipéptidos y ácidos nucleicos de la divulgación en células puede producirse mediante infección vírica o por bacteriófago, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, lipofección, electroporación, nucleofección, precipitación por fosfato de calcio, transfección mediada por polietilenimina (PEI), transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por liposomas, tecnología de cañón de partículas, precipitación por fosfato de calcio, microinyección directa, administración de ácido nucleico mediada por nanopartículas y similares.

25 **III. Estrategias para evadir la respuesta inmunitaria y aumentar la supervivencia**

[000130] En el presente documento, se describen estrategias para permitir que las células modificadas genéticamente, es decir, las células donantes universales, eviten la respuesta inmunitaria y/o aumenten su supervivencia o viabilidad después del injerto en un sujeto. En algunas realizaciones, estas estrategias permiten que las células donantes universales eviten la

respuesta inmunitaria y/o sobrevivan con tasas de éxito superiores a las de una célula no modificada. En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente comprenden la introducción de al menos una modificación genética dentro o cerca de al menos un gen que disminuye la expresión de uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II en relación con una célula no modificada; al menos una modificación genética que aumenta la expresión de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en relación con una célula no modificada; y/o al menos una modificación genética que altera la expresión de al menos un gen que codifica un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada. En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente comprenden la introducción de al menos una modificación genética dentro o cerca de al menos un gen que disminuye la expresión de uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II en relación con una célula no modificada; al menos una modificación genética que aumenta la expresión de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en relación con una célula no modificada; y al menos una modificación genética que altera la expresión de al menos un gen que codifica un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada. En otras realizaciones, las células modificadas genéticamente comprenden al menos una mutación por delección o inserción-delección dentro o cerca de al menos un gen que altera la expresión de uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II en relación con una célula no modificada; y al menos una inserción de un polinucleótido que codifica al menos un factor tolerogénico en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de una delección de un gen que

altera la expresión de uno o más HLA MHC-I y MHC-II. En otras realizaciones más, las células modificadas genéticamente comprenden al menos una modificación genética que altera la expresión de al menos un gen que codifica un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada.

[000131] Los genes que codifican el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se encuentran en el cromosoma humano 6p21. Las proteínas resultantes codificadas por los genes MHC son una serie de proteínas de superficie que son esenciales para la compatibilidad del donante durante el trasplante celular. Los genes MHC se dividen en MHC de clase I (MHC-I) y MHC de clase II (MHC-II). Los genes MHC-I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) se expresan en casi todos los tipos de células tisulares, presentando péptidos procesados con antígenos "no propios" a los linfocitos T CD8+, potenciando así su activación en los linfocitos T CD8+ citolíticos. Las células trasplantadas o injertadas que expresan moléculas MHC-I "no propias" provocarán una potente respuesta inmunitaria celular dirigida a estas células y, en última instancia, producirán su desaparición por medio de los linfocitos T CD8+ citolíticos activados. Las proteínas MHC-I están íntimamente asociadas con la beta-2-microglobulina (B2M) en el retículo endoplásmico, que es esencial para formar moléculas MHC-I funcionales en la superficie celular. Además, hay tres moléculas MHC-Ib no clásicas (HLA-E, HLA-F y HLA-G), que tienen funciones de regulación inmunitaria. Las biomoléculas MHC-II incluyen HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ y HLA-DR. Debido a su función principal en la respuesta inmunitaria, las biomoléculas MHC-I y MHC-II contribuyen al rechazo inmunitario después del injerto celular de células no hospedadoras, p. ej., injerto celular con fines de medicina regenerativa.

[000132] Las moléculas de superficie celular MHC-I están compuestas por cadenas pesadas codificadas por MHC (HLA-A, HLA-B o HLA-C) y la subunidad invariante beta-2-microglobulina (B2M). Por tanto, una reducción en la

5 concentración de B2M dentro de una célula permite un método eficaz para reducir la expresión en la superficie celular de las moléculas de la superficie celular MHC-I.

[000133] En algunas realizaciones, una célula comprende una modificación genómica de uno o más genes MHC-I o MHC-

10 II. En algunas realizaciones, una célula comprende una modificación genómica de una o más secuencias de polinucleótidos que regulan la expresión de MHC-I y/o MHC-II. En algunas realizaciones, una modificación genética de la divulgación se realiza utilizando cualquier método de

15 edición de genes, incluyendo, pero sin limitación, los métodos descritos en el presente documento.

[000134] En algunas realizaciones, la disminución de la expresión de uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II en relación con una célula no modificada se

20 logra mediante la manipulación dirigida, p. ej., para la delección y/o inserción genética de al menos un par de bases, en un gen MHC-I y/o gen MHC-II directamente. En algunas realizaciones, la disminución de la expresión de uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II en

25 relación con una célula no modificada se logra mediante la manipulación dirigida, p. ej., para la delección genética, de un gen CIITA. En algunas realizaciones, la disminución de la expresión de uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II en relación con una célula no

30 modificada se logra mediante la manipulación dirigida, p. ej., para la delección genética, de al menos un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II. En algunas realizaciones, un regulador de la transcripción de MHC-I o

MHC-II es un gen NLRC5 o CIITA. En algunas realizaciones, un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II es un gen RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C, IRF-1 y/o TAP1.

5 **[000135]** En algunas realizaciones, el genoma de una célula se ha modificado para delecionar la totalidad o una parte de un gen HLA-A, HLA-B y/o HLA-C. En algunas realizaciones, el genoma de una célula se ha modificado para delecionar la totalidad o una parte de una región promotora de un gen
10 HLA-A, HLA-B y/o HLA-C. En algunas realizaciones, el genoma de una célula se ha modificado para delecionar la totalidad o una parte de un gen que codifica un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II. En algunas realizaciones, el genoma de una célula se ha modificado para delecionar la
15 totalidad o una parte de una región promotora de un gen que codifica un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II.

[000136] En algunas realizaciones, el genoma de una célula se ha modificado para disminuir la expresión de beta-2-
20 microglobulina (B2M). B2M es un gen no polimórfico que codifica una subunidad de proteína común necesaria para la expresión superficial de todas las cadenas pesadas polimórficas del MHC de clase I. Las proteínas HLA-I están íntimamente asociadas con B2M en el retículo endoplásmico,
25 que es esencial para formar moléculas HLA-I funcionales expresadas en la superficie celular. En algunas realizaciones, el ARNg se dirige a un sitio dentro del gen B2M que comprende una secuencia 5' GCTACTCTCTCTTTCTGGCC 3' (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el ARNg se dirige
30 a un sitio dentro del gen B2M que comprende una secuencia 5' GGCCGAGATGTCTCGCTCCG 3' (SEQ ID NO: 2). En algunas realizaciones, el ARNg se dirige a un sitio dentro del gen B2M que comprende una secuencia 5' CGCGAGCACAGCTAAGGCCA 3'

(SEQ ID NO: 3). En realizaciones alternativas, el ARNg se dirige a un sitio dentro del gen B2M que comprende cualquiera de las siguientes secuencias: 5'-

TATAAGTGGAGGCGTCGCGC-3' (SEQ ID NO: 35), 5'-

5 GAGTAGCGCGAGCACAGCTA-3' (SEQ ID NO: 36), 5'-

ACTGGACGCGTCGCGCTGGC-3' (SEQ ID NO: 37), 5'-

AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG-3' (SEQ ID NO: 38), 5'-

GGCCACGGAGCGAGACATCT -3' (SEQ ID NO: 39), 5'-

GCCCGAATGCTGTCAGCTTC-3' (SEQ ID NO: 40). 5'-

10 CTCGCGCTACTCTCTCTTTC-3' (SEQ ID NO: 41), 5'-

TCCTGAAGCTGACAGCATTC-3' (SEQ ID NO: 42), 5'-

TTCCTGAAGCTGACAGCATT-3' (SEQ ID NO: 43), o 5'-

ACTCTCTCTTTCTGGCCTGG-3' (SEQ ID NO: 44). En algunas realizaciones, el ARNg comprende una secuencia

15 polinucleotídica de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, o SEQ ID NO: 44. El complejo de ARNg/nucleasa CRISPR se dirige y escinde un

20 sitio diana en el locus B2M. La reparación de una ruptura bicatenaria mediante NHEJ puede producir una delección de al menos un nucleótido y/o una inserción de al menos un nucleótido, interrumpiendo o eliminando así la expresión de B2M. Como alternativa, el locus de B2M puede ser dirigido

25 por al menos dos sistemas CRISPR que comprenden cada uno un ARNg diferente, de modo que la escisión en dos sitios en el locus de B2M conduce a una delección de la secuencia entre los dos cortes, eliminando así la expresión de B2M.

[000137] En algunas realizaciones, el genoma de una célula

30 se ha modificado para disminuir la expresión del transactivador de Clase II (CIITA). CIITA es un miembro de la familia de proteínas de repetición rica en leucina (LRR, *Leucine-Rich Repeat*) LR o de dominio de unión de

nucleótidos (NBD, *Nucleotide Binding Domain*) y regula la transcripción de MHC-II al asociarse con el potencialesoma de MHC. La expresión de CIITA se induce en los linfocitos B y las células dendríticas en función de la etapa de desarrollo y es inducible por IFN- γ en la mayoría de los tipos de células.

[000138] En algunas realizaciones, el genoma de una célula se ha modificado para disminuir la expresión del dominio CARD de la familia NLR que contiene 5 (NLRC5, *NLR family, CARD domain containing 5*). El NLRC5 es un regulador crítico de las respuestas inmunitarias mediadas por MHC-I y, al igual que CIITA, NLRC5 es altamente inducible por IFN- γ y puede translocalizarse al núcleo. El NLRC5 activa los promotores de genes MHC-I e induce la transcripción de MHC-I, así como genes relacionados que participan en la presentación del antígeno MHC-I.

[000139] En algunas realizaciones, se pueden insertar o reinsertar factores tolerogénicos en células modificadas genéticamente para crear células donantes universales con privilegios inmunitarios. En algunas realizaciones, las células donantes universales descritas en el presente documento se han modificado adicionalmente para expresar uno o más factores tolerogénicos. Los factores tolerogénicos ilustrativos incluyen, sin limitación, uno o más de HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CD47, inhibidor de CI e IL-35. En algunas realizaciones, la modificación genética, p. ej., la inserción, de al menos un polinucleótido que codifica al menos un factor tolerogénico permite a una célula donante universal inhibir o evadir el rechazo inmunitario con tasas de al menos 1.05, al menos 1.1, al menos 1.25, al menos 1.5, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20 o al menos 50 veces superiores a las de una célula no modificada

después del injerto. En algunas realizaciones, una inserción de un polinucleótido que codifica HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 y/o PD-L1 permite que una célula donante universal inhiba o evite el rechazo inmunitario después del trasplante o injerto en un sujeto hospedador.

[000140] El polinucleótido que codifica el factor tolerogénico generalmente comprende brazos de homología izquierdo y derecho que flanquean la secuencia que codifica el factor tolerogénico. Los brazos de homología tienen una homología de secuencia sustancial con el ADN genómico en o cerca del sitio de inserción diana. Por ejemplo, el brazo de homología izquierdo puede ser una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la izquierda o en dirección 5' del sitio diana o del sitio de corte, y el brazo de homología derecho puede ser una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha o en dirección 3' del sitio diana o el sitio de corte. El extremo proximal de cada brazo de homología puede ser homólogo a la secuencia de ADN genómico que linda con el sitio de corte. Como alternativa, el extremo proximal de cada brazo de homología puede ser homólogo a la secuencia de ADN genómico ubicada hasta aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60 o 70 nucleobases lejos del sitio de corte. Como tal, el polinucleótido que codifica el factor tolerogénico se puede insertar en el locus del gen diana dentro de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60 o 70 pares de bases del sitio de corte, y el ADN genómico adicional que bordea el sitio de corte (y que no tiene homología con un brazo homólogo) se puede delecionar. Los brazos de homología pueden variar en longitud desde aproximadamente 50 nucleótidos hasta varios miles de nucleótidos. En algunas realizaciones, los brazos de homología pueden variar en longitud desde aproximadamente 500 nucleótidos

hasta aproximadamente 1000 nucleótidos. La homología de secuencia sustancial entre los brazos de homología y el ADN genómico puede ser de al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 99%.

[000141] En algunas realizaciones, los brazos de homología se utilizan con guías de B2M (p. ej., ARNg que comprenden una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1-3 o 35-44). En algunas realizaciones, los brazos de homología están diseñados para utilizarse con cualquier guía de B2M que eliminaría el sitio de inicio del gen B2M. En algunas realizaciones, los brazos de homología de B2M pueden comprender o consistir esencialmente en una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 13 o 19, o una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos el 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con la de SEQ ID NO: 13 o 19. En algunas realizaciones, el brazo de homología de B2M izquierdo puede comprender o consistir esencialmente en SEQ ID NO: 13, o una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos el 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con la de SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, el brazo de homología de B2M derecho puede comprender o consistir esencialmente en SEQ ID NO: 19, o una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos el 85%, 90%, 95% o 99% de identidad de secuencia con la de SEQ ID NO: 19.

[000142] El al menos un polinucleótido que codifica al menos un factor tolerogénico puede unirse operativamente a un promotor exógeno. El promotor exógeno puede ser un promotor constitutivo, inducible, temporal, específico del tejido o específico del tipo de célula. En algunas realizaciones, el promotor exógeno es un promotor de CMV, EF1a, PGK, CAG o UBC.

[000143] En algunas realizaciones, el al menos un polinucleótido que codifica al menos un factor tolerogénico se inserta en un locus seguro, p. ej., el locus de AAVS 1. En algunas realizaciones, el al menos un polinucleótido que
5 codifica al menos un factor tolerogénico se inserta en un sitio o una región de ADN genómico que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro (es decir, está dentro o cerca) de un gen MHC-I, gen MHC-II o un regulador de la transcripción de
10 MHC-I o MHC-II.

[000144] En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica PD-L1 se inserta en un sitio dentro o cerca de un locus del gen B2M. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica PD-L1 se inserta en un sitio
15 dentro o cerca de un locus del gen B2M concurrente con o después de una delección de todo o parte de un gen o promotor de B2M. El polinucleótido que codifica PD-L1 está unido operativamente a un promotor exógeno. El promotor exógeno puede ser un promotor de CMV.

[000145] En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica HLA-E se inserta en un sitio dentro o cerca de un locus del gen B2M. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica HLA-E se inserta en un sitio
20 dentro o cerca de un locus del gen B2M concurrente con o después de una delección de todo o parte de un gen o promotor de B2M. El polinucleótido que codifica HLA-E está unido operativamente a un promotor exógeno. El promotor exógeno puede ser un promotor de CMV.

[000146] En algunas realizaciones, un polinucleótido que
30 codifica HLA-G se inserta en un sitio dentro o cerca de un locus del gen HLA-A, HLA-B o HLA-C. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica HLA-G se inserta en un sitio dentro o cerca de un locus del gen HLA-

A, HLA-B o HLA-C concurrente con o después de una delección de un gen o promotor de HLA-A, HLA-B o HLA-C.

[000147] En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica CD47 se inserta en un sitio dentro o cerca de un locus del gen CIITA. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica CD47 se inserta en un sitio dentro o cerca de un locus del gen CIITA concurrente con, o después de una delección de un gen o promotor de CIITA.

[000148] En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica HLA-G se inserta en un sitio dentro o cerca de un locus del gen HLA-A, HLA-B o HLA-C concurrente con la inserción de un polinucleótido que codifica CD47 en un sitio dentro o cerca de un locus del gen CIITA.

[000149] En algunas realizaciones, una célula comprende una expresión aumentada o disminuida de uno o más factores de supervivencia. En algunas realizaciones, una célula comprende una inserción de una o más secuencias de polinucleótidos que codifican un factor de supervivencia. En algunas realizaciones, una célula comprende una delección de uno o más factores de supervivencia. En algunas realizaciones, una modificación genética de la divulgación se realiza utilizando cualquier método de edición de genes, incluyendo, pero sin limitación, los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, una célula comprende una expresión aumentada o disminuida de al menos un factor de supervivencia en relación con a una célula no modificada. En algunas realizaciones, un factor de supervivencia es un miembro o una vía crítica que participa en la supervivencia celular, p. ej., hipoxia, especies reactivas de oxígeno, privación de nutrientes y/o estrés oxidativo. En algunas realizaciones, la modificación genética de al menos un factor de supervivencia permite que una célula donante universal sobreviva durante un período

de tiempo más largo, p. ej., al menos 1.05, al menos 1.1, al menos 1.25, al menos 1.5, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 10, al menos 20, o al menos 50 veces más tiempo que una célula no modificada después del injerto. En algunas realizaciones, un factor de supervivencia es ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK o MANF.

[000150] En algunas realizaciones, una célula que comprende una inserción de un polinucleótido que codifica MANF permite que una célula donante universal sobreviva después del trasplante o injerto en un sujeto hospedador con tasas de supervivencia superiores en relación con una célula no modificada. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica MANF se inserta en un locus seguro. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica MANF se inserta en un gen que pertenece a un MHC-I, MHC-II o un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II.

[000151] En algunas realizaciones, el genoma de una célula se ha modificado para delecionar la totalidad o una parte de un gen ZNF143, TXNIP, FOXO1 y/o JNK. En algunas realizaciones, el genoma de una célula se ha modificado para delecionar la totalidad o una parte de una región promotora de un gen ZNF143, TXNIP, FOXO1 y/o JNK.

[000152] En algunas realizaciones, se modifica genéticamente más de un factor de supervivencia dentro de una célula.

[000153] En determinadas realizaciones, las células que no tienen expresión de MHC-II y una expresión moderada de MHC-I se modifican genéticamente para que no tengan expresión superficial de MHC-I o MHC-II. En otra realización, las células sin expresión superficial de MHC-I/II se editan adicionalmente para que tengan expresión de PD-L1, p. ej., inserción de un polinucleótido que codifica PD-L1. En otra

realización más, las células sin expresión superficial de MHC-I/II se editan adicionalmente para que tengan expresión de PD-L1, p. ej., inserción de un polinucleótido que codifica PD-L1, y también se modifican genéticamente para
5 aumentar o disminuir la expresión de al menos un gen que codifica un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada.

[000154] En algunas realizaciones, las células comprenden además una expresión aumentada o disminuida, p. ej.,
10 mediante una modificación genética, de uno o más genes adicionales que no participan necesariamente en la evasión inmunitaria o la supervivencia celular después del injerto. En algunas realizaciones, las células comprenden además un aumento de la expresión de una o más proteínas de
15 interruptor de seguridad en relación con una célula no modificada. En algunas realizaciones, las células comprenden un aumento de la expresión de uno o más genes adicionales que codifican una proteína de interruptor de seguridad. En algunas realizaciones, un interruptor de
20 seguridad también es un gen suicida. En algunas realizaciones, un interruptor de seguridad es la timidina quinasa del virus del herpes simple-1 (HSV-tk) o la caspasa-9 inducible. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica al menos un interruptor de
25 seguridad se inserta en un genoma, p. ej., en un locus seguro. En algunas otras realizaciones, el uno o más genes adicionales que están modificados genéticamente codifican una o más de las proteínas de interruptor de seguridad; modalidades de modificación dirigida; receptores; moléculas
30 de señalización; factores de transcripción; proteínas o péptidos farmacéuticamente activos; candidatos a fármacos diana; y proteínas que promueven el injerto, el tráfico, el asentamiento, la viabilidad, la autorrenovación, la

persistencia y/o la supervivencia de las mismas integradas con la construcción.

[000155] Un aspecto de la presente invención proporciona un método para generar células donantes universales
5 diseñadas genéticamente, en donde una célula donante universal comprende al menos una modificación genómica dirigida en uno o más sitios seleccionados del genoma, comprendiendo el método diseñar genéticamente un tipo de célula como se describe en el presente documento mediante
10 la introducción en dichas células de una o más construcciones para permitir la modificación dirigida en el sitio seleccionado; la introducción en dichas células de una o más roturas de doble cadena en los sitios seleccionados utilizando una o más endonucleasas capaces de
15 reconocer el sitio seleccionado; y el cultivo de las células editadas para permitir la reparación del ADN endógeno para generar inserciones o deleciones dirigidas en los sitios seleccionados; obteniéndose así células donantes universales con modificación genómica. Las células donantes
20 universales generadas mediante este método comprenderán al menos una modificación genómica dirigida funcional, y en donde las células con modificación genómica, si son células madre, pueden entonces diferenciarse en células progenitoras o células completamente diferenciadas.

[000156] En algunas otras realizaciones, las células donantes universales diseñadas genéticamente comprenden la expresión introducida o aumentada en al menos uno de HLA-E, HLA-G, CD47 o D-L1. En algunas realizaciones, las células donantes universales diseñadas genéticamente son
30 deficientes en HLA de clase I y/o clase II. En alguna realización, las células donantes universales diseñadas genéticamente comprenden B2M nulo o bajo. En algunas realizaciones, las células donantes universales diseñadas

genéticamente comprenden polinucleótidos exógenos integrados o no integrados que codifican una o más de las proteínas HLA-E, HLA-G y PD-L1. En algunas realizaciones, dicha expresión introducida es una expresión aumentada de genes no expresados o poco expresados comprendidos en dichas células. En algunas realizaciones, los polinucleótidos exógenos no integrados se introducen utilizando virus Sendai, AAV, episomal o plásmido. En alguna realización, las células donantes universales son nulas para B2M, con expresión introducida de uno o más de HLA-E, HLA-G, PD-L1 y expresión aumentada o disminuida de al menos una proteína de interruptor de seguridad. En otra realización, las células donantes universales son nulas para HLA-A, HLA-B y HLA-C, con expresión introducida de uno o más de HLA-E, HLA-G, PD-L1 y al menos una proteína de interruptor de seguridad. En alguna realización, las células donantes universales son nulas para B2M, con expresión introducida de uno o más de HLA-E, HLA-G PD-L1 y expresión aumentada o disminuida de al menos un factor de supervivencia, p. ej., MANF. Se contempla que los métodos para generar cualquiera de las células modificadas genéticamente descritas en el presente documento se realicen utilizando al menos cualquiera de los métodos de edición de genes descritos en el presente documento.

25

IV. Tipos de células

[000157] Las células como se describen en el presente documento, p. ej., las células donantes universales (y las correspondientes células no modificadas) pueden pertenecer a cualquier clase posible de tipo de célula. En algunas realizaciones, una célula, p. ej., una célula donante universal (y la correspondiente célula no modificada) puede ser una célula de mamífero. En algunas realizaciones, una

30

célula, p. ej., una célula donante universal (y la correspondiente célula no modificada) puede ser una célula humana. En algunas realizaciones, una célula, p. ej., una célula donante universal (y la correspondiente célula no modificada) puede ser una célula madre. En algunas realizaciones, una célula, p. ej., una célula donante universal (y la correspondiente célula no modificada) puede ser una célula madre pluripotente (PSC). En algunas realizaciones, una célula, p. ej., una célula donante universal (y la correspondiente célula no modificada) puede ser una célula madre embrionaria (ESC), una célula madre adulta (ASC), una célula madre pluripotente inducida (iPSC) o una célula madre o progenitora hematopoyética (HSPC). En algunas realizaciones, una célula, p. ej., una célula donante universal (y la correspondiente célula no modificada) puede ser una célula diferenciada. En algunas realizaciones, una célula, p. ej., una célula donante universal (y la correspondiente célula no modificada) puede ser una célula somática, p. ej., una célula del sistema inmunitario o una célula contráctil, p. ej., una célula de músculo esquelético.

[000158] Las células, p. ej., células madre donantes universales, descritas en el presente documento, pueden diferenciarse en tipos de células relevantes para evaluar la expresión de HLA, así como la evaluación de la inmunogenicidad de las estirpes de células madre universales. En general, la diferenciación comprende mantener las células de interés durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para que las células se diferencien en las células diferenciadas de interés. Por ejemplo, las células madre universales descritas en el presente documento pueden diferenciarse en células progenitoras mesenquimatosas (MPC, *Mesenchymal Progenitor*

Cells), cardiomiocitos hipoinmunogénicos, células progenitoras musculares, blastocitos, células endoteliales (CE, *Endothelial Cells*), macrófagos, hepatocitos, células beta (p. ej., células beta pancreáticas), células progenitoras endodérmicas pancreáticas, células progenitoras endocrina pancreática o células progenitoras neuronales (NPC, *Neural Progenitor Cells*).

[000159] Las células madre son capaces tanto de proliferar como de dar lugar a más células progenitoras, que, a su vez, tienen la capacidad de generar un gran número de células madre que, a su vez, pueden dar lugar a células hijas diferenciadas o diferenciables. Las células hijas en sí pueden inducirse para proliferar y producir descendencia que posteriormente se diferencia en uno o más tipos celulares maduros, mientras que también se conservan una o más células con potencial de desarrollo parental. La expresión "célula madre" se refiere, por lo tanto, a una célula con la capacidad o el potencial, en circunstancias particulares, de diferenciarse en un fenotipo más especializado o diferenciado y que conserva la capacidad, en determinadas circunstancias, de proliferar sin diferenciarse sustancialmente. En un aspecto, la expresión célula progenitora o madre se refiere a una célula madre generalizada cuyos descendientes (progenie) se especializa, normalmente en diferentes direcciones, mediante diferenciación, p. ej., adquiriendo caracteres completamente individuales, como se produce en la diversificación progresiva de las células y tejidos embrionarios. La diferenciación celular es un proceso complejo que normalmente se produce mediante diversas divisiones celulares. Una célula diferenciada puede proceder de una célula multipotente que en sí procede de una célula multipotente, y así sucesivamente. Aunque cada

una de estas células multipotentes pueden considerarse células madre, la variedad de tipos que pueden generar cada una puede variar considerablemente. Algunas células diferenciadas también tienen la capacidad de dar lugar a
5 células con un mayor potencial de desarrollo. Dicha capacidad puede ser natural o puede inducirse artificialmente tras el tratamiento con diversos factores. En muchos casos biológicos, las células madre también pueden ser "multipotentes" debido a que pueden producir
10 descendencia de más de un tipo de célula distinto, pero esto no es necesario para el carácter de "madre".

[000160] Una "célula diferenciada" es una célula que ha progresado más a lo largo de la vía de desarrollo que la célula con la que se está comparando. Por lo tanto, las
15 células madre pueden diferenciarse en células precursoras de linaje restringido (tales como una célula progenitora de miocitos), que a su vez, puede diferenciarse en otros tipos de células precursoras posteriores de la vía (tal como un precursor de miocitos) y posteriormente, en una célula
20 diferenciada terminalmente, tal como un miocito, que desempeña un papel característico en un tipo de tejido concreto y puede conservar o no la capacidad para proliferar adicionalmente.

Células madre embrionarias

[000161] Las células descritas en el presente documento pueden ser células madre embrionarias (ESC). Las ESC derivan de blastocitos de embriones de mamíferos y pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula y propagarse rápidamente. También se cree que las ESC tienen un
30 cariotipo normal, mantienen una alta actividad de la telomerasa y presentan un notable potencial proliferativo a largo plazo, lo que hace que estas células sean excelentes candidatas para su uso como células donantes universales.

Células madre adultas

[000162] Las células descritas en el presente documento pueden ser células madre adultas (ASC). Las ASC son células indiferenciadas que se pueden encontrar en mamíferos, p. ej., seres humanos. Las ASC se definen por su capacidad para autorrenovarse, p. ej., pasar a través de diversas rondas de replicación celular mientras mantienen su estado indiferenciado, y su capacidad para diferenciarse en diversos tipos de células distintos, p. ej., células gliales. Las células madre adultas son una amplia clase de células madre que pueden abarcar células madre hematopoyéticas, células madre mamarias, células madre intestinales, células madre mesenquimatosas, células madre endoteliales, células madre neuronales, células madre adultas olfativas, células madre de la cresta neuronal y células testiculares.

Células madre pluripotentes inducidas

[000163] Las células descritas en el presente documento pueden ser células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Una iPSC puede generarse directamente a partir de una célula humana adulta mediante la introducción de genes que codifican factores de transcripción críticos que participan en la pluripotencia, p. ej., Oct4, Sox2, cMyc y Klf4. Una iPSC puede derivar del mismo sujeto al que se van a administrar las células progenitoras posteriores. Es decir, se puede obtener una célula somática de un sujeto, reprogramarla en una célula madre pluripotente inducida y luego volver a diferenciarla en una célula progenitora para administrarla al sujeto (p. ej., células autólogas). Sin embargo, en el caso de las células autólogas, persiste el riesgo de respuesta inmunitaria y de escasa viabilidad tras el injerto.

Células progenitoras y madre hematopoyéticas humanas

[000164] Las células descritas en el presente documento pueden ser células progenitoras y madre hematopoyéticas humanas (hHSPC). Este linaje de células madre da lugar a todos los tipos de células sanguíneas, incluyendo eritroides (eritrocitos o glóbulos rojos (GR)), mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, megacariocitos/plaquetas y células dendríticas) y linfoides (linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK). Las células sanguíneas se producen por la proliferación y diferenciación de una población muy pequeña de células madre hematopoyéticas (HSC) pluripotentes que también tienen la capacidad de reponerse por sí mismas mediante la autorrenovación. Durante la diferenciación, la progenie de las HSC progresa a través de diversas etapas intermedias de maduración, generando células progenitoras de potencial múltiple y de linaje comprometido antes de alcanzar la madurez. La médula ósea (MO) es el sitio principal de hematopoyesis en los seres humanos y, en condiciones normales, solo se pueden encontrar pequeñas cantidades de células progenitoras y madre hematopoyéticas (HSPC) en la sangre periférica (SP). El tratamiento con citocinas, algunos fármacos mielosupresores utilizados en el tratamiento del cáncer y compuestos que interrumpen la interacción entre las células hematopoyéticas y del estroma de la MO pueden movilizar rápidamente un gran número de células progenitoras y madre hacia la circulación.

Diferenciación de células en otros tipos de células

[000165] Otra etapa de los métodos de la presente divulgación puede comprender diferenciar células en células diferenciadas. La etapa de diferenciación se puede realizar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las iPSC humanas se diferencian en endodermo definitivo utilizando diversos tratamientos, incluyendo la

activina y el suplemento B27 (Life Technologies). El endodermo definitivo se diferencia más en hepatocito, y el tratamiento incluye: FGF4, HGF, BMP2, BMP4, Oncostatina M, Dexametasona, etc. (Duan *et al.*, *Stem Cells*, 2010;28:674-686; Ma *et al.*, *Stem Cells Translational Medicine*, 2013;2:409-419). En otra realización, la etapa de diferenciación se puede realizar según Sawitza *et al.*, *Sci Rep.* 2015; 5: 13320. Una célula diferenciada puede ser cualquier célula somática de un mamífero, p. ej., un ser humano. En algunas realizaciones, una célula somática puede ser una célula epitelial secretora endocrina (p. ej., células secretoras de hormona tiroidea, células corticales suprarrenales), una célula epitelial secretora exocrina (p. ej., célula mucosa de la glándula salival, célula de la glándula prostática), una célula secretora de hormonas (p. ej., célula de la hipófisis anterior, célula de los islotes pancreáticos), una célula epitelial queratinizante (p. ej., queratinocito epidérmico), una célula epitelial de barrera estratificada húmeda, una célula transductora sensorial (p. ej., un fotorreceptor), una célula neuronal autónoma, una célula de soporte de los órganos sensoriales y de soporte de neuronas periféricas (p. ej., célula de Schwann), una neurona del sistema nervioso central, una célula glial (p. ej., astrocito, oligodendrocito), una célula del cristalino, un adipocito, una célula de riñón, una célula con función de barrera (p. ej., una célula de conducto), una célula de la matriz extracelular, una célula contráctil (p. ej., célula del músculo esquelético, célula del músculo cardíaco, célula del músculo liso), una célula sanguínea (p. ej., eritrocito), una célula del sistema inmunitario (p. ej., megacariocito, célula microglial, neutrófilo, mastocito, un linfocito T, un linfocito B, un linfocito

citolítico natural), una célula germinal (p. ej., espermátida), una célula nodriza o una célula intersticial.

V. Formulaciones y administraciones

5 Formulación y administración para la edición de genes

[000166] Los ARN guía, polinucleótidos, p. ej., polinucleótidos que codifican un factor tolerogénico o polinucleótidos que codifican una endonucleasa, y las endonucleasas como se describe en el presente documento
10 pueden formularse y administrarse a las células de cualquier manera conocida en la técnica.

[000167] Los ARN guía y/o polinucleótidos pueden formularse con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como vehículos, disolventes, estabilizadores,
15 adyuvantes, diluyentes, etc., dependiendo del modo particular de administración y de la forma farmacéutica. Las composiciones de ARN guía y/o polinucleótidos se pueden formular para lograr un pH fisiológicamente compatible y varían de un pH de aproximadamente 3 a un pH de
20 aproximadamente 11, de un pH de aproximadamente 3 a un pH de aproximadamente 7, dependiendo de la formulación y de la vía de administración. En algunos casos, el pH se puede ajustar a un intervalo pH de aproximadamente 5.0 a pH de aproximadamente 8. En algunos casos, las composiciones
25 pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto como se describe en el presente documento, junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Opcionalmente, las composiciones pueden comprender una combinación de los
30 compuestos descritos en el presente documento o pueden incluir un segundo principio activo en el tratamiento o la prevención del crecimiento bacteriano (p. ej. y sin limitación, agentes antibacterianos o antimicrobianos) o

pueden incluir una combinación de reactivos de la presente divulgación.

[000168] Los excipientes adecuados incluyen, p. ej., vehículos proteicos que incluyen macromoléculas grandes lentamente metabolizadas, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas. Otros excipientes ilustrativos pueden incluir antioxidantes (p. ej. y sin limitación, ácido ascórbico), agentes quelantes (p. ej. y sin limitación, EDTA), carbohidratos (p. ej. y sin limitación, dextrina, hidroxialquilcelulosa e hidroxialquilmetilcelulosa), ácido esteárico, líquidos (p. ej. y sin limitación, aceites, agua, suero salino, glicerol y etanol), agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH y similares.

[000169] Los polinucleótidos guía (ARN o ADN) y/o los polinucleótidos de la endonucleasa (ARN o ADN) pueden administrarse mediante vehículos de administración víricos o no víricos conocidos en la técnica. Como alternativa, pueden administrarse polipéptido/s de endonucleasa mediante vehículos de administración víricos o no víricos conocidos en la técnica, tales como electroporación o nanopartículas de lípidos. En aspectos alternativos adicionales, la endonucleasa de ADN puede administrarse en forma de uno o más polipéptidos, ya sea sola o previamente complejada con uno o más ARN guía o uno o más ARNcr junto con un ARNtracr.

[000170] Los polinucleótidos pueden administrarse mediante vehículos de administración no víricos que incluyen, pero sin limitación, nanopartículas, liposomas, ribonucleoproteínas, péptidos cargados positivamente, conjugados de ARN de molécula pequeña, quimeras de aptámero-ARN y complejos de proteína de fusión con ARN.

Algunos vehículos de administración no víricos ilustrativos se describen en Peer y Lieberman, *Gene Therapy*, 2011, 18: 1127-1133 (que se centra en los vehículos de administración no víricos para ARNpi que también son útiles para el

5 administración de otros polinucleótidos).

[000171] Para los polinucleótidos de la divulgación, la formulación puede seleccionarse de cualquiera de los enseñados, p. ej., en la solicitud internacional PCT/US2012/069610.

10 **[000172]** Los polinucleótidos, tales como ARN guía, ARNsg y ARNm que codifican una endonucleasa pueden administrarse a una célula o un sujeto mediante una nanopartícula lipídica (LNP).

[000173] Una LNP se refiere a cualquier partícula que

15 tenga un diámetro de menos de 1000 nm, 500 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm o 25 nm. Como alternativa, una nanopartícula puede tener un tamaño en el intervalo de 1-1000 nm, 1-500 nm, 1-250 nm, 25-200 nm, 25-100 nm, 35-75 nm o 25-60 nm.

20 **[000174]** Las LNP pueden estar formadas por lípidos catiónicos, aniónicos o neutros. Los lípidos neutros, tales como el fosfolípido fusogénico DOPE o el componente de membrana, colesterol, pueden incluirse en las LNP como "lípidos auxiliares" para potenciar la actividad de

25 transfección y la estabilidad de las nanopartículas. Las limitaciones de los lípidos catiónicos incluyen la baja eficacia causada por la mala estabilidad o la rápida eliminación, así como la generación de respuestas inflamatorias o antiinflamatorias.

30 **[000175]** Las LNP también pueden estar formadas por lípidos hidrófobos, lípidos hidrófilos o lípidos tanto hidrófobos como hidrófilos.

[000176] Para producir una LNP se puede utilizar cualquier lípido o combinación de lípidos que se conozca en la técnica. Los ejemplos de lípidos usados para producir LNP son: DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-colesterol, DOTAP-colesterol, GAP-DMORIE-DPyPE y GL67A-DOPE-DMPE-polietilenglicol (PEG). Los ejemplos de lípidos catiónicos son: 98N12-5, C12-200, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1 y 7C1. Los ejemplos de lípidos neutros son: DPSC, DPPC, POPC, DOPE y SM. Los ejemplos de lípidos modificados con PEG son: PEG-DMG, PEG-CerC14 y PEG-CerC20.

[000177] Los lípidos se pueden combinar en cualquier número de proporciones molares para producir una LNP. Además, el/los polinucleótido/s puede/n combinarse con uno o más lípidos en una gran variedad de proporciones molares para producir una LNP.

[000178] Para la administración, se puede utilizar un vector de virus adenoasociado (AAV) recombinante. Son comunes en la especialidad las técnicas para producir partículas de rAAV, en las que se proporcionan a una célula el genoma de AAV que se va a empaquetar que incluye el polinucleótido que se va a administrar, los genes rep y cap y funciones de virus auxiliares. La producción de rAAV normalmente requiere que estén presentes los siguientes componentes en una sola célula (indicada en el presente documento como una célula empaquetadora): un genoma de rAAV, genes rep y cap de AAV separados de (es decir, no en) el genoma de rAAV y funciones de virus auxiliares. Los genes rep y cap de AAV pueden ser de cualquier serotipo de AAV para el que pueda obtenerse virus recombinante y puede ser de un serotipo de AAV diferente al de las ITR del genoma de rAAV, incluyendo, pero sin limitación, los serotipos de AAV descritos en el presente documento. La producción de rAAV pseudotipado se divulga en, p. ej., la

publicación de solicitud de patente internacional número WO 01/83692.

Formulación y administración de células, p. ej., células donantes universales

- 5 **[000179]** Las células modificadas genéticamente, p. ej., células donantes universales, como se describe en el presente documento, pueden formularse y administrarse a un sujeto de cualquier manera conocida en la técnica.
- 10 **[000180]** Los términos "administrar", "introducir", "implantar", "injertar" y "trasplantar" se usan indistintamente en el contexto de la colocación de células, p. ej., células progenitoras, en un sujeto, mediante un método o una vía que produce la ubicación al menos parcial de las células introducidas en un sitio deseado. Las
- 15 células, p. ej., células progenitoras o su descendencia diferenciada pueden administrarse por cualquier vía adecuada que produzca la administración en una ubicación deseada en el sujeto, donde al menos una parte de las células implantadas o componentes de las células permanecen
- 20 viables. El período de viabilidad de las células después de la administración a un sujeto puede ser tan breve como de unas pocas horas, p. ej., 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.
- 25 **[000181]** Una célula modificada genéticamente, p. ej., una célula donante universal, como se describe en el presente documento, puede ser viable después de la administración a un sujeto durante un período que es más largo que el de una célula no modificada.
- 30 **[000182]** En algunas realizaciones, una composición que comprende células como se describe en el presente documento puede administrarse mediante una vía adecuada, que puede incluir la administración intravenosa, p. ej., como un bolo

o mediante infusión continua durante un período de tiempo. En algunas realizaciones, la administración intravenosa puede realizarse por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial o intratecal. En algunas realizaciones, una composición puede estar en forma sólida, en forma acuosa o en forma líquida. En algunas realizaciones, se puede nebulizar o liofilizar una forma acuosa o líquida. En algunas realizaciones, una forma nebulizada o liofilizada puede reconstituirse con una solución acuosa o líquida.

[000183] También puede emulsionarse o presentarse una composición celular como una composición de liposomas, a condición de que el procedimiento de emulsión no afecte negativamente a la viabilidad celular. Pueden mezclarse las células y cualquier otro principio activo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento.

[000184] Los agentes adicionales incluidos en una composición celular pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes de la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, p. ej., los ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden proceder de bases orgánicas, tales como hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos y bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaina y similares.

[000185] Se conocen bien en la técnica vehículos fisiológicamente tolerables. Los vehículos líquidos ilustrativos son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los principios activos y agua o que contienen un tampón, tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, suero salino fisiológico o ambos, tal como suero salino tamponado con fosfato. Además, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tampón, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de o excluyendo el agua. Son ejemplos de dichas fases líquidas adicionales la glicerina, aceites vegetales, tales como aceite de semilla de algodón y emulsiones de aceite-agua. La cantidad de un compuesto activo usada en las composiciones celulares que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o de la afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales.

[000186] En algunas realizaciones, se puede administrar una composición que comprenda células a un sujeto, p. ej., un sujeto humano, que tenga, se sospeche que tenga o esté en riesgo de padecer una enfermedad. En algunas realizaciones, se puede administrar una composición a un sujeto que no tenga, que no se sospeche que tenga o que no esté en riesgo de padecer una enfermedad. En algunas realizaciones, un sujeto es un ser humano sano. En algunas realizaciones, un sujeto, p. ej., un sujeto humano, que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad genéticamente hereditaria. En algunas realizaciones, el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar síntomas indicativos de una enfermedad.

VI. Composiciones y métodos específicos de la divulgación

[000187] Por consiguiente, la presente divulgación se refiere en particular a las siguientes composiciones y métodos no limitantes.

[000188] En una primera composición, la Composición 1, la presente divulgación es una composición que comprende células que comprenden (i) al menos una modificación genética dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, u otros componentes o reguladores de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II; (ii) al menos una modificación genética que aumenta la expresión de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en relación con una célula no modificada; y (iii) al menos una modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un gen que codifica un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada.

[000189] En otra composición, la Composición 2, la presente divulgación proporciona una composición que comprende células que comprenden (i) al menos una delección y/o inserción de al menos un par de bases dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, u otros componentes o reguladores de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II; y (ii) al menos una inserción de un polinucleótido que codifica al menos un factor tolerogénico en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de una delección genética de (i).

[000190] En otra composición, la Composición 3, la presente divulgación proporciona una composición que comprende células que comprenden al menos una modificación

genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un gen que codifica un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada.

[000191] En otra composición, la Composición 4, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 1, en donde la modificación genética de (i) es una delección.

[000192] En otra composición, la Composición 5, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 1, en donde la modificación genética de (ii) es una inserción de un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en un locus seguro o en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de una modificación genética de (i).

[000193] En otra composición, la Composición 6, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 1, en donde la modificación genética de (i) es una delección de un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, u otros componentes o reguladores de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II; y la modificación genética de (ii) es una inserción de un polinucleótido que codifica al menos un factor tolerogénico en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de una modificación genética de (i).

[000194] En otra composición, la Composición 7, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1, 2 o 4 a 6, en donde el al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, u otros componentes o reguladores de la transcripción del complejo

de MHC-I o MHC-II es uno o más de un gen MHC-I (p. ej., HLA-A, HLA-B y HLA-C), un gen MHC-II (p. ej., HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ y HLA-DR), o un gen que codifica un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II u otro componente del complejo de MHC-I (p. ej., B2M, NLRC5 y CIITA).

[000195] En otra composición, la Composición 8, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1, 2 o 4 a 6, en donde el al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, u otros componentes o reguladores de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II es uno o más de HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M o CIITA.

[000196] En otra composición, la Composición 9, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 1 o 2, en donde (i) es una delección dentro o cerca de uno o más de HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M o CIITA.

[000197] En otra composición, la Composición 10, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 9, en donde (i) es una delección dentro o cerca de HLA-A, una delección dentro o cerca de HLA-B, una delección dentro o cerca de HLA-C, o una delección dentro o cerca de B2M.

[000198] En otra composición, la Composición 11, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 9, en donde (i) es una delección dentro o cerca de HLA-A, una delección dentro o cerca de HLA-B, una delección dentro o cerca de HLA-C, o una delección dentro o cerca de CIITA.

[000199] En otra composición, la Composición 12, la presente divulgación proporciona una composición, como se

proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1, 2 o 4 a 11, en donde el al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico es uno o más polinucleótidos que codifican uno o más de HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 o PD-L1.

5 **[000200]** En otra composición, la Composición 13, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 12, en donde (i) es una delección dentro o cerca de B2M y (ii) es una inserción de un polinucleótido que codifica PD-L1 en un sitio que se
10 solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro de la delección en (i).

[000201] En otra composición, la Composición 14, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 12, en donde (i) es una
15 delección dentro o cerca de HLA-A, una delección dentro o cerca de HLA-B, o una delección dentro o cerca de HLA-C y (ii) es una inserción de un polinucleótido que codifica HLA-G en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro de una delección
20 en (i) (p. ej., la delección de HLA-A).

[000202] En otra composición, la Composición 15, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 12, en donde (i) es una delección dentro o cerca de HLA-A, una delección dentro o
25 cerca de HLA-B, una delección dentro o cerca de HLA-C, o una delección dentro o cerca de CIITA y (ii) es una inserción de un polinucleótido que codifica HLA-G en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro de la delección dentro o cerca de HLA-A y
30 la inserción de un polinucleótido que codifica CD47 en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro de la delección dentro o cerca de CIITA.

[000203] En otra composición, la Composición 16, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 o 3 a 15, en donde al menos un gen que codifica un factor de supervivencia es uno o más genes que codifican uno o más de ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK o MANF.

[000204] En otra composición, la Composición 17, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 o 3 a 16, en donde la modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de un gen que codifica un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada es una inserción de un polinucleótido que codifica MANF, p. ej., en un locus seguro.

[000205] En otra composición, la Composición 18, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 o 3 a 16, en donde la modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de un gen que codifica un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada es una delección dentro o cerca de un gen ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK, que reduce o elimina la expresión del gen ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK en relación con una célula no modificada.

[000206] En otra composición, la Composición 19, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 a 18, en donde las células comprenden además un polinucleótido exógeno que no está integrado en el ADN genómico de las células.

[000207] En otra composición, la Composición 20, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 19, en donde el

polinucleótido exógeno codifica HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, MANF y/o PD-L1.

[000208] En otra composición, la Composición 21, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 a 20, en donde las células comprenden además un aumento de la expresión de uno o más interruptores de seguridad en relación con una célula no modificada.

[000209] En otra composición, la Composición 22, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 21, en donde un interruptor de seguridad es la timidina quinasa del virus del herpes simple-1 (HSV-tk) o la caspasa-9 inducible.

[000210] En otra composición, la Composición 23, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 21 o 22, en donde el aumento de la expresión de uno o más interruptores de seguridad se debe a una inserción genética de un polinucleótido que codifica una proteína de interruptor de seguridad, p. ej., en un locus seguro.

[000211] En otra composición, la Composición 24, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 5, 17 o 23, en donde el locus seguro se selecciona del grupo que consiste en AAVS1 (PPP1 R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX (F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF y TTR.

[000212] En otra composición, la Composición 25, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 a 24, en donde las células comprenden además una modificación genética adicional que disminuye la expresión de cualquier gen adicional.

[000213] En otra composición, la Composición 26, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 a 25, en donde la modificación genética, la delección genética o la inserción genética se produce mediante la administración a las células de una endonucleasa y un ARN guía (ARNg).

[000214] En otra composición, la Composición 27, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 26, en donde la endonucleasa es una Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también conocida como Csn1 y Csx12), endonucleasa Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, o Cpf1; un homólogo de las mismas, una recombinación de su molécula de origen natural, una versión con optimización de codones de las mismas o versiones modificadas de las mismas y combinaciones de las mismas.

[000215] En otra composición, la Composición 28, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 27, en donde la endonucleasa es una Cas9, opcionalmente una Cas9 de *S. pyogenes*, o una variante de la misma que comprende una NLS de SV40 N-terminal y una NLS de SV40 C-terminal.

[000216] En otra composición, la Composición 29, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 26, en donde la proporción en peso de dicho ARNg con respecto a dicha endonucleasa es de 1:1.

[000217] En otra composición, la Composición 30, la presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 2, 5, 6,

12 a 15, 17, 19, 20 o 23, en donde el polinucleótido comprende un promotor exógeno.

[000218] En otra composición, la Composición 31, la presente divulgación proporciona una composición, como se
5 proporciona en la Composición 30, en donde el promotor exógeno es un CMV, EFla, PGK, CAG, UBC u otro promotor constitutivo, inducible, temporal, específico del tejido o específico del tipo de célula.

[000219] En otra composición, la Composición 32, la
10 presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en la Composición 31, en donde el promotor exógeno es un promotor de CAG.

[000220] En otra composición, la Composición 33, la presente divulgación proporciona una composición, como se
15 proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 a 32, en donde las células son células madre (p. ej., células madre humanas).

[000221] En otra composición, la Composición 34, la presente divulgación proporciona una composición, como se
20 proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 a 33, en donde las células son células madre embrionarias (ESC), células madre adultas (ASC), células madre pluripotentes inducidas (iPSC), o células progenitoras y madre hematopoyéticas (HSPC).

[000222] En otra composición, la Composición 35, la presente divulgación proporciona una composición, como se
25 proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 a 32, en donde las células son células diferenciadas.

[000223] En otra composición, la Composición 36, la
30 presente divulgación proporciona una composición, como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 a 32 o 35, en donde las células son células somáticas.

[000224] En un primer método, el Método 1, la presente divulgación proporciona un método para generar células modificadas, comprendiendo el método: (i) introducir al menos una modificación genética dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, u otros componentes o reguladores de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II; (ii) introducir al menos una modificación genética que aumenta la expresión de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en las células; e (iii) introducir al menos una modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un gen que codifica un factor de supervivencia en las células donantes universales.

[000225] En otro método, el Método 2, la presente divulgación proporciona un método para generar células donantes universales, comprendiendo el método: (i) introducir al menos una delección de al menos una región de ADN genómico dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, u otros componentes o reguladores de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II; e (ii) introducir al menos una inserción de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de una delección de (i).

[000226] En otro método, el Método 3, la presente divulgación proporciona un método para generar células donantes universales, comprendiendo el método introducir al menos una modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un gen que codifica un factor de supervivencia.

[000227] En otro método, el Método 4, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el

Método 1, en donde la modificación genética de (i) es una delección.

[000228] En otro método, el Método 5, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
5 Método 1, en donde la modificación genética de (ii) es una inserción de un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en un locus seguro o en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de una modificación genética de
10 (i).

[000229] En otro método, el Método 6, la presente divulgación proporciona un método, como se proporciona en el Método 1, en donde la modificación genética de (i) es una delección de un gen que codifica uno o más antígenos
15 leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, u otros componentes o reguladores de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II; y la modificación genética de (ii) es una inserción de un polinucleótido que codifica al menos un factor tolerogénico en un sitio que se solapa parcialmente con, se
20 solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de una modificación genética de (i).

[000230] En otro método, el Método 7, la presente divulgación proporciona un método, como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 1, 2 o 4 a 6, en donde el al
25 menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, u otros componentes o reguladores de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II es uno o más de un gen MHC-I (p. ej., HLA-A, HLA-B y HLA-C), un gen MHC-II (p. ej., HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ y
30 HLA-DR), o un gen que codifica un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II (p. ej., B2M, NLRC5 y CIITA).

[000231] En otro método, el Método 8, la presente divulgación proporciona un método, como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 1, 2 o 4 a 6, en donde el al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, u otros componentes o reguladores de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II es uno o más de HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M o CIITA.

[000232] En otro método, el Método 9, la presente divulgación proporciona un método, como se proporciona en el Método 1 o 2, en donde (i) es una delección dentro o cerca de uno o más de HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M o CIITA.

[000233] En otro método, el Método 10, la presente divulgación proporciona un método, como se proporciona en el Método 9, en donde (i) es una delección dentro o cerca de HLA-A, una delección dentro o cerca de HLA-B, una delección dentro o cerca de HLA-C, y una delección dentro o cerca de B2M.

[000234] En otro método, el Método 11, la presente divulgación proporciona un método, como se proporciona en el Método 9, en donde (i) es una delección dentro o cerca de HLA-A, una delección dentro o cerca de HLA-B, una delección dentro o cerca de HLA-C, y una delección dentro o cerca de CIITA.

[000235] En otro método, el Método 12, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 1, 2 o 4 a 11, en donde el al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico es uno o más polinucleótidos que codifican uno o más de HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 o PD-L1.

[000236] En otro método, el Método 13, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 12, en donde (i) es una delección dentro o cerca de B2M y (ii) es una inserción de un polinucleótido que

codifica PD-L1 en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro de la delección en (i).

[000237] En otro método, el Método 14, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 12, en donde (i) es una delección dentro o cerca de HLA-A, una delección dentro o cerca de HLA-B, y una delección dentro o cerca de HLA-C y (ii) es una inserción de un polinucleótido que codifica HLA-G en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro de una delección en (i) (p. ej., la delección de HLA-A).

[000238] En otro método, el Método 15, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 12, en donde (i) es una delección dentro o cerca de HLA-A, una delección dentro o cerca de HLA-B, una delección dentro o cerca de HLA-C, y una delección dentro o cerca de CIITA y (ii) es una inserción de un polinucleótido que codifica HLA-G en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro de la delección dentro o cerca de HLA-A y la inserción de un polinucleótido que codifica CD47 en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro de la delección dentro o cerca de CIITA.

[000239] En otro método, el Método 16, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 1 o 3 a 15, en donde al menos un gen que codifica un factor de supervivencia es uno o más genes que codifican uno o más de un ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK o MANF.

[000240] En otro método, el Método 17, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 1 o 3 a 16, en donde la

modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de un gen que codifica un factor de supervivencia es una inserción de un polinucleótido que codifica MANF, p. ej., en un locus seguro.

5 **[000241]** En otro método, el Método 18, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 1 o 3 a 16, en donde la modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de un gen que codifica un factor de supervivencia es una
10 delección dentro o cerca de un gen ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK, que reduce o elimina la expresión del gen ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK en relación con una célula no modificada.

[000242] En otro método, el Método 19, la presente
15 divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 1 a 18, en donde las células son células madre (p. ej., células madre humanas).

[000243] En otro método, el Método 20, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en
20 uno cualquiera de los Métodos 1 a 19, en donde las células son células madre embrionarias (ESC), células madre adultas (ASC), células madre pluripotentes inducidas (iPSC), o células progenitoras y madre hematopoyéticas (HSPC).

[000244] En otro método, el Método 21, la presente
25 divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 1 a 18, en donde las células son células diferenciadas.

[000245] En otro método, el Método 22, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en
30 uno cualquiera de los Métodos 1 a 18 o 21, en donde las células son células somáticas.

[000246] En otro método, el Método 23, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en

uno cualquiera de los Métodos 1 a 22, en donde el método comprende además introducir un polinucleótido exógeno en las células que no se integra en el ADN genómico de las células.

5 **[000247]** En otro método, el Método 24, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 23, en donde el polinucleótido exógeno codifica HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47, MANF y/o PD-L1.

10 **[000248]** En otro método, el Método 25, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 1 a 24, en donde el método comprende además aumentar la expresión de uno o más interruptores de seguridad en relación con una célula no modificada.

15 **[000249]** En otro método, el Método 26, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 25, en donde un interruptor de seguridad es la timidina quinasa del virus del herpes simple-1 (HSV-tk) o la caspasa-9 inducible.

20 **[000250]** En otro método, el Método 27, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 25 o 26, en donde el aumento de la expresión de uno o más interruptores de seguridad se debe a una inserción genética de un polinucleótido que codifica un interruptor de seguridad, p. ej., en un locus seguro.

25 **[000251]** En otro método, el Método 28, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 5, 17 o 27, en donde el locus seguro se selecciona del grupo que consiste en AAVS1 (PPP1 R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX (F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF y TTR.

30 **[000252]** En otro método, el Método 29, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en

uno cualquiera de los Métodos 1 a 28, en donde el método comprende además introducir una modificación genética adicional que disminuye la expresión de cualquier gen adicional.

5 **[000253]** En otro método, el Método 30, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 1 a 29, en donde la modificación, delección o inserción genética se produce mediante la administración a las células de una
10 endonucleasa y al menos un RNA guía (ARNg).

[000254] En otro método, el Método 31, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 30, en donde la endonucleasa es una Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (también
15 conocida como Csn1 y Csx12), endonucleasa Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, o Cpf1; un homólogo de las mismas,
20 una recombinación de su molécula de origen natural, una versión con optimización de codones de las mismas o versiones modificadas de las mismas y combinaciones de las mismas.

[000255] En otro método, el Método 32, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 31, en donde la endonucleasa es una Cas9,
25 opcionalmente una Cas9 de *S. pyogenes*, o una variante de la misma que comprende una NLS de SV40 N-terminal y una NLS de SV40 C-terminal.

30 **[000256]** En otro método, el Método 33, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 30, en donde la proporción en peso de dicho/s ARNg con respecto a dicha endonucleasa es de 1:1.

[000257] En otro método, el Método 34, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 2, 5, 6, 12 a 15, 17, 23, 25 o 27, en donde el polinucleótido comprende un promotor exógeno.

[000258] En otro método, el Método 35, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 34, en donde el promotor exógeno es un CMV, EFla, PGK, CAG, UBC u otro promotor constitutivo, inducible, temporal, específico del tejido o específico del tipo de célula.

[000259] En otro método, el Método 36, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 35, en donde el promotor exógeno es un promotor de CAG.

[000260] En otro método, el Método 37, la presente divulgación proporciona un método que comprende administrar a un sujeto una composición de células como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 a 36 o una composición que comprende una pluralidad de células generadas por uno cualquiera de los Métodos 1 a 36.

[000261] En otro método, el Método 38, la presente divulgación proporciona un método que comprende (i) obtener una composición de células como se proporciona en una cualquiera de las Composiciones 1 a 34; (ii) diferenciar las células en células de linaje restringido o células completamente diferenciadas; y (iii) administrar las células de linaje restringido o las células completamente diferenciadas a un sujeto que lo necesite.

[000262] En otro método, el Método 39, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 37 o 38, en donde el sujeto es un ser humano que

tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad.

[000263] En otro método, el Método 40, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
5 Método 39, en donde la enfermedad es una enfermedad genéticamente hereditaria.

[000264] En otro método, el Método 41, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
Método 39 o 40, en donde las células comprenden además una
10 modificación genética que disminuye la expresión de un gen o de una proteína que está asociado/a con la enfermedad.

[000265] En otro método, el Método 42, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en
uno cualquiera de los Métodos 39 a 41, en donde la
15 modificación genética es capaz de tratar la enfermedad o los síntomas de la enfermedad.

[000266] En otro método, el Método 43, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en
uno cualquiera de los Métodos 37 a 42, en donde las células
20 se obtienen de una fuente distinta del sujeto.

[000267] En otro método, el Método 44, la presente divulgación proporciona un método de generación de una
célula donante universal, comprendiendo el método modificar
genéticamente una célula mediante (i) la introducción de
25 una delección y/o inserción de al menos un par de bases en el genoma de la célula en un sitio dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más de entre un antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II, o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo de MHC-I o
30 MHC-II; y (ii) la introducción en el genoma de la célula de una inserción de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico, en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro

del sitio de (i), generando así la célula donante universal.

[000268] En otro método, el Método 45, la presente divulgación proporciona un método de generación de una
5 célula donante universal, comprendiendo el método modificar genéticamente una célula mediante (i) la introducción de una delección y/o inserción de al menos un par de bases en el genoma de la célula en un sitio dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más de entre un antígeno
10 leucocitario humano MHC-I o MHC-II, o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo de MHC-I o MHC-II; y (ii) la introducción en el genoma de la célula de una inserción de al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en un locus seguro, generando así la
15 célula donante universal.

[000269] En otro método, el Método 46, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en los Métodos 44 o 45, en donde la célula donante universal tiene mayor evasión inmunitaria y/o mayor supervivencia
20 celular en comparación con una célula no modificada.

[000270] En otro método, el Método 47, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 44 a 46, en donde el al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios
25 humanos MHC-I o MHC-II, o el componente o el regulador de la transcripción del complejo de MHC-I o MHC-II es un gen MHC-I seleccionado entre HLA-A, HLA-B o HLA-C, un gen MHC-II seleccionado entre HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ o HLA-DR, o un gen seleccionado entre B2M, NLRC5,
30 CIITA, RFX5, RFXAP o RFXANK.

[000271] En otro método, el Método 48, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 44 a 47, en donde el al menos

un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico es uno o más polinucleótidos que codifican uno o más de PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 o CD47.

[000272] En otro método, el Método 49, la presente
5 divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 44 a 48, en donde al menos un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico está unido operativamente a un promotor exógeno.

[000273] En otro método, el Método 50, la presente
10 divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 49, en donde el promotor exógeno es un promotor constitutivo, inducible, temporal, específico del tejido o específico del tipo de célula, siendo el promotor constitutivo un promotor de CMV, EFla, PGK, CAG o UBC.

[000274] En otro método, el Método 51, la presente
15 divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 44 a 50, en donde la delección y/o inserción de (i) está dentro o cerca de B2M, y la inserción de (ii) es un polinucleótido que codifica PD-L1
20 o HLA-E.

[000275] En otro método, el Método 52, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 44 a 51, en donde el método comprende además introducir al menos una modificación
25 genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un factor de supervivencia en relación con una célula no modificada.

[000276] En otro método, el Método 53, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
30 Método 52, en donde la al menos una modificación genética que aumenta o disminuye la expresión de al menos un factor de supervivencia es una inserción de un polinucleótido que codifica MANF, que aumenta la expresión de MANF en relación

con la célula no modificada; o una delección y/o inserción de al menos un par de bases dentro o cerca de un gen que codifica ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK, que reduce o elimina la expresión de ZNF143, TXNIP, FOXO1 o JNK en relación con la célula no modificada.

5 [000277] En otro método, el Método 54, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 53, en donde el polinucleótido que codifica MANF se inserta en un locus seguro o en un gen que pertenece a un MHC-I, MHC-II o un regulador de la transcripción de MHC-I o MHC-II.

[000278] En otro método, el Método 55, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 44 a 54, en donde la modificación genética comprende administrar al menos un sistema de endonucleasa guiado por ARN a la célula.

15 [000279] En otro método, el Método 56, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 55, en donde el al menos un sistema de endonucleasa guiado por ARN es un sistema CRISPR que comprende una nucleasa CRISPR y un ARN guía.

[000280] En otro método, el Método 57, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 56, en donde la nucleasa CRISPR es Cas9, Cpf1, un homólogo de las mismas, una versión modificada de las mismas, una versión con optimización de codones de las mismas o cualquier combinación de las mismas.

25 [000281] En otro método, el Método 58, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 56 o 57, en donde la nucleasa CRISPR es una Cas9 de *S. pyogenes*.

30 [000282] En otro método, el Método 59, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en

uno cualquiera de los Métodos 56 a 58, en donde la nucleasa CRISPR comprende una señal de localización nuclear N-terminal (NLS) y/o una NLS C-terminal.

5 **[000283]** En otro método, el Método 60, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 56 a 59, en donde la nucleasa CRISPR y el ARN guía están presentes en una proporción en peso de 1:1.

10 **[000284]** En otro método, el Método 61, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 44 o 46 a 60, en donde la delección y/o inserción de (i) está dentro o cerca de un locus del gen B2M, y la inserción de (ii) es un polinucleótido que codifica PD-L1.

15 **[000285]** En otro método, el Método 62, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 61, en donde el ARN guía utilizado para (i) y (ii) comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una de las SEQ ID NO: 1-3 o 35-44.

20 **[000286]** En otro método, el Método 63, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 61 o 62, en donde el polinucleótido que codifica PD-L1 está flanqueado por (a) una secuencia de nucleótidos que tiene homología de secuencia con una región ubicada a la izquierda del sitio en (i) y (b) una secuencia de
25 nucleótidos que tiene homología de secuencia con una región ubicada a la derecha del sitio en (i).

[000287] En otro método, el Método 64, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
30 Método 63, en donde el polinucleótido que codifica PD-L1 se inserta en el locus del gen B2M dentro de 50 pares de bases del sitio en (i).

[000288] En otro método, el Método 65, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 63 o 64, en donde (a) consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13, y (b) consiste
5 esencialmente en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19.

[000289] En otro método, el Método 66, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 61 a 65, en donde el
10 polinucleótido que codifica PD-L1 está unido operativamente a un promotor exógeno, opcionalmente, en donde el promotor exógeno es un promotor de CAG.

[000290] En otro método, el Método 67, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en
15 uno cualquiera de los Métodos 44 a 66, en donde la célula es una célula de mamífero, opcionalmente, en donde la célula es una célula humana.

[000291] En otro método, el Método 68, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en
20 uno cualquiera de los Métodos 44 a 67, en donde la célula es una célula madre.

[000292] En otro método, el Método 69, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 44 a 68, en donde la célula
25 es una célula madre pluripotente (PSC), una célula madre embrionaria (ESC), una célula madre adulta (ASC), una célula madre pluripotente inducida (iPSC) o una célula madre y progenitora hematopoyética (HSPC).

[000293] En otro método, el Método 70, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en
30 uno cualquiera de los Métodos 44 a 69, en donde la célula es una célula diferenciada o una célula somática.

[000294] En otro método, el Método 71, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 44 a 69, en donde la célula donante universal es capaz de diferenciarse en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas.

[000295] En otro método, el Método 72, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 71, en donde las células progenitoras de linaje restringido son células progenitoras endodérmicas pancreáticas, células progenitoras endocrinas pancreáticas, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras musculares, blastocitos o células progenitoras neuronales.

[000296] En otro método, el Método 73, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 71, en donde las células somáticas completamente diferenciadas son células secretoras endocrinas tales como células beta pancreáticas, células epiteliales, células endodérmicas, macrófagos, hepatocitos, adipocitos, células renales, células sanguíneas o células del sistema inmunitario.

[000297] En otra composición, la Composición 37, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una pluralidad de células donantes universales generadas mediante un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 44 a 73.

[000298] En otra composición, la Composición 38, la presente divulgación proporciona una composición como la proporcionada en la Composición 37, en donde la pluralidad de células donantes universales se puede mantener durante un tiempo y en condiciones suficientes para que las células se sometan a diferenciación.

[000299] En otra composición, la Composición 39, la presente divulgación proporciona una composición que comprende células que comprenden (i) al menos una delección dentro o cerca de al menos un gen que codifica uno o más antígenos leucocitarios humanos MHC-I y MHC-II, o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo de MHC-I o MHC-II; y (ii) al menos una inserción de un polinucleótido que codifica al menos un factor tolerogénico en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de una delección genética de (i).

[000300] En otro método, el Método 74, la presente divulgación proporciona un método que comprende administrar a un sujeto la pluralidad de células donantes universales de la Composición 37 o 38.

[000301] En otro método, el Método 75, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método (i) obtener o haber obtenido la pluralidad de células donantes universales de la Composición 37 o 38 después de la diferenciación en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas; y (ii) administrar al sujeto las células progenitoras de linaje restringido o las células somáticas completamente diferenciadas.

[000302] En otro método, el Método 76, la presente divulgación proporciona un método de obtención de células para su administración a un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método (i) obtener o haber obtenido las células donantes universales de la Composición 37 o 38; y (ii) mantener las células donantes universales durante un tiempo y en condiciones suficientes para que las células se

diferencien en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas.

[000303] En otro método, el Método 77, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
5 Método 75 o 76, en donde las células progenitoras de linaje restringido son células progenitoras endodérmicas pancreáticas, células progenitoras endocrinas pancreáticas, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras musculares, blastocitos o células progenitoras neuronales.

10 **[000304]** En otro método, el Método 78, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 75 o 76, en donde las células somáticas completamente diferenciadas son células secretoras endocrinas tales como células beta pancreáticas, células
15 epiteliales, células endodérmicas, macrófagos, hepatocitos, adipocitos, células renales, células sanguíneas o células del sistema inmunitario.

[000305] En otro método, el Método 79, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en
20 uno cualquiera de los Métodos 74 a 78, en donde el sujeto es un ser humano que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad.

[000306] En otro método, el Método 80, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
25 Método 79, en donde la enfermedad es una enfermedad genéticamente hereditaria.

[000307] En otro método, el Método 81, la presente divulgación proporciona un método para generar una célula donante universal, comprendiendo el método administrar a
30 una célula madre pluripotente (PSC) (a) una nucleasa guiada por ARN; (b) un ARN guía (ARNg) dirigido a un sitio diana en un locus del gen beta-2-microglobulina (B2M); y (c) un vector que comprende un ácido nucleico, comprendiendo el

ácido nucleico (i) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la izquierda del sitio diana en el locus del gen B2M, (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un factor tolerogénico, y (iii) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha del sitio diana en el locus del gen B2M, donde el locus del gen B2M se escinde en el sitio diana y el ácido nucleico se inserta en el locus del gen B2M dentro de los 50 pares de bases del sitio diana, generando así una célula donante universal, en donde la célula donante universal tiene mayor evasión inmunitaria y/o mayor supervivencia celular en comparación con una PSC que no comprende el ácido nucleico insertado en el locus del gen B2M.

[000308] En otro método, el Método 82, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 81, en donde el ARNg comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3.

[000309] En otro método, el Método 83, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 81 u 82, en donde (i) consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13, y (iii) consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19.

[000310] En otro método, el Método 84, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 81 a 83, en donde el factor tolerogénico es el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) o el antígeno leucocitario E humano (HLA-E).

[000311] En otro método, el Método 85, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 81 a 84, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el factor

tolerogénico está unida operativamente a un promotor exógeno.

[000312] En otro método, el Método 86, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
5 Método 85, en donde el promotor exógeno es constitutivo, específico del tipo de célula, específico del tipo de tejido o regulado temporalmente.

[000313] En otro método, el Método 87, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
10 Método 85 u 86, en donde el promotor exógeno es un promotor de CAG.

[000314] En otro método, el Método 88, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 81 a 87, en donde el vector
15 es un vector plasmídico.

[000315] En otro método, el Método 89, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 88, en donde el vector plasmídico comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34.

20 **[000316]** En otro método, el Método 90, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 81 a 89, en donde la nucleasa guiada por ARN es una nucleasa Cas9.

[000317] En otro método, el Método 91, la presente
25 divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 90, en donde la nucleasa Cas9 se une a al menos una señal de localización nuclear (NLS).

[000318] En otro método, el Método 92, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
30 Método 90 o 91, en donde la nucleasa Cas9 es una Cas9 de *S. pyogenes*.

[000319] En otro método, el Método 93, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en

uno cualquiera de los Métodos 81 a 92, en donde la PSC es una célula madre embrionaria (ESC), una célula madre adulta (ASC), una célula madre pluripotente inducida (iPSC) o una célula madre y progenitora hematopoyética (HSPC).

- 5 **[000320]** En otro método, el Método 94, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 81 a 93, en donde la PSC es una PSC humana.

- 10 **[000321]** En otro método, el Método 95, la presente divulgación proporciona un método para generar una célula donante universal, comprendiendo el método administrar a una célula madre pluripotente (PSC) (a) una nucleasa guiada por ARN; (b) un ARN guía (ARNg) dirigido a un sitio diana en un locus del gen beta-2-microglobulina (B2M), en donde
15 el ARNg comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2; y (c) un vector que comprende un ácido nucleico, comprendiendo el ácido nucleico (i) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la izquierda del sitio diana en el locus del gen B2M que consiste
20 esencialmente en SEQ ID NO: 13, (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un factor tolerogénico, y (iii) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha del sitio diana en el locus del gen B2M que consiste esencialmente en SEQ ID NO: 19, en donde
25 el locus del gen B2M se escinde en el sitio diana y el ácido nucleico se inserta en el locus del gen B2M dentro de los 50 pares de bases del sitio diana, generando así la célula donante universal, en donde la célula donante universal tiene mayor evasión inmunitaria y/o mayor
30 supervivencia celular en comparación con una PSC que no comprende el ácido nucleico insertado en el locus del gen B2M.

[000322] En otro método, el Método 96, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 95, en donde el factor tolerogénico es el ligando 1 de muerte programada (PD-L1) o el antígeno leucocitario E humano (HLA-E).

[000323] En otro método, el Método 97, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 95 o 96, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el factor tolerogénico está unida operativamente a un promotor exógeno.

[000324] En otro método, el Método 98, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 97, en donde el promotor exógeno es constitutivo, específico del tipo de célula, específico del tipo de tejido o regulado temporalmente.

[000325] En otro método, el Método 99, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 97 u 98, en donde el promotor exógeno es un promotor de CAG.

[000326] En otro método, el Método 100, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 95 a 99, en donde el vector es un vector plasmídico.

[000327] En otro método, el Método 101, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el Método 100, en donde el vector plasmídico comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34.

[000328] En otro método, el Método 102, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 95 a 101, en donde la nucleasa guiada por ARN es una nucleasa Cas9.

[000329] En otro método, el Método 103, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el

Método 102, en donde la nucleasa Cas9 se une a al menos una señal de localización nuclear (NLS).

[000330] En otro método, el Método 104, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en el
5 Método 102 o 103, en donde la nucleasa Cas9 es una Cas9 de *S. pyogenes*.

[000331] En otro método, el Método 105, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en uno cualquiera de los Métodos 95 a 104, en donde la PSC es
10 una célula madre embrionaria (ESC), una célula madre adulta (ASC), una célula madre pluripotente inducida (iPSC) o una célula madre y progenitora hematopoyética (HSPC).

[000332] En otro método, el Método 106, la presente divulgación proporciona un método como se proporciona en
15 uno cualquiera de los Métodos 95 a 105, en donde la PSC es una PSC humana.

VII. Ejemplos

[000333] Los siguientes ejemplos describen la generación y
20 caracterización de células donantes universales de acuerdo con la presente divulgación. La Tabla 1 enumera los factores tolerogénicos y la Tabla 2 enumera los factores de supervivencia que pueden modificarse genéticamente en dichas células. Las FIG. **1A-1C** describen diversas
25 estrategias de edición de genes que pueden emplearse para la evasión inmunitaria.

Tabla 1. Factores tolerogénicos que pueden modificarse genéticamente

Factor	Desactivación (KO)	Inserción (KI)
HLA-E		+
HLA-G		+

5

CTLA-4		+
CD47		+
PD-L1		+
B2M	-	
HLA-ABC	-	
CIITA	-	

Tabla 2. Factores de supervivencia que pueden modificarse genéticamente

10

Factor	Desactivación (KO)	Inserción (KI)
ZNF143	-	
TXNIP	-	
FOXO	-	
JNK	-	
MANF		+

15

Ejemplo 1: Generación de iPSC con desactivación de B2M

20

[000334] Selección de ARN guía (ARNg) para B2M. Para identificar un amplio espectro de ARNg capaces de editar la región diana del ADN de B2M, se llevó a cabo un cribado de ARNg transcrito *in vitro* (IVT, In Vitro *Transcribed*). Los ARNg dirigidos a B2M se diseñaron para dirigirse al exón 1 del gen B2M. La secuencia genómica de B2M se remitió para su análisis usando un programa informático de diseño de ARNg. La lista resultante de ARNg se redujo a una lista de ~200 ARNg basándose en el carácter único de la secuencia (solo se exploraron ARNg sin una coincidencia perfecta en otra parte en el genoma) y los efectos fuera de la diana mínimos predichos. Este conjunto de ARNg se transcribió *in vitro* y se transfectó usando MessengerMax en células HEK293T que expresaban Cas9 de manera constitutiva. Las

25

30

células se recogieron 48 horas después de la transfección, se aisló el ADN genómico y se evaluó la eficacia de corte usando análisis TIDE. Se seleccionaron los ARN guía con alto nivel de indel y bajos efectos fuera de la diana predichos para un análisis más detallado. La Tabla 3 presenta las secuencias diana de los ARNg de B2M seleccionados.

Tabla 3. Secuencias diana de los ARNg de B2M seleccionados

10	Nombre	Secuencia diana (5'-3')	SEQ ID NO:	PA M
15	ARNg de B2M-1 (Exón 1_T12)	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC	1	TG G
20	ARNg para B2M-2 (Exón 1_T2)	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	2	TG G
25	ARNg para B2M-3 (Exón 1_T8)	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	3	CG G
30	Exón 1_T1	TATAAGTGGAGGCGTCGCGC	35	TG G
	Exón 1_T3	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	36	AG G
	Exón 1_T4	ACTGGACGCGTCGCGCTGGC	37	GG G
	Exón 1_T5	AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG	38	CG G

5	Exón 1_T6	GGCCACGGAGCGAGACATCT	39	CG G
	Exón 1_T7	GCCCGAATGCTGTCAGCTTC	40	AG G
	Exón 1_T9	CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	41	TG G
	Exón 1_T10	TCCTGAAGCTGACAGCATTC	42	GG G
	Exón 1_T11	TTCCTGAAGCTGACAGCATT	43	CG G
10	Exón 1_T13	ACTCTCTCTTTCTGGCCTGG	44	AG G

[000335] Cribado de ARNg de B2M en células IPSC. Se utilizaron tres ARNg (B2M-1, B2M-2 y B2M-3) para editar las iPSC. La ubicación de la secuencia diana de cada uno de estos ARNg se esquematiza en la FIG. 2. Se sometieron células IPSC (estirpe celular TC-1133, RUDCR, NJ) a nucleofección utilizando el nucleofector Lonza 4D y el kit de células primarias P3 (Lonza, n.º de cat. V4XP-3024) con una mezcla de RNP de Cas9 (Aldevron, n.º de cat. 9212-5MG) y ARNg (Synthego) en una proporción molar de 3:1 (ARNg:Cas9) con concentraciones finales de 125 pmol de Cas9 y 375 pmol de ARNg. Se disociaron las células utilizando Accutase (Stempro, n.º de cat. A1110501), luego se volvieron a suspender en medio DMEM/F12 (Gibco, n.º de cat. 11320033), se contaron utilizando un Cellometer (Nexcelon) y se centrifugaron. Las células se volvieron a suspender en tampón P3 con el suplemento 1 (proporción 4.5:1) a una concentración de 2×10^3 células/ μ L. Se combinó un total de 2×10^5 células con el complejo de RNP, se transfirieron a una cubeta de nucleofección (kit Lonza) y se sometieron a nucleofección utilizando el programa CA-137. Para cada

cubeta, se utilizaron 250 μ L de medio StemFlex (Gibco, n° de cat. A3349401) con CloneR (Stem Cell Technologies, n° de cat. 05888) (proporción 1:10) para volver a suspender las células nucleofectadas. Esta suspensión celular se dividió en dos pocillos de una placa de 24 pocillos recubierta con vitronectina (Gibco, n.° de cat. A14700) con 250 μ L adicionales de StemFlex con CloneR. Las células se recuperaron en una incubadora hipóxica (37°C, O₂ al 4%, CO₂ al 8%) durante 48 horas. Después de 48 horas, se extrajo ADN genómico de un pocillo de cada réplica técnica utilizando un kit de aislamiento de ADNg (Qiagen, n.° de cat. 69506)

[000336] El ADNg aislado se sometió a PCR para determinar la frecuencia de indel. La PCR para las regiones pertinentes se realizó utilizando Platinum Taq Supermix (Invitrogen, n° de cat. 125320176 y n° de cat. 11495017) con cebadores de B2M. Las secuencias de los cebadores se proporcionan en la Tabla 4 y las ubicaciones de los cebadores de B2M en relación con los sitios diana del ARNg se muestran en la FIG. 2. Las condiciones de ciclado se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 4. Cebadores TIDE de B2M

Nombre	Tipo	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
B2MF2	directo	CAGACAGCAAACCTACCCAG	4
B2MR2	inverso	AAACTTTGTCCCGACCCTCC	5

Tabla 5. Parámetros de ciclado de PCR de B2M

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	2 min	1
Desnaturalización	94°C	15 s	38

Hibridación	55°C°C	30 s	
Extensión	68°C	45 s	
Elongación	68°C	5 min	1
Mantener	4	mantener	

5

[000337] Los amplicones resultantes se enviaron para limpieza por PCR y secuenciación de Sanger. Los resultados de la secuenciación de Sanger se introdujeron en Tsunami junto con la secuencia guía. Los porcentajes y las

10 identidades de indel se calcularon con el software (FIG. **3A**). Los ARNg de B2M-1, B2M-2 y B2M-3 tenían frecuencias indel de $2.5\% \pm 1.1\%$, $87.6\% \pm 14.1\%$ y $63.9\% \pm 0.9\%$, respectivamente ($n = 2$). Las FIG. **3B y 3C** presentan distribuciones de los resultados de indel para los ARNg de

15 B2M-2 (FIG. **3B**) y B2M-3 (FIG. **3C**).

[000338] Las células del pocillo duplicado se mantuvieron hasta que confluyeron y luego se pasaron a recipientes de tamaños secuencialmente mayores. La población en masa se cambió a medios Advanced 20/10/10 (véase la Tabla 6) y

20 Laminina-521 (Stem Cell Technologies, n.º de cat. 77004) para mantenimiento.

Tabla 6. Formulación de medios Advanced 20/10/10

25	Reactivo	Cantidad	Concentración de trabajo	Información del reactivo
	DMEM/F12 Sin HEPES	955mL	Base	Gibco (11330032)
30	Normocina	2 mL		Invivogen (ANTNR1)

5	Aminoácidos no esenciales, 100x	10 mL	1x	Gibco (11140076)
	Lípidos definidos químicamente, 100x	2 mL	0.2x	Gibco (11905031)
	HSA al 20% (FAF)	5 mL	0.1%	Sigma (A1887)
10	Bicarbonato sódico al 7.5%	7 mL	0.0525%	Gibco (25080094)
15	Insulina humana, 4 mg/mL	5 mL	20 µg/µL	Invitrogen (12585014)
	Cloruro sódico, 250 mg/mL	2 mL	0.5 mg/mL	Sigma
	Ácido ascórbico, 200 mM	1 mL	200 µM	Sigma
20	Holo-transferrina, 10 mg/mL	1 mL	10 µg/mL	Sigma
25	Selenito de sodio, 140 µg/mL	100 µL	14 ng/mL	Sigma
	Para completar Advanced 20/10/10 (volumen de 1 L) se añade lo siguiente en el momento del primer uso			
	FGF básico, 100 µg/mL	200 µL	20 ng/mL	Peprotech
30	Activina A, 100 µg/mL	100 µL	10 ng/mL	Peprotech
	Heregulina, 100 µg/mL	100 µL	10 ng/mL	Peprotech

[000339] Generación y caracterización de clones IPS con KO de B2M.

Las poblaciones editadas en masa con secuencia verificada (FIG. 4A) se clasificaron en células individuales utilizando un FACS-ARIA (BD Bioscience) en placas de 96 pocillos recubiertas con vitronectina y se recuperaron en StemFlex con CloneR. En resumen, se disociaron las células de los matraces de mantenimiento utilizando Accutase y se volvieron a suspender en StemFlex con CloneR. A continuación, se contaron las células utilizando un celómetro y se diluyeron a $1 \times 10^5/\text{mL}$. Se filtraron 2 mL de esto a través de un filtro de células (Falcon, n.º 352235) en un tubo FACS, proporcionado al operador y se clasificaron células individuales en pocillos individuales. Se cultivaron células individuales en placa en una incubadora hipóxica (37°C , CO_2 al 8 %, O_2 al 4%) con cambios de medios cada dos días hasta que las colonias fueron lo suficientemente grandes para volver a sembrarse como células individuales. Cuando confluyeron, las muestras se dividieron para mantenimiento y extracción de ADN_g (véase lo anterior). La identidad del clon se confirmó mediante PCR y secuenciación de Sanger (véanse los detalles a continuación). La Tabla 7 presenta las secuencias de clones seleccionados alrededor del sitio de corte (las secuencias delecionadas e/o insertadas se muestran en **negrita**).

Tabla 7. Análisis de secuencias de clones con KO de B2M

Clon	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
WT	CT XCGC T CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	27
A9	CT XCGC GCTACTTA - - - - -GZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	28

5	A11	CT XCGC T T CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	29
	B10	CT AA ---- - ----GGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	30
	B12	CT XCGC T T CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	29
10	C5	CT XCGC - - - - -GCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	31
	C9	CT XCGC - CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	32
	C11	CT XCGC T T CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	29
	C12	CT XCGC T T CCGTGGZGCTA, X = N ₃₀ , Z = N ₁₆	29
15			

[000340] Se alinearon las secuencias de los clones en el software Snapgene para determinar la identidad de indel y la homocigosidad o heterocigosidad. Como se muestra en la FIG. **4B**, 8 clones resultaron ser homocigotos para KO de B2M y 7 clones resultaron ser heterocigotos para KO de B2M. Los clones homocigotos con las ediciones deseadas se expandieron y se verificaron adicionalmente mediante secuenciación y citometría de flujo. Los clones se mantuvieron inicialmente en medio StemFlex en placas recubiertas con vitronectina y luego finalmente se transfirieron al medio Advanced 20/10/10 y vasos recubiertos con Laminina-521.

[000341] Las células se mantuvieron adicionalmente en matraces recubiertos con Laminina-521 con Advanced 20/10/10. Se verificó la identidad de indel de los clones editados mediante PCR de la región B2M y la secuenciación de Sanger. Se verificó la desactivación mediante citometría de flujo para B2M y HLA-A (véanse las Tablas 8 y 9 para

consultar la lista de anticuerpos utilizados) y el análisis de qPCR de Taqman de la expresión de B2M utilizando protocolos Taqman convencionales (Taqman FastAdvanced Mastermix, ThermoFisher, n.º de cat. 4444556). Los niveles de expresión de B2M para tres clones con KO de B2M así como para células de tipo silvestre (no modificadas) se presentan en la FIG. 5. Los tres clones con KO probados mostraron una expresión de ARNm disminuida de B2M en relación con la célula de tipo silvestre.

Tabla 8. Anticuerpos para la citometría de flujo de pluripotencia

Diana	Fluoróforo	Fabricante	Numero de catalogo
SSEA-4	AlexaFluor 647	ThermoFisher	SSEA421
Tra-1-60	PE	ThermoFisher	MA1-023-PE
Tra-1-81	PE	BD Bioscience	560161

Tabla 9. Anticuerpos para B2M y HLA-ABC

Diana	Fluoróforo	Fabricante	Numero de catalogo
B2M	AlexaFluor 647	Biolegend	316311
HLA-ABC	FITC	BD Pharmigen	555552

[000342] La extracción de ARN se llevó a cabo usando el kit Qiagen RNeasy con ADNasa libre de ARNasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, n.º de cat. 74104 y 79254). La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando el kit de síntesis de ADNc Advanced iScript para RT-qPCR (BioRad, n.º de cat. 1725037) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se evaluó el estado cariotípico de los clones mediante el servicio Karyostat

(ThermoFisher) y el seguimiento de la anomalía cariotípica conocida BCL2L1 a través de ddPCR utilizando las instrucciones del fabricante y la supermezcla ddPCR para sondas (sin dUTP) (BioRad, n.º de cat. 1863024; cebadores de la Tabla 10) con una temperatura de hibridación de 59°C y RPP30 como ensayo de referencia.

Tabla 10. Conjuntos de sondas de cebador ddPCR

		BCL2L1 (diana)	SEQ ID NO:	RPP30 (Referencia)	SEQ ID NO:
10	Cebador directo	TCTGCAGAAGGCTACCCCTA	7	GATTTGGACCTGCGAGCG	9
15	Cebador inverso	TGCTGTGTCTAAGACCTCTT TCAT	8	CAAGCCTGGCAATAAACAAT GA	10
20	Sonda	Sonda universal n.º 44 (Sigma, n.º de cat. 4688040001)	-	5' VIC- CTGCTGCCTGAACAT-3'- MGB-NFQ	11

[000343] Los amplicones resultantes se verificaron en gel en un gel de agarosa al 2% prefabricado (ThermoFisher, n.º de cat. G501802), y se enviaron para limpieza por PCR y secuenciación de Sanger. Los archivos de secuenciación resultantes se introdujeron en el software Tsunami junto con la secuencia de ARNg y un archivo de secuencias de control para determinar la identidad y el porcentaje de indel.

[000344] También se confirmó que los clones eran negativos en la expresión de antígenos B2M y MHC de clase I (HLA-A, B, C), con o sin tratamiento con interferón gamma

(25 ng/mL, R & D Systems, 285-IF) a través del flujo citometría del mismo. Véanse las FIG. 6A-6D.

- [000345] Se confirmó que los clones conservaron la pluripotencia mediante citometría de flujo para los marcadores de superficie celular de pluripotencia (FIG. 7A-7D). La confirmación adicional de la pluripotencia incluyó Taqman Scorecard (ThermoFisher, n.º de cat. A15872), el servicio Thermo Pluritest y la diferenciación Trilineage (véase el protocolo completo a continuación).
- 10 [000346] Se disociaron las células y contaron como anteriormente, antes de la centrifugación y resuspensión en medio Advanced 20/10/10 con Y-27632 2 μ M (Tocris, n.º de cat. 1245) hasta 1×10^6 /mL. A continuación, se filtraron las células resuspendidas a través de un filtro 40 μ M
- 15 (Fisherbrand, n.º de cat. 22363547) y se sembraron 5 mL de la suspensión en un único pocillo de una placa de 6 pocillos de unión ultrabaja (Corning, n.º de cat. 3471). A continuación, se colocaron las células en un agitador orbital durante la noche a 98 rpm para formar agregados.
- 20 Después de 16 horas, se retiró el medio gastado de cada pocillo girando cuidadosamente la placa para recoger los agregados. Se añadieron 4 mL de Advanced 20/10/10 nuevo.
- [000347] Después de 24 horas más, se diferenciaron las células. Primero se recogieron los agregados en un tubo
- 25 cónico de 50 mL y se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto para sedimentar los agregados. Se aspiró el medio y se lavaron los agregados con DMEM/F12. Se volvieron a recoger los agregados de nuevo mediante centrifugación y se volvieron a suspender en 4 mL de los respectivos medios de
- 30 diferenciación antes de devolverlos a la placa y al agitador. Todas las diferenciaciones utilizaron los siguientes medios base: 480 mL de Glutamax+IMDM (Gibco, n.º de cat. 31980030), 480 mL de F12+Glutamax (Gibco, n.º de

cat. 31765035), 10 mL de aminoácidos no esenciales (Gibco, n.º de cat. 11140076), 5 mL de BSA al 20% (Sigma, n.º de cat. A7638-5G), 2 mL de lípidos químicamente definidos (Gibco, n.º de cat. 11905031), 1 mL de ácido ascórbico
5 200 mM (Sigma, n.º de cat. A4403-100MG), 1 mL de holo-transferrina a 10 mg/mL (Sigma, n.º de cat. T0665) y 100 µL de selenito de sodio a 140 µg/mL (Sigma, n.º de cat. S5261). Para diferenciar las células en una célula ectodérmica, se utilizó una concentración final de 4 mg/mL
10 de insulina (Gibco, n.º de cat. 12585014), A83-01 2 µM, dorsomorfina 2 µM (Peprtech, n.º de cat. 8666430) y PNU-74654 2 µM durante dos días. Para diferenciar las células en una célula mesodérmica, se utilizó una concentración final de 1 µg/mL de insulina, PIK-90 0.1 µM, CHIR99021 3 µM
15 (Peprtech, n.º de cat. 2520691) y LDN193189 0.5 µM (Peprtech, n.º de cat. 1062443) durante dos días. Para el día 1 de diferenciación del endodermo, se utilizó una concentración final de 0.2 µg/mL de insulina, PIK-90 0.1 µM, 100 ng/mL de Activina-A (Peprtech, n.º de cat.
20 120-00), CHIR99021 2 µM y 20 ng/mL de FGF básico (Peprtech, n.º de cat. 101-18b). Se llevaron a cabo dos días más de diferenciación para el endodermo con: 0.2 µg/mL de insulina, PIK-90 0.1 µM, 100 ng/mL de activina A y LDN193189 0.25 µM. Los medios se cambiaron a diario para
25 todas las diferenciaciones. Todos fueron recogidos para el análisis de ARN utilizando Taqman Scorecard el día 3.

Ejemplo 2: Mantenimiento y expansión celular.

[000348] Mantenimiento de hESC/hiPSC. Se mantuvieron, se cultivaron, se hicieron pasadas, se dejaron proliferar y se
30 sembraron células de la estirpe CyT49 de células madre embrionarias humanas (hESC) en placas como se describe en Schulz *et al.* (2012) PLoS ONE 7(5): e37004. Las células

CyT49 se disociaron utilizando ACCUTASE® (Stemcell Technologies 07920 o equivalente).

[000349] Se mantuvieron células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), tales como la estirpe celular TC1133 (Lonza), en StemFlex Complete (Life Technologies, A3349401) sobre placas de cultivo tisular recubiertas con BIOLAMININA 521 CTG (BioLamina n.º de cat. CT521). Las placas se recubrieron previamente con una dilución 1:10 o 1:20 de BIOLAMININA en DPBS, calcio, magnesio (Life Technologies, 14040133) durante 2 horas a 37°C. Las células se alimentaron diariamente con medio StemFlex. Para la pasada de las células, se utilizaron las mismas densidades de células que para CyT49. Para la siembra en placa de las células como células individuales, las células se sembraron en placa con Suplemento RevitaCell™ al 1% (100X) (Thermofisher n.º de cat. A2644501) en StemFlex sobre placas recubiertas con BIOLAMININA.

[000350] Clonación de células hPSC individuales. Para la clonación de células individuales, se alimentaron las hPSC (hESC o hiPSC) con StemFlex Complete con Revitacell (para una concentración final de 1X Revitacell) 3-4 horas antes de la disociación con ACCUTASE®. Tras la disociación, las células se clasificaron como una sola célula por pocillo de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos recubierta con BIOLAMININA. Se utilizó el clasificador WOLF FACS (Nanocollect) para clasificar las células individuales en los pocillos. Las placas se llenaron previamente con 100-200 µL de StemFlex Complete con Revitacell. Tres días después de la siembra celular, las células se alimentaron con StemFlex nuevo y se siguieron alimentando cada dos días con 100-200 µL de medio. Después de 10 días de crecimiento, las células se alimentaron diariamente con StemFlex hasta el día 12-14. En este momento, las placas se disociaron con

ACCUTASE® y las suspensiones de células recogidas se dividieron 1:2 con una mitad en una nueva placa de 96 pocillos para mantenimiento y la otra mitad en una solución de extracción de ADN QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Lucigen). Tras la extracción del ADN, se realizó una PCR para evaluar la presencia o ausencia de ediciones de genes deseadas en los locus de ADN diana. Se utilizó la secuenciación de Sanger para verificar las ediciones deseadas.

10 **[000351] Expansión de clones de hPSC derivados de células individuales.** Para CyT49, los clones dirigidos con éxito se pasaron a placas de 24 pocillos con medio XF KSR A10H10 puro al 10%, pero sobre placas recubiertas con BIOLAMININA. Tras la fase de 24 pocillos, los clones de CyT49 se pasaron como se describe en Schulz *et al.* (2012) PLoS ONE 7(5): e37004.

[000352] Para las hiPSC (TC1133), las células se mantuvieron en StemFlex Complete durante los procesos de clonación y mantenimiento regular sobre placas recubiertas con BIOLAMININA con Revitacell en las fases de pasada.

Ejemplo 3: Generación de células madre pluripotentes humanas (hPSC) con desactivación de B2M

[000353] Selección de ARN guía (ARNg) para B2M en hPSC. Se utilizaron los tres ARNg dirigidos a B2M descritos anteriormente en el Ejemplo 1 para dirigirse al gen B2M en las hPSC. Para evaluar su eficacia de corte en hPSC, las células CyT49 se sometieron a electroporación utilizando el electroporador de neón (kit de transfección de neón ThermoFisher n.º de cat. MPK5000) con una mezcla de ribonucleoproteína (RNP) de proteína Cas9 (Biomay) y ARN guía (Synthego) en una proporción molar de 3:1 (ARNg: Cas9) con valores absolutos de 125 pmol de Cas9 y 375 pmol de ARNg. Para formar el complejo de RNP, se combinaron ARNg y

Cas9 en un recipiente con tampón R (Kit de transfección Neon) hasta un volumen total de 25 µL y se incubaron durante 15 min a TA. Las células se disociaron utilizando ACCUTASE®, luego se volvieron a suspender en medio DMEM/F12 (Gibco, n.º de cat. 11320033), se contaron utilizando un NC-200 (Chemometec) y se centrifugaron. Se volvió a suspender un total de 1×10^6 células con el complejo de RNP y se añadió tampón R hasta un volumen total de 125 µL. A continuación, esta mezcla se sometió a electroporación con 2 pulsos durante 30 ms a 1100 V. Después de la electroporación, se pipetearon las células en un tubo Eppendorf lleno de medio StemFlex con RevitaCell. A continuación, se sembró esta suspensión celular en placas de cultivo tisular previamente recubiertas con BIOLAMININA 521 CTG a una dilución 1:20. Las células se cultivaron en una incubadora de normóxica (37°C, CO₂ al 8%) durante 48 horas. Después de 48 horas, se recogió el ADN genómico de las células utilizando QuickExtract (Lucigen, Middleton, WI; n.º de cat. QE09050).

[000354] Se realizó la PCR para la secuencia de B2M diana y se evaluó la eficacia de corte del ADN amplificado resultante mediante análisis TIDE. La PCR para las regiones pertinentes se realizó utilizando Platinum Taq Supermix (Invitrogen, n.º de cat. 125320176 y n.º de cat. 11495017). Las secuencias de los cebadores de PCR se presentan en la Tabla 4; y las condiciones del ciclado se proporcionan en la Tabla 5. Los amplicones resultantes se enviaron para limpieza por PCR y secuenciación de Sanger. Los resultados de la secuenciación de Sanger se introdujeron en el software Tsunami junto con la secuencia guía. Los porcentajes y las identidades de indel se calcularon con el software. A continuación, se seleccionaron ARNg particulares en función de su frecuencia de indel en las

hPSC. La FIG. 8 muestra la eficacia de corte para los 3
ARNg de B2M.

[000355] Se evaluaron los efectos fuera de la diana de los
ARNg seleccionados en el ADN derivado de células madre
5 utilizando un análisis de captura de híbridos de los sitios
predichos de similitud de secuencia. Las guías de B2M-2 y
B2M-3 no mostraron efectos detectables fuera de la diana.
Se escogió ARNg de B2M-2 para la generación de clones
adicional debido a su alta actividad en la diana y a su
10 actividad indetectable fuera de la diana.

**[000356] Generación y caracterización de clones de hPSC
con KO de B2M.** Utilizando ARNg de B2M-2, se sometieron a
electroporación hESC CyT49 y se clasificaron en células
individuales 3 días después de la electroporación
15 utilizando el clasificador WOLF FACS (Nanocollect) en
placas de 96 pocillos recubiertas con BIOLAMININA 521 CTG
con StemFlex y Revitacell. Se cultivaron células
individuales en placa en una incubadora normóxica (37°C,
CO₂ al 8 %) con cambios de medios cada dos días hasta que
20 las colonias fueron lo suficientemente grandes para volver
a sembrarse como células individuales. Cuando confluyeron,
las muestras se dividieron para mantenimiento y extracción
del ADN genómico.

[000357] El estado KO de B2M de los clones se confirmó
25 mediante PCR y secuenciación de Sanger. Las secuencias de
ADN resultantes de la región de B2M diana se alinearon en
el software Snapgene para determinar la identidad de indel
y la homocigosidad o heterocigosidad. Los clones con las
ediciones deseadas se expandieron y se verificaron
30 adicionalmente mediante la evaluación de citometría de
flujo para la expresión de B2M (véase la Tabla 11 para
consultar la lista de anticuerpos utilizados). Los clones
se evaluaron con o sin tratamiento con interferón-gamma

(25 ng/mL, R & D Systems, 285-IF). La FIG. **9A** muestra la expresión de B2M en células de tipo silvestre y la FIG. **9B** presenta la expresión de B2M en células con KO. El estado cariotípico de los clones se evaluó a través del servicio
 5 Cell Line Genetics (Madison, WI) y se presentó el cariotipo normal.

Tabla 11. Anticuerpos para la citometría de flujo de pluripotencia

10	Antígeno	Clon	Fluoróforo	Fabricante	N.º de catálogo
	Oct3/4	40/3	Alexa 647	BD Bioscience	560329
	SOX2	030-678	PE	BD Bioscience	562195
15	B2M	2M2	PE	Biolegend	316305
	HLA-ABC	W6/32	Alexa 488	Biolegend	311415
	mIgG1 kappa	N/A	PE	BD Bioscience	555749
20	PD-L1	B7-H1	Alexa-488	ThermoFisher	53-5983-42
	HLA-E	3D12	PE	ThermoFisher	12-9953-42

[000358] Se confirmó que los clones conservaron la
 25 pluripotencia mediante citometría de flujo intracelular para los marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2. Los clones pluripotentes confirmados se diferenciaron en células progenitoras endocrinas pancreáticas utilizando métodos previamente establecidos (Schulz *et al.* (2012) PLoS
 30 ONE 7(5): e37004).

Ejemplo 4: Generación de células madre pluripotentes humanas (hPSC) con desactivación de B2M e inserción de PD-L1

[000359] Diseño de la estrategia KO de B2M y KI de PD-L1.

El diseño del plásmido para insertar PD-L1 (CD274) en el locus de B2M se realizó de manera que el codón de partida de B2M se retiró después de someterse a reparación dirigida por homología (HDR) para insertar PD-L1, anulando cualquier posibilidad de expresión parcial de B2M. La FIG. 10 presenta un esquema del plásmido y la Tabla 12 identifica los elementos y las ubicaciones en el mismo. El plásmido donante contenía un ADNc dirigido por el promotor CAGGS de PD-L1 flanqueado por brazos de homología de 800 pares de bases con una secuencia idéntica al locus de B2M alrededor del exón 1. La secuencia completa del plásmido se presenta en SEQ ID NO: 33.

15

20

25

30

Tabla 12. Elementos del plásmido donante B2M-CAGGS-PD-L1

	Elemento	Ubicación (tamaño en pb)	SEQ ID NO:
5	ITR izquierda	1-130 (130)	12
	LHA-B2M	145-944 (800)	13
	potenciador de CMV	973-1352 (380)	14
	promotor de β -actina de pollo	1355-1630 (276)	15
10	intrón quimérico	1631-2639 (1009)	16
	PD-L1	2684-3556 (873)	17
15	Señal poli(A) de bGH	3574-3798 (225)	18
	RHA-B2M	3805-4604 (800)	19
20	ITR derecha	4646-4786 (141)	20

[000360] El ARNg de B2M-2 se utilizó para facilitar la inserción del transgén PD-L1 en el locus de B2M diana. El plásmido donante PD-L1 se introdujo junto con el complejo de RNP formado por el ARNg dirigido a B2M y la proteína Cas9. Por cada millón de células CyT49, se administraron 4 μ g de ADN plasmídico junto con el RNP. La electroporación se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3. Siete días después de la electroporación, las células se clasificaron para la expresión superficial de PD-L1 utilizando el clasificador WOLF FACS (Nanocollect) en placas de 96 pocillos recubiertas con BIOLAMININA 521 CTG con StemFlex con Revitacell. Para la clasificación FACS,

las células sin editar sirvieron como control negativo. Se seleccionaron células positivas en PD-L1 para la clasificación y clonación de células individuales.

[000361] Para detectar la expresión superficial de PD-L1, se utilizaron anticuerpos fluorescentes anti-PD-L1 (véase la Tabla 11). Se cultivaron células individuales en placa en una incubadora normóxica (37°C, CO₂ al 8 %) con cambios de medios cada dos días hasta que las colonias fueron lo suficientemente grandes para volver a sembrarse como células individuales. Cuando confluyeron, las muestras se dividieron para mantenimiento y extracción del ADN genómico.

[000362] Los clones dirigidos correctamente se identificaron mediante PCR para la inserción de PD-L1 (KI) utilizando cebadores que amplificaron una región desde fuera de los brazos de homología del plásmido a la inserción de ADNc de PD-L1 que permite la amplificación del DNA integrado con KI solamente. Se probó la cigosidad de la inserción en el diana mediante PCR para evaluar si la KI se produjo de manera heterocigota u homocigota. Cuando se identificaba un clon heterocigoto, el alelo negativo KI se enviaba para secuenciación de Sanger a fin de verificar si contenía una indel de alteración de B2M. Los clones con KI correctos con alteración completa de B2M (ya sea mediante inserción de KI o formación de indel) se expandieron en formatos de cultivo tisular crecientes hasta alcanzar un tamaño de población de 30 millones de células. Se expandieron aproximadamente 10 clones de esta manera, y se confirmó que eran pluripotentes analizando OCT4 y SOX2 mediante citometría de flujo intracelular (FIG. 11). Los clones que pasaron las pruebas anteriores se sometieron a pruebas adicionales para el análisis cariotípico (Cell Line Genetics), como se describe a continuación. Además, los

clones se probaron después para determinar su competencia para diferenciarse de precursores endodérmicos pancreáticos (PEC) a través del protocolo establecido (Schulz *et al.*

(2012) PLoS ONE 7(5): e37004), como se describe a

5 continuación. La pérdida de B2M se confirmó además por la falta de expresión de B2M con o sin tratamiento con interferón-gamma (25 ng/mL, R & D Systems, 285-IF) mediante citometría de flujo. Las FIG. **12A** y **12B** muestran la expresión de PD-L1 en células de tipo silvestre y con KO de
10 B2M/con KI de PD-L1, respectivamente.

Ejemplo 5: Generación de células madre pluripotentes humanas (hPSC) con desactivación de B2M e inserción de HLA-E

[000363] Diseño de la estrategia KO de B2M y KI de HLA-E.

15 El diseño del plásmido para insertar el trímero HLA-E en el locus de B2M se realizó de manera que el codón de partida de B2M se retiró después de someterse a reparación dirigida por homología (HDR) para insertar el trímero HLA-E, anulando cualquier posibilidad de expresión parcial de B2M.

20 La FIG. **13** presenta un esquema del plásmido y la Tabla 13 identifica los elementos y las ubicaciones en el mismo. El ADNc del trímero HLA-E estaba compuesto por un péptido señal B2M fusionado a un péptido de presentación HLA-G fusionado a la proteína de membrana B2M fusionada a la
25 proteína HLA-E sin su péptido señal. Este diseño de trímero se ha publicado anteriormente (Gornalusse *et al.* (2017)

Nat. Biotechnol. 35(8): 765-772). El plásmido donante para el administración de HLA-E contiene un promotor CAGGS que dirige la expresión del trímero HLA-E flanqueado por brazos
30 de homología de 800 pares de bases con una secuencia idéntica al locus de B2M alrededor del exón 1. La secuencia completa del plásmido se presenta en SEQ ID NO: 34.

Tabla 13. Elementos del plásmido donante B2M-CAGGS-HLA-E

	Elemento	Ubicación (tamaño en pb)	SEQ ID NO:
5	ITR izquierda	1-130 (130)	12
	LHA-B2M	145-944 (800)	13
	potenciador de CMV	973-1352 (380)	14
	promotor de β -actina de pollo	1355-1630 (276)	15
10	intrón quimérico	1631-2639 (1009)	16
	secuencia señal de B2M	2684-2743 (60)	21
	péptido HLA-G	2744-2770 (27)	22
	Enlazador GS	2771-2815 (45)	23
15	proteína de membrana B2M	2816-3112 (297)	24
	Enlazador GS	3113-3172 (60)	25
	HLA-E	3173-4183 (1011)	26
20	Señal poli(A) de bGH	4204-4428 (225)	18
	RHA-B2M	4435-5234 (800)	19
25	ITR derecha	5276-5416 (141)	20

[000364] El ARNg de B2M-2 se utilizó para facilitar la inserción del transgén HLA-E en el locus de B2M diana. El plásmido donante HLA-E se introdujo junto con el complejo de RNP formado por el ARNg dirigido a B2M y la proteína Cas9. Por cada millón de células CyT49, se administraron 4 μ g de ADN plasmídico junto con el RNP. La electroporación

se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 3. Siete días después de la electroporación, las células se clasificaron para la expresión superficial de HLA-E utilizando el clasificador WOLF FACS (Nanocellect) en placas de 96 pocillos recubiertas con BIOLAMININA 521 CTG con StemFlex con Revitacell. Para la clasificación FACS, las células sin editar sirvieron como control negativo. Se seleccionaron células positivas en HLA-E para la clasificación y clonación de células individuales.

10 **[000365]** Para detectar la expresión superficial de HLA-E, se utilizaron anticuerpos fluorescentes anti-HLA-E (véase la Tabla 11). Se cultivaron células individuales en placa en una incubadora normóxica (37°C, CO₂ al 8 %) con cambios de medios cada dos días hasta que las colonias fueron lo
15 suficientemente grandes para volver a sembrarse como células individuales. Cuando confluyeron, las muestras se dividieron para mantenimiento y extracción del ADN genómico.

[000366] Los clones dirigidos correctamente se
20 identificaron mediante PCR para la inserción de HLA-E (KI) utilizando cebadores que amplificaron una región desde fuera de los brazos de homología del plásmido a la inserción de ADNc de PHLA-E que permite la amplificación del DNA integrado con KI solamente. Se probó la cigosidad
25 de la inserción en el diana mediante PCR para evaluar si la KI se produjo de manera heterocigota u homocigota. Cuando se identificaba un clon heterocigoto, el alelo negativo KI se enviaba para secuenciación de Sanger a fin de verificar si contenía una indel de alteración de B2M. Los clones con
30 KI correctos con alteración completa de B2M (ya sea mediante inserción de KI o formación de indel) se expandieron en formatos de cultivo tisular crecientes hasta alcanzar un tamaño de población de 30 millones de células.

Se expandieron aproximadamente 10 clones de esta manera, y se confirmó que eran pluripotentes analizando OCT4 y SOX2 mediante citometría de flujo intracelular (FIG. 14). Los clones que pasaron las pruebas anteriores se sometieron a pruebas adicionales para el análisis cariotípico (Cell Line Genetics). Además, los clones se probaron para determinar su competencia para diferenciarse de precursores endodérmicos pancreáticos (PEC) a través del protocolo establecido (Schulz *et al.* (2012) PLoS ONE 7(5): e37004).

La pérdida de B2M se confirmó además por la falta de expresión de HLA-A,B,C con o sin tratamiento con interferón-gamma (50 ng/mL, R & D Systems, 285-IF) mediante citometría de flujo (FIG. 15). La FIG. 16 muestra la expresión de HLA-E.

Ejemplo 6: Análisis del cariotipo de los clones editados [000367] Análisis de cariotipado de la banda G de células madre embrionarias (ES) editadas. Se pasaron 1 millón de células ES editadas a un matraz de cultivo T-25 con medio de cultivo (DMEM/F12+ KSR libre de Xeno al 10% con 10 ng/mL de activina y 10 ng/mL de heregulina). Después de cultivar durante la noche, se enviaron tres matraces de cultivo T25 al Laboratorio de Citogenética (Cell Line Genetics, Inc.) para el análisis de cariotipado; Análisis FISH para los cromosomas 1, 12, 17, 20; y análisis de hibridación genómica comparativa de series (aCGH) con la serie patrón de 8x60K. Los resultados de la banda G de las células seleccionadas sometidas a electroporación con guías no cortante ("NCG"), clones con KO de B2M, clones HO para B2M/KI para PD-L1 ("V1-A") y clones con KO de B2M/KI de HLA-E ("V2-A") se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados del cariotipado de la banda G

	Estirpe celular	Tipo	Pasada	Análisis de cariotipado	Análisis FISH	Análisis de series de aCGH
5	NCG#1	guía no cortante	P36	Normal	Normal	APTA
	NCG#2	guía no cortante	P36	Normal	Normal	APTA
10	B2MKO#1	KO de B2M	P38	Normal	Normal	APTA
	B2MKO#2	KO de B2M	P36	Normal	Normal	APTA
	B2MKO#3	KO de B2M	P36	Normal	Normal	APTA
	V1-A003	KO de B2M/KI de PD-L1	P37	Normal	Normal	APTA
15	V1-A004	KO de B2M/KI de PD-L1	P38	Normal	Normal	APTA
	V1-A007	KO de B2M/KI de PD-L1	P37	Normal	Normal	APTA
20	V1-A008	KO de B2M/KI de PD-L1	P38	Normal	Normal	APTA
	V2-A005	KO de B2M/KI de HLA-E	P42	Normal	Normal	APTA
25	V2-A006	KO de B2M/KI de HLA-E	P38	Normal	Normal	APTA
30	V2-A007	KO de B2M/KI de HLA-E	P38	Normal	Normal	APTA

Ejemplo 7: Diferenciación de células madre embrionarias humanas editadas a células endodérmicas pancreáticas (PEC)

5 **[000368] Mantenimiento de células madre embrionarias humanas (ES) editadas.** Las células madre embrionarias

humanas editadas en diversos pasadas (P38-42) se sembraron a 33000 células/cm² para una pasada de 4 días o 50000 células/cm² para una pasada de 3 días con medio hESM (DMEM/F12+ KSR al 10%+ 10 ng/mL de Activina A y 10 ng/mL de Heregulina) y suero AB humano al 10% final.

10 **[000369] Agregación de células madre embrionarias humanas editadas para la diferenciación de PEC.** Se disociaron las ES editadas en células individuales con ACCUTASE® y luego se centrifugaron y se volvieron a suspender en StemPro al 2% (n.º de cat. A1000701, Invitrogen, CA) en medio DMEM/F12 a 1 millón de células por mL, y se sembró un total de 350-400 millones de células en un frasco rotatorio de 850 cm² (n.º de cat. 431198, Corning, NY) con una velocidad de rotación de 8 rpm ± 0.5 rpm durante 18-20 horas antes de la diferenciación. Los agregados de ES de células madre embrionarias humanas editadas se diferenciaron en linajes pancreáticos utilizando frascos rotatorios como se describe en Schulz *et al.* (2012) PLoS ONE 7(5): e37004.

25

Ejemplo 8: Caracterización de células endodérmicas pancreáticas diferenciadas (PEC)

30 **[000370] Citometría de flujo para FOXA2 y SOX17 en la fase 1 (DE) y CHGA, PDX1 y NKX6.1 en la fase de PEC.** Se lavaron los agregados de la fase 1 derivados de la hESC, o los agregados pancreáticos derivados de la hESC, con PBS y luego se disociaron enzimáticamente en una suspensión de células individuales a 37°C utilizando ACCUMAX™ (nº de

catálogo A7089, Sigma, MO). Se añadió tampón de separación MACS (n° de catálogo 130-091-221, Miltenyi Biotec, Renania del Norte-Westfalia, Alemania) y la suspensión se pasó a través de un filtro de 40 µm y se aglomeró. Para la tinción de marcadores intracelulares, se fijaron las células durante 30 minutos en paraformaldehído al 4% (p/v), se lavaron en tampón FACS (PBS, BSA al 0.1% (p/v), NaN₃ al 0.1% (p/v)) y luego las células se permeabilizaron con tampón Perm (PBS, Triton X-100 al 0.2% (v/v) (n.º de cat. A16046, Alfa Aesar, MA), suero de burro normal al 5% (v/v), NaN₃ al 0.1% (p/v)) durante 30 minutos en hielo y luego se lavaron con tampón de lavado (PBS, BSA al 1% (p/v), NaN₃ al 0.1% (p/v)). Se incubaron las células con anticuerpos primarios (Tabla 15) diluidos con tampón de bloqueo (PBS, Triton X-100 al 0.1% (v/v), suero de burro normal al 5% (v/v), NaN₃ al 0.1% (p/v)) durante la noche a 4°C. Las células se lavaron en tampón IC y luego se incubaron con anticuerpos secundarios apropiados durante 60 minutos a 4°C. Las células se lavaron en tampón IC y luego en tampón FACS. Los datos de citometría de flujo se adquirieron con el citómetro de flujo NovoCyte (ACEA Biosciences, Bruselas). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star, Inc.). Las células intactas se identificaron basándose en la dispersión de luz hacia adelante (ángulo bajo) y lateral (ortogonal, 90°). El fondo se estimó utilizando controles de anticuerpos y células indiferenciadas. En las figuras, se muestra un gráfico de citometría de flujo representativo para una de las subpoblaciones. Los números presentados en las figuras representan el porcentaje de células totales de la ventana de flujo de las células intactas.

Tabla 15. Anticuerpos para la citometría de flujo para la caracterización de PEC diferenciadas

Antígeno	Fluoróforo	Fuente	Dilución
SOX17	AF647	BD Bioscience (n.º de catálogo 562594)	1:50
FOXA2	PE	Miltenyi Biotechnology (n.º de cat. 130-107-773)	1:10
PDX1	PE	BD Bioscience (n.º de catálogo 562161)	1:2.5
NKX6.1	AF647	BD Bioscience (n.º de catálogo 563338)	1:2.5
CHGA	AF405	Novus (n.º de catálogo NBP2-33198AF405)	1:1000

[000371] En la fase de DE, la población de células doble positivas en FOXA2 y SOX17 fue más del 90% del total de las células diferenciadas a partir de los tipos silvestres de CyT49. Las células con KI de PD-L1/KO de B2M, KI de HLA-E/KO de B2M y KO de B2M mostraron un porcentaje de DE comparable al de las células de tipo silvestre (FIG. **17A-17B** y FIG. **18**).

[000372] En la fase de PEC, se realizó citometría de flujo para la cromogranina (CHGA), PDX1 y NKX6.1. La población heterogénea en la fase de PEC incluye células progenitoras pancreáticas, endocrinas tempranas (FIG. **19**). A la luz del gráfico circular de la población heterogénea (FIG. **20**), la distribución de las poblaciones de las células editadas diferenciadas (KI de PD-L1/KO de B2M o KO de B2M) fue muy similar a las células de tipo silvestre.

[000373] Secuenciación de ARN dirigida. La secuenciación de ARN dirigida para el análisis de la expresión génica se

realizó utilizando Illumina TruSeq y un panel personalizado de oligos dirigidos a 111 genes. El panel contenía principalmente genes que son marcadores de las fases de desarrollo durante la diferenciación pancreática. Al final de cada fase de diferenciación, se recogieron y extrajeron 10 µL de APV (volumen de aglomerados agregados) utilizando el protocolo de columna de centrifugación Qiagen RNeasy o RNeasy 96, incluyendo el tratamiento con ADNasa sobre la columna. La cuantificación y el control de calidad se realizaron utilizando TapeStation combinado con Qubit o utilizando Qiagen QIAxcel. Se procesaron 50-200 ng de ARN de acuerdo con el protocolo de preparación de la genoteca Illumina TruSeq, que consiste en la síntesis de ADNc, la hibridación del grupo de oligonucleótidos personalizado, el lavado, la extensión, la ligadura de los oligonucleótidos unidos, la amplificación por PCR de las genotecas y la limpieza. de las genotecas, antes de la cuantificación y el control de calidad de las genotecas de ADNbc resultantes utilizando TapeStation combinado con Qubit o utilizando Qiagen QIAxcel. Las genotecas se diluyeron posteriormente a una concentración de 4 nM y se combinaron, seguido de la desnaturalización, la adición de control de PhiX y una dilución adicional a 10-12 pM antes de cargarlas en el secuenciador Illumina MiSeq. Tras la ejecución de secuenciación, se realizó automáticamente el análisis de datos inicial a través de BaseSpace, generando recuentos de lectura sin procesar para cada una de las sondas personalizadas. Para cada gen, se sumaron estos recuentos de lectura para todas las sondas correspondientes a ese gen, con la adición de 1 recuento de lectura (para evitar divisiones entre 0 en dirección 3'). Se realizó la normalización para el gen SF3B2, y las lecturas se visualizaron normalmente como factor de cambio frente a la

fase 0. Cuando los datos se procesaron para el análisis de componentes principales, la normalización se realizó mediante el método DEseq. La expresión de genes seleccionados se mostró en la FIG. **21**. El patrón de expresión cinética de *FOXA2*, *CHGA*, *PDX1* y *NKX6.1* de las células con KI de PD-L1/KO de B2M o KO de B2M fue similar al de las células de tipo silvestre.

[000374] Confirmación de la expresión de B2M y PD-L1 en la fase de PEC. En la fase de PEC, se estimularon los

agregados diferenciados con o sin interferón-gamma (50 ng/mL) durante 48 horas. Los agregados se lavaron con PBS y luego se disociaron enzimáticamente en una suspensión de células individuales a 37°C utilizando ACCUMAX™ (n.º de catálogo A7089, Sigma, MO). Se añadió tampón de separación MACS (n.º de catálogo 130-091-221, Miltenyi Biotec, Renania del Norte-Westfalia, Alemania) y la suspensión se pasó a través de un filtro de 40 µm y se aglomeró. Para la tinción del marcador de superficie, se incubaron las células disociadas con anticuerpo conjugado con fluorescencia diluido en tampón de separación MACS durante 20 minutos y luego se lavaron en tampón de separación MACS. Las células se volvieron a suspender en tampón FACS para la adquisición del flujo. Los datos de citometría de flujo se adquirieron con el citómetro de flujo NovoCyte. Como se muestra en las FIG. **22A-22F**, la expresión de B2M estaba por debajo del límite de detección en las PEC diferenciadas a partir de células KI de PD-L1/KO de B2M o KO de B2M, y PDL1 se expresó en las PEC diferenciadas a partir de las células con KI de PD-L1/KO de B2M.

[000375] Fenotipo inmunitario de las células PEC. En la fase de PEC, se estimularon los agregados diferenciados con o sin interferón-gamma (50 ng/mL) durante 48 horas. Se recogieron los agregados para tinción con MHC de clase I y

II. No hay expresión de MHC de clase II en la fase de PEC de las células de tipo silvestre o editadas (células con KI de PD-L1/KO de B2M y KO de B2M) (FIG. **23D-23F**). La expresión de HLA-ABC (MHC de clase I) fue baja (1.3% a partir de células de tipo silvestre) y fue regulada a un nivel alto mediante la estimulación con IFN- γ . Sin embargo, HLA-ABC no se expresó ni siquiera bajo estimulación con IFN- γ en las células editadas (células con KI de PD-L1/KO de B2M y KO de B2M) (FIG. **23A-23C**).

Ejemplo 9: Ensayo de activación/proliferación de linfocitos T

[000376] Se probó la capacidad de las células diferenciadas en PEC para desencadenar una respuesta inmunitaria mediante ensayos de activación/proliferación de linfocitos T humanos *in vitro*. Se adquirieron PBMC donantes nuevas en Hemacare y se purificaron los linfocitos T CD3+ utilizando el kit de aislamiento de linfocitos T Pan, humano (Miltenyi n.º de cat. 130-096-535). Los linfocitos T aislados se marcaron con el protocolo del kit de proliferación celular CellTrace™ CFSE (Thermofisher n.º de cat. C34554) según las instrucciones del fabricante, y se incubaron conjuntamente con PEC diferenciadas durante 5 días. Se utilizaron las perlas Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 para la expansión y activación de los linfocitos T (Thermofisher n.º de cat. 11161D) como control positivo para activar los linfocitos T. Los linfocitos T solos se marcaron con CFSE y se utilizaron como control negativo. Se midió el porcentaje de células CD3+ CFSE+ para evaluar el porcentaje de proliferación de los linfocitos T (FIG. **24A-24D**). Las PEC WT generaron la proliferación de linfocitos T por encima del control de linfocitos T solo. Las PEC derivadas de CyT49 con KO de B2M y KO de B2M/KI de PD-L1 no generaron la proliferación de los linfocitos T por

encima del control de solo linfocitos T, mostrando la naturaleza hipoinmunogénica de las células editadas.

5

10

15

20

25

30