

CÉLULAS SEGURAS E INVISIBLES PARA EL SISTEMA INMUNITARIO

La presente invención se refiere al campo de las células de mamíferos y al uso de dichas células como células donantes para implantes.

5

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS COMO REFERENCIA

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud se presenta con un listado de secuencias en forma electrónica. Todo el contenido del listado de secuencias se incorpora de este modo como referencia.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se han investigado tejidos y/o células universalmente trasplantables con la esperanza de obtener beneficios significativos, tales como la reducción del riesgo al rechazo de injertos, por ejemplo, en el contexto de perfiles inmunológicos de donantes/receptores no compatibles o de afecciones autoinmunitarias tal como la diabetes mellitus tipo 1 (DT1).

15

Para limitar el riesgo al rechazo de injertos, el autotrasplante es una opción de manera que las células madre se extraen de un paciente, se expanden, se diferencian y se trasplantan posteriormente en el mismo paciente. Sin embargo, este proceso es técnicamente muy difícil y costoso.

20

El rechazo a la no compatibilidad de tejidos está mediado por los complejos peptídicos HLA (antígeno leucocitario humano) de clase I y la subsecuente destrucción de tejidos basada en células T. El agotamiento de los complejos peptídicos HLA de clase I absuelve el requisito de compatibilidad de tejidos para la mayoría de las células.

25

Existen 6 complejos peptídicos HLA de clase I: complejos peptídicos HLA de clase I altamente polimórficos HLA-A, HLA-B y HLA-C y complejos peptídicos HLA de clase I menos polimórficos HLA-E, -F y -G.

El agotamiento de los complejos peptídicos HLA de clase I puede lograrse a través de cualquiera de las dos trayectorias:

30

1) Mediante eliminación directa de los seis alelos de HLA de clase I altamente polimórficos, o

2) Mediante eliminación de la proteína beta 2 microglobulina (B2M). La B2M es necesaria para la translocación de todos los complejos HLA-I a la superficie celular. La ausencia de la proteína B2M deja la superficie celular desprovista de todos los complejos peptídicos HLA de clase I.

35

Si bien las células con deficiencia de pan-HLA de clase I están protegidas del rechazo a la no compatibilidad, son susceptibles al rechazo de células asesinas naturales (células NK) debido a la ausencia de complejos HLA-E de clase I. Cuando están presentes en la superficie celular, los complejos HLA-E de clase I suministran una señal inhibitoria a las células NK. En ausencia de complejos HLA-E, la pérdida de esta señal inhibitoria da como resultado la lisis de la célula con deficiencia de HLA mediante las células NK.

40

Los intentos de resolver este problema de la lisis por NK se basan en la expresión de variantes modificadas genéticamente de la proteína B2M fusionada a la proteína HLA-E (WO19032675). Un enfoque (Gornalusse y otros Nature Biotechnology 2017) es pre-construir un péptido señal (secuencia peptídica líder de HLA de clase I) en la proteína de fusión en forma de un trímero de péptido señal/B2M/HLA-E para aumentar la estabilidad y la expresión en membrana del complejo. Los programas de desarrollo más importantes usan constructos de fusión que incluyen un péptido señal derivado de HLA-G fusionado (o “preunido”) como péptido líder de HLA de clase I.

Un problema reconocido en la generación de células con deficiencia de HLA (también denominadas células “donantes universales”) es que se vuelven silentes a la vigilancia inmunitaria de la infección viral o la transformación neoplásica. Aún existe un riesgo asociado de que, tras la infección viral o dediferenciación maligna, las células ya no estén sometidas a la vigilancia inmunitaria regular y esto desencadena problemas de seguridad.

Aún existe una necesidad de células donantes universales seguras mejoradas.

Gornalusse G. y otros (Nature Biotechnology 2017) describen células madre pluripotentes que expresan HLA-E.

El documento WO2012145384 describe células con deficiencia de B2M.

El documento US8586358B2 describe células homocigotas para HLA que son homocigotas para un haplotipo de HLA.

El documento US20040225112A1 describe genes que codifican proteínas HLA-E de cadena única para prevenir la citotoxicidad mediada por células NK.

Deuse y otros (Nature Biotechnology, 2019) describen B2M y CIITA suprimidos y CD47 añadido.

El documento WO19032675 describe una célula T genéticamente modificada aislada que comprende secuencias que codifican una proteína de fusión que comprende una proteína B2M y proteína HLA-E y/o HLA-G.

El documento WO18005556 pretendidamente describe células que comprenden una molécula de MHC-E.

Young y otros Cancer Gen. Therapy (2000), 7:240-246 describe la muerte celular mediada por ganciclovir mediante el uso del gen de timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK).

SUMARIO

En un aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende un gen de B2M/HLA-E, tales como los genes de B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103, en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables. En una modalidad, dicha célula de mamífero tiene incorporaciones de al menos 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero que tiene incorporaciones de genes de B2M/HLA-E, tales como los genes de B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103 en una célula con deficiencia de B2M y HLA-II de cualquier otra manera, por ejemplo, célula con deficiencia de CIITA.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende un gen de B2M/HLA-E en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables, es con deficiencia de CIITA y tiene incorporaciones de 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende genes de B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103 en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables, es con deficiencia de CIITA y tiene incorporaciones de 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.

10 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- proporcionar una célula de mamífero,
 - incorporar al menos un gen de fusión de B2M/HLA-E, tal como un gen de B2M/HLA-E*0101 y/o un gen de B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero,
 - 15 • inactivar los genes de B2M naturales de dicha célula de mamífero,
- de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- proporcionar una célula de mamífero,
- 20 • incorporar al menos un gen de fusión de B2M/HLA-E, tal como un gen de B2M/HLA-E*0101 y/o un gen de B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero,
- inactivar los genes de B2M naturales de dicha célula de mamífero,
- diferenciar dicha célula de mamífero,

25 de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

En un aspecto, dicha célula de mamífero es una célula humana.

En un aspecto adicional, dicha célula de mamífero es una célula madre.

En un aspecto, dicha célula de mamífero es una célula madre embrionaria. En otro aspecto, dicha célula de mamífero es una célula madre pluripotente. Aún en otro aspecto, 30 dicha célula de mamífero está en una etapa diferenciada.

En una modalidad, el método de la presente invención comprende además una etapa de incorporación de al menos 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.

35 En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de una célula de mamífero de acuerdo con la invención para la prevención, tratamiento o cura de una enfermedad crónica.

En una modalidad, esta enfermedad crónica se selecciona del grupo que consiste en diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, degeneración macular seca, retinitis pigmentosa, enfermedad neurológica, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardíaca, 40 insuficiencia cardíaca crónica y enfermedad renal crónica.

La presente invención proporciona células donantes universales mejoradas. Las células de la presente invención son más universales y más seguras para los pacientes.

DEFINICIONES

Alelo:

El término “alelo” como se usa en la presente descripción significa una variante de un gen dado. Por ejemplo, HLA-E 01:01 y HLA-E 01:03 son variantes, también
5 denominadas alelos o isotipos, del gen de HLA-E.

B2M:

El término “B2M” como se usa en la presente descripción significa beta2-microglobulina, es decir, $\beta 2$ microglobulina. El término “gen de B2M” designa el gen que codifica la proteína B2M. La proteína B2M es una subunidad de todas las proteínas HLA
10 de clase I. La proteína B2M es necesaria para translocar las proteínas HLA de clase I a la superficie celular. En seres humanos, el gen de B2M se ubica en el cromosoma 15.

Célula con deficiencia de B2M:

El término “célula con deficiencia de B2M” como se usa significa una célula que no tiene un gen de B2M funcional. Por lo tanto, el gen de B2M puede estar completamente
15 ausente de la célula o puede estar funcionalmente defectuoso, por ejemplo, inactivado o dañado, de manera que no se expresa o no codifica una proteína B2M funcional.

Gen de B2M/HLA-E o proteína:

El término “gen de B2M/HLA-E” como se usa en la presente descripción es equivalente al “gen de fusión de B2M/HLA-E” y significa un constructo de fusión genética
20 que codifica una proteína que comprende una parte B2M y una parte HLA-E, que es equivalente a la “proteína de fusión B2M/HLA-E”. Como se usa en la presente descripción, a menos que se especifique de cualquier otra manera, los términos “gen de B2M/HLA-E” y “proteína de fusión B2M/HLA-E” se refieren a cualquiera de las versiones funcionales de los mismos, en donde el gen tiene la capacidad de expresar la proteína de
25 fusión correspondiente y en donde la proteína de fusión B2M/HLA-E expresada tiene la capacidad de translocarse a la superficie celular.

Proteína B2M/HLA-E*0101:

El término “proteína B2M/HLA-E*0101” como se usa en la presente descripción significa una proteína de fusión que comprende una parte “B2M” y una parte “HLA-E” en
30 donde la parte HLA-E es del isotipo 01:01, también denominada el alelo 01:01, es decir, una fusión que comprende un péptido funcional B2M y un péptido funcional HLA-E 01:01.

Gen de B2M/HLA-E*0101:

El término “gen de B2M/HLA-E*0101” como se usa en la presente descripción significa un constructo de fusión genética que codifica una proteína B2M/HLA-E*0101.

HLA/MHC:

El término “HLA” significa antígeno leucocitario humano. Como se usa en la presente descripción, HLA se refiere al bien conocido sistema HLA responsable de la regulación del sistema inmunitario en mamíferos. Los “genes de HLA” codifican para
“proteínas HLA”, también denominadas “proteínas MHC”. “MHC” significa “complejo
40 principal de histocompatibilidad”.

Las “proteínas HLA” funcionales (o “proteínas MHC”) se translocan a la superficie celular e inducen una respuesta inmunitaria según sea necesario. En seres humanos, los genes de HLA se ubican en el cromosoma 6.

Las proteínas HLA de clase I son heterodímeros y comprenden las proteínas HLA-A, HLA-B y HLA-C, que son altamente polimórficas, y las proteínas HLA-E, HLA-F y HLA-G, que son menos polimórficas. Las proteínas HLA de clase I se encuentran normalmente en toda la superficie de células nucleadas en seres humanos.

5 El papel de las proteínas HLA de clase I es presentar pequeños péptidos, denominados en la presente descripción “péptidos endógenos”, desde el interior de la célula en la superficie exterior de la célula. En caso de infección celular, los péptidos HLA de clase I presentan a la superficie celular exterior un pequeño péptido del patógeno invasor (por ejemplo, un virus), que se reconocerá como “no propio” (o “extraño” o
10 “antígeno”) e induce una respuesta inmunitaria mediante la destrucción de las células por el sistema inmunitario. En ausencia de infección celular, los péptidos HLA de clase I presentan a la superficie celular exterior un pequeño péptido endógeno, por ejemplo, de HLA-E (fragmentos HLA-E) que se reconocerá como “propio” (o “antígeno propio”) y no inducirá una respuesta inmunitaria.

15 Las proteínas HLA de clase II son heterodímeros y comprenden HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ y HLA-DR. Las proteínas HLA de clase II se encuentran normalmente en células presentadoras de antígeno profesionales.

El papel de las proteínas HLA de clase II es presentar antígenos derivados principalmente de fuentes exógenas a la superficie celular e iniciar una respuesta
20 inmunitaria específica del antígeno (a través de linfocitos T CD4(+)).

Genotipo celular:

Una “célula con gen A ^{-/-}” significa una célula en donde ambas copias del gen A no son funcionales, por ejemplo, se eliminan o se interrumpen de cualquier otra manera. Una “célula con gen A ^{+/-}” significa una célula en donde una copia del gen A es funcional y la
25 segunda copia no es funcional, por ejemplo, se elimina o se interrumpe de cualquier otra manera. Una “célula con gen A⁺” significa que la célula comprende solo una copia del gen A y que dicha copia del gen A es funcional.

Fenotipo de superficie celular:

Como se usa en la presente descripción, la expresión “fenotipo de superficie celular de células HLA-A/B/C^{-/-}” se refiere a una superficie celular sin proteínas HLA-A, HLA-B y
30 HLA-C.

Como se usa en la presente descripción, la expresión “fenotipo de superficie celular de células HLA-E*0101⁺ HLA-E*0103⁺” se refiere a una superficie celular que comprende proteínas HLA-E*0101 y proteínas HLA-E*0103 como se expresa a partir de una copia de
35 cada alelo de HLA-E.

Deficiencia de CIITA / CIITA:

El término CIITA significa “clase II, complejo principal de histocompatibilidad, transactivador”. El término CIITA, como se usa en la presente descripción, designa el “gen de CIITA” o la “proteína CIITA”, es decir, la proteína codificada por el gen de CIITA. La
40 proteína CIITA es un factor de transcripción implicado en la transcripción de todos los péptidos HLA de clase II. En el genoma humano, la proteína CIITA se ubica en el cromosoma 16.

El término “deficiencia de CIITA” como se usa en la presente descripción significa “sin un gen de CIITA funcional”. Una “célula con deficiencia de CIITA” significa una célula que no expresa una proteína CIITA funcional, por ejemplo, el gen de CIITA de la célula se ha suprimido o inactivado de cualquier otra manera o expresa una proteína no funcional.

- 5 En una célula con deficiencia de CIITA, se eliminan todas las proteínas HLA de clase II.

Ubicaciones distintas y conocidas:

La expresión “en ubicación(ones) conocida(s)”, como se usa en la presente descripción, significa “en un locus diana”. La expresión se refiere a una modificación génica, tal como inserción, eliminación o interrupción, en un locus diana específico (ubicación) en el genoma, como opuesto a la modificación génica aleatoria en una ubicación aleatoria en el genoma. En particular, en relación con la incorporación, la expresión “en ubicación(ones) distinta(s) y conocida(s)” significa que un gen de interés no se inserta en una ubicación aleatoria en el genoma, sino que se inserta en un locus que se ha predeterminado y dirigido específicamente. Esto proporciona la ventaja de garantizar un nivel consistente de expresión del gen insertado y, por ejemplo, dirigirse a los loci de puerto seguro.

La expresión “en ubicaciones distintas” como se usa en la presente descripción significa “en diferentes loci en el genoma”. La expresión se refiere, por ejemplo, a más de una inserción de secuencia de ácidos nucleicos, donde dichas 2 o más secuencias de ácidos nucleicos no se insertan en el mismo locus en el genoma, es decir, en la misma posición en el genoma. Por el contrario, dichas 2 o más secuencias de ácidos nucleicos se insertan en diferentes loci en el genoma. Por ejemplo, si se inserta en el mismo cromosoma, las 2 o más secuencias están separadas entre sí por una serie de nucleótidos después de la inserción. La expresión “ubicaciones distintas” puede incluir el mismo locus ubicado en 2 cromosomas de un par de cromosomas.

Promotores EF1a mini, EF1a, UbC, PGK, CMV y CAG:

El promotor EF1a significa promotor del factor de elongación 1 α humano, el promotor UbC significa promotor de ubiquitina C humano, el promotor PGK significa promotor de fosfoglicerato quinasa 1 de ratón, el promotor CMV significa promotor inmediato-temprano de citomegalovirus, el promotor CAG (o CAGG) significa promotor de β -Actina de pollo acoplado con un potenciador temprano de CMV. Estos promotores son promotores constitutivos que pueden usarse para conducir la expresión génica ectópica.

UCO y UCOE:

UCOE significa elemento de apertura de cromatina ubicuo. Los elementos UCO evitan el silenciamiento de los promotores. Un elemento UCO puede colocarse aguas arriba de un promotor.

Heterocigoto para HLA-E:

Una célula que comprende al menos dos alelos diferentes para el gen de HLA-E, tal como que comprende un gen de HLA-E*0101 y un gen de HLA*0103, es heterocigota para HLA-E.

Genes de HSV-TK:

El término “HSV-TK”, como se usa en la presente descripción, significa timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV) y representa un sistema de interruptor

suicida. El gen de HSV-TK codifica una enzima TK. Para desencadenar el suicidio de las células HSV-TK⁺, se proporciona ganciclovir a las células HSV-TK⁺ o al organismo que hospeda dichas células, la enzima TK fosforila el ganciclovir en un compuesto tóxico que inhibe la ADN polimerasa y desencadena la muerte de las células HSV-TK⁺.

5 Incorporación y supresión:

El término “incorporación”, como se usa en la presente descripción se refiere a la inserción de un gen en un genoma. Con las técnicas de incorporación, la inserción del gen es dirigida, lo que significa que el gen se inserta en un locus específico, en una ubicación en el genoma que se ha predefinido y está específicamente dirigido, como opuesto a una inserción génica aleatoria con otros métodos de ingeniería genética.

El término “supresión”, como se usa en la presente descripción, se refiere a la eliminación o inactivación por alteración de un gen a partir de un genoma. Para lograr la eliminación o destrucción de un gen de interés dado, las técnicas de supresión generalmente requieren una modificación genética en una ubicación específicamente dirigida en el genoma.

Existen varias técnicas de incorporación y supresión y están bien definidas en la técnica.

Célula de mamífero:

El término “célula de mamífero” como se usa en la presente descripción significa una célula que se origina a partir de un organismo vivo de mamífero, tal como una célula animal de mamífero o una célula humana. La célula de mamífero puede estar en una etapa no diferenciada, por ejemplo, en una etapa pluripotente o multipotente, o en una etapa diferenciada, tal como una etapa completamente madura, o en una etapa intermedia de diferenciación.

25 Tipo HLA compatible:

El término “HLA compatible” o “tipo HLA compatible” como se usa en la presente descripción significa un isotipo de HLA que es suficientemente similar entre una célula donante y un organismo huésped para no inducir el rechazo de la célula donante por el sistema inmunitario. En los mamíferos, las proteínas HLA son exclusivas a los individuos. El sistema inmunitario de un organismo huésped reconocerá las proteínas HLA “no compatibles” en la superficie celular exterior de una célula donante (por ejemplo, una célula o células injertadas en un órgano injertado) como “no propias” (o “invasoras”) e inducirá una respuesta inmunitaria y rechazo de la célula donante. Si las proteínas HLA de una célula donante son de un isotipo igual o suficientemente similar a las proteínas HLA de un organismo huésped, es decir, del tipo HLA compatible con el organismo huésped, el sistema inmunitario reconocerá las células donantes como “propias” y no inducirá rechazo de la célula donante.

Polimórfico:

El término “polimórfico” como se usa en la presente descripción significa que existen diferentes isotipos de un gen dado dentro de una célula dada. El polimorfismo en el sistema HLA permite una respuesta inmunitaria más efectiva y adaptativa.

Proteína, péptido:

A menos que se especifique de cualquier otra manera, los términos “proteína” y “péptido” se refieren a una versión funcional de la misma.

Puerto seguro:

El término “sitio de puerto seguro” o “locus de puerto seguro” o “sitio de puerto genómico seguro” como se usa en la presente descripción significa una ubicación en el genoma que se expresa constantemente, que no se silencia, por ejemplo, debido al silenciamiento epigenético o la regulación negativa de la actividad de transcripción. AAVS1 y hROSA16 son ejemplos de sitios de puerto seguro en el genoma humano. “AAVS1” significa sitio de integración 1 del virus adenoasociado y se ubica en el cromosoma humano 19. “hROSA26” significa la “versión humana de Gt(ROSA)26S” o “versión humana de ROSA26” y se ubica en el cromosoma 3 humano. CLYBL y CCR5 son otros posibles sitios de puerto seguro, “CLYBL” significa “tipo beta citrato liasa” y se ubica en el cromosoma 13 humano, “CCR5” significa “tipo receptor de quimocina C-C 5” y se ubica en el cromosoma 5 humano.

Célula universalmente implantable, célula trasplantable, célula implantable o célula donante universal:

Los términos “célula universalmente trasplantable/implantable” o “célula universal” o “célula donante universal” o “célula trasplantable” o “célula segura para el sistema inmunitario” o “célula invisible” o “célula invisible para el sistema inmunitario” o “célula implantable” como se usa en la presente descripción todos designan una célula que puede trasplantarse a un organismo huésped sin que sea reconocida como no propia, por lo tanto, sin que sea rechazada por el sistema inmunitario del organismo huésped. La célula generalmente se origina de un organismo donante que es diferente del organismo huésped. Un propósito de la presente invención es proporcionar células que pueden implantarse de manera segura en una amplia variedad de pacientes sin ser rechazadas.

Célula de mamífero implantable y célula de mamífero:

En el contexto del(de los) método(s) de la invención, las reivindicaciones del método y las modalidades del método, el término “célula de mamífero” se refiere a una célula antes de la terminación de la(s) modificación(ciones) genética(s) de la invención, el término “célula de mamífero implantable” se refiere a una célula que comprende la(s) modificación(ciones) genética(s) de la invención.

FIGURAS

La figura 1 es una ilustración de una modalidad de unos constructos génicos de B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103 y su incorporación en el locus B2M en el cromosoma 15 humano de acuerdo con la presente invención. Los constructos génicos ilustrados comprenden un promotor, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido señal, un B2M que codifica la secuencia de ácidos nucleicos, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un enlazador (G4S)4 y un HLA-E*0101 que codifica la secuencia de ácidos nucleicos para uno de los constructos génicos o un HLA-E*0103 que codifica la secuencia de ácidos nucleicos para el constructo génico. La flecha  ilustra un promotor que conduce la expresión del constructo génico.

La figura 2 es una ilustración de una modalidad de 2 genes de HSV-TK incorporados en los loci de puerto seguro de acuerdo con la presente invención, tales como los loci de puerto AAVS1 (PPP1R12C) en el cromosoma 19, hROSA26 en el cromosoma 3, CCR5 en el cromosoma 5 o CLYBL en el cromosoma 13. Los constructos
 5 génicos ilustrados comprenden un promotor y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína HSV-TK. La flecha  ilustra un promotor que conduce la expresión del constructo génico.

La figura 3 muestra imágenes de cultivos celulares tras la exposición a diversas concentraciones de ganciclovir (GCV).

10

DESCRIPCIÓN

En un aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende al menos un gen de B2M/HLA-E en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables.

15

En otro aspecto la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende un gen de B2M/HLA-E en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables y tiene incorporaciones de al menos 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.

20

En una modalidad, dicha célula de mamífero comprende genes de B2M/HLA-E. En una modalidad, dicha célula comprende un tipo de alelo de B2M/HLA-E, es decir, una variante de HLA-E en la fusión B2M/HLA-E. En una modalidad, la variante de HLA-E en la(s) fusión(ones) B2M/HLA-E es el alelo HLA-E*01:01 o es el alelo HLA-E*01:03.

25

En una modalidad, dicha célula de mamífero comprende dos alelos de B2M/HLA-E diferentes, es decir, dicha célula es heterocigota para el gen de B2M/HLA-E. En una modalidad, las variantes de HLA-E en las fusiones B2M/HLA-E es el alelo HLA-E*01:01 y el alelo HLA-E*01:03.

30

En un aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende un gen de fusión B2M/HLA-E*0101 o B2M/HLA-E*0103 en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables. En un aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero que comprende genes de B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103 en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables.

35

En la presente invención, el gen de **B2M/HLA-E*0101** codifica una proteína B2M/HLA-E*0101.

En una modalidad, la proteína B2M/HLA-E*0101 comprende una proteína B2M, una proteína HLA-E*0101 y un enlazador entre la proteína B2M y la proteína HLA-E*0101. En una modalidad, la parte B2M se ubica en el extremo N-terminal y la parte HLA-E se ubica en el extremo C-terminal de la proteína de fusión B2M/HLA-E*0101.

40

En una modalidad, la proteína B2M/HLA-E*0101 comprende además un péptido señal.

En una modalidad, la proteína B2M/HLA-E*0101 comprende un péptido señal, una proteína B2M, una proteína HLA-E*0101 y un enlazador entre la proteína B2M y la proteína HLA-E*0101. En una modalidad, el péptido señal se ubica en el extremo N-

terminal, seguido por la proteína B2M y un enlazador, y la proteína HLA-E se ubica en el extremo C-terminal de la proteína de fusión B2M/HLA-E*0101.

En una modalidad, el enlazador entre la proteína B2M y la proteína HLA-E*0101 es un enlazador (G4S)⁴.

5 En la presente invención, el gen de **B2M/HLA-E*0103** codifica una proteína B2M/HLA-E*0103. El término “B2M/HLA-E*0103” como se usa en la presente descripción pretende significar una fusión entre una beta 2 microglobulina (B2M) y un HLA-E*0103.

En una modalidad, la proteína B2M/HLA-E*0103 comprende una proteína B2M, un péptido HLA-E*0103 y un enlazador entre la proteína B2M y el péptido HLA-E*0103. En una modalidad, la parte B2M se ubica en el extremo N-terminal y la parte HLA-E se ubica en el extremo C-terminal de la proteína de fusión B2M/HLA-E*0103.

En una modalidad, la proteína B2M/HLA-E*0103 comprende además un péptido señal.

En una modalidad, la proteína B2M/HLA-E*0103 comprende un péptido señal, una proteína B2M, una proteína HLA-E*0103 y un enlazador entre la proteína B2M y la proteína HLA-E*0103. En una modalidad, el péptido señal se ubica en el extremo N-terminal, seguido por la proteína B2M y un enlazador, y la proteína HLA-E se ubica en el extremo C-terminal de la proteína de fusión B2M/HLA-E*0103.

En una modalidad, el enlazador entre la proteína B2M y la HLA-E*0103 es un enlazador (G4S)⁴.

En una modalidad preferida, las proteínas de fusión B2M/HLA-E*0101 y/o B2M/HLA-E*0103 retienen la capacidad de unirse además a un péptido endógeno antes de la translocación a la superficie celular. Esto es posible por la ausencia de una secuencia peptídica líder de HLA de clase I preunida (tal como VMAPRTLIL) como parte de dicha proteína de fusión. En una modalidad, las proteínas de fusión B2M/HLA-E*0101 y/o B2M/HLA-E*0103 no comprenden una secuencia peptídica líder de HLA de clase I preunida.

En una modalidad, la parte HLA-E*0101 de la proteína de fusión B2M/HLA-E*0101 comprende la secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO: 01]:

30 GSHSLKYFHTSVSRPGRGEPFRFISVG YVDDTQFVRFDNDAASPRMVPRAPWMEQ
EGSEYWDRETRSARDTAQIFRVNLRTRLRGYYNQSEAGSHTLQWMHGCELGPDRRFLRG
YEQFAYDYGKDYLTNLNEDLRSWTAVDTAAQISEQKSNDASEAEHQRAYLEDTCVEWLHKY
LEKGKETLLHLEPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQQDGEGHTQDTELV
ETRPAGDGTQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTLRWKPASQPTIPIVGIIAGL
35 VLLGSVVS GAVVA A VIWRKKSSGGKGSYSKA EWSDSAQGS ESHSL.

En una modalidad, la parte B2M de la proteína de fusión B2M/HLA-E*0101 o de la proteína de fusión B2M/HLA-E*0103 comprende la secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO: 02]:

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFS
40 KDWSFYLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWDRDM.

En una modalidad, la parte HLA-E*0103 de la proteína de fusión B2M/HLA-E*0103 comprende la secuencia de aminoácidos [SEQ ID NO: 03]:

GSHSLKYFHTSVSRPGRGEPRFISVG YVDDTQFVRFDNDAASPRMVP RAPWMEQEGSE
 YWDRETRSARDTAQIFRVNLRTL RGYYNQSEAGSHTLQWMHGCELGP DGRFLRGYEQF
 AYDGKDYLTLNEDLRSWTAVDTAAQISEQKSNDA SEAEHQRAYLEDTCVEWLHKYLEKG
 KETLLHLEPPKTHVTHHPISDHEATLR CWALGFYP AEITLTWQQDGEGHTQDTEL VETRP
 5 AGDGT FQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTLRWKPASQPTIPIVGIIAGLVLLG
 SVVSGAVVA AVIWRKKSSGGKGGSYSKA EWSDSAQGS ESHSL.

En una modalidad, la proteína de fusión B2M/HLA-E*0101 que comprende un
 enlazador (G4S)₄ y un péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos [SEQ ID
 NO: 04]:

10 MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK
 NGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPT EKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDMG
 GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSLKYFHTSVSRPGRGEPRFISVG YVDDTQFVRFDN
 DAASPRMVP RAPWMEQEGSEYWDRETRSARDTAQIFRVNLRTL RGYYNQSEAGSHTLQ
 WMHGCELGP DRRFLRGYEQFAYDGKDYLTLNEDLRSWTAVDTAAQISEQKSNDA SEAE
 15 HQRAYLEDTCVEWLHKYLEKGKETLLHLEPPKTHVTHHPISDHEATLR CWALGFYP AEITL
 TWQQDGEGHTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTL
 RWKPASQPTIPIVGIIAGLVLLG SVVSGAVVA AVIWRKKSSGGKGGSYSKA EWSDSAQGS
 ESHSL.

En una modalidad, la proteína de fusión B2M/HLA-E*0103 que comprende un
 20 enlazador (G4S)₄ y un péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos [SEQ ID
 NO: 05]:

MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK
 NGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPT EKDEYACRVNHVTL SQPKIVKWDRDMG
 GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSHSLKYFHTSVSRPGRGEPRFISVG YVDDTQFVRFDN
 25 DAASPRMVP RAPWMEQEGSEYWDRETRSARDTAQIFRVNLRTL RGYYNQSEAGSHTLQ
 WMHGCELGP DGRFLRGYEQFAYDGKDYLTLNEDLRSWTAVDTAAQISEQKSNDA SEAE
 HQRAYLEDTCVEWLHKYLEKGKETLLHLEPPKTHVTHHPISDHEATLR CWALGFYP AEITL
 TWQQDGEGHTQDTEL VETRPAGDGT FQKWA AVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTL
 RWKPASQPTIPIVGIIAGLVLLG SVVSGAVVA AVIWRKKSSGGKGGSYSKA EWSDSAQGS
 30 ESHSL.

En una modalidad, el gen de B2M/HLA-E*0101 que codifica para una proteína de
 fusión B2M/HLA-E*0101 con un enlazador (G4S)₄ y un péptido señal comprende la
 secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO 06:

ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAG
 35 GCTATCCAGCGTACTCCAAAGATT CAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAA
 AGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGA
 CTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATT CAGACTTGTCTTTCAGC
 AAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGATG
 AGTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGT CACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGG
 40 ATCGAGACATGGGTGGTGGCGGTTCTGGTGGTGGCGGTAGTGGCGGCGGAGGAAG
 CGGTGGTGGCGGTTCCGGTTCCCACTCCTTGAAGTATTTCCACACTTCCGTGTCCCG
 GCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCTCTGTGGGCTACGTGGACGACACCCAGT
 TCGTGCGCTTCGACAACGACGCCGCGAGTCCGAGGATGGTGCCGCGGGCGCCGTG

GATGGAGCAGGAGGGGTCAGAGTATTGGGACCGGGAGACACGGAGCGCCAGGGAC
 ACCGCACAGATTTTCCGAGTGAACCTGCGGACGCTGCGCGGCTACTACAATCAGAGC
 GAGGCCGGTTCTCACACCCTGCAGTGGATGCATGGCTGCGAGCTGGGGCCCGACAG
 GCGCTTCCTCCGCGGGTATGAACAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTATCTCACCT
 5 GAATGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGTGGACACGGCGGCTCAGATCTCCGAGC
 AAAAGTCAAATGATGCCTCTGAGGCGGAGCACCAGAGAGCCTACCTGGAAGACACAT
 GCGTGGAGTGGCTCCACAAATACCTGGAGAAGGGGAAGGAGACGCTGCTTCACCTG
 GAGCCCCCAAAGACACACGTGACTCACCACCCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTG
 AGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCAGGA
 10 TGGGGAGGGCCATACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGAT
 GGAACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGAGCAGAGATA
 CACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTACCCGAGCCCGTCACCCTGAGATGGAAGC
 CGGCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTG
 GATCTGTGGTCTCTGGAGCTGTGGTTGCTGCTGTGATATGGAGGAAGAAGAGCTCAG
 15 GTGGGAAAGGAGGGAGCTACTCTAAGGCTGAGTGGAGCGACAGTGCCCAGGGGTCT
 GAGTCTCACAGCTTG.

En una modalidad, el gen de B2M/HLA-E*0103 que codifica para una proteína de fusión B2M/HLA-E*0103 con un enlazador (G4S)₄ y un péptido señal comprende la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO 07:

20 ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAG
 GCTATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGTCTATCCAGCAGAGAATGGAA
 AGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGA
 CTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATTACAGACTTGTCTTTCAGC
 AAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGATG
 25 AGTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGG
 ATCGAGACATGGGTGGTGGCGGTTCTGGTGGTGGCGGTAGTGGCGGCGGAGGAAG
 CGGTGGTGGCGGTTCCGGTTCCCACTCCTTGAAGTATTTCCACACTTCCGTGTCCCG
 GCCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCTCTGTGGGCTACGTGGACGACACCCAGT
 TCGTGCGCTTCGACAACGACGCCGCGAGTCCGAGGATGGTGCCGCGGGCGCCGTG
 30 GATGGAGCAGGAGGGGTCAGAGTATTGGGACCGGGAGACACGGAGCGCCAGGGAC
 ACCGCACAGATTTTCCGAGTGAACCTGCGGACGCTGCGCGGCTACTACAATCAGAGC
 GAGGCCGGTTCTCACACCCTGCAGTGGATGCATGGCTGCGAGCTGGGGCCCGACG
 GGCGCTTCCTCCGCGGGTATGAACAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTATCTCACCC
 TGAATGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCGGTGGACACGGCGGGCTCAGATCTCCGAG
 35 CAAAAGTCAAATGATGCCTCTGAGGCGGAGCACCAGAGAGCCTACCTGGAAGACACA
 TGCGTGGAGTGGCTCCACAAATACCTGGAGAAGGGGAAGGAGACGCTGCTTCACCT
 GGAGCCCCCAAAGACACACGTGACTCACCACCCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCT
 GAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCAGG
 ATGGGGAGGGCCATACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGA
 40 TGGAACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGAGCAGAGAT
 ACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTACCCGAGCCCGTCACCCTGAGATGGAAG
 CCGGCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTT
 GGATCTGTGGTCTCTGGAGCTGTGGTTGCTGCTGTGATATGGAGGAAGAAGAGCTCA

GGTGGGAAAGGAGGGAGCTACTCTAAGGCTGAGTGGAGCGACAGTGCCCAGGGGT
CTGAGTCTCACAGCTTG.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula de mamífero que tiene incorporaciones tanto de genes de B2M/HLA-E*0101 como de B2M/HLA-E*0103 en una célula con deficiencia de B2M de cualquier otra manera.

En una modalidad, el gen de B2M/HLA-E se inserta en el locus del gen de B2M natural, en el cromosoma 5 en el caso de una célula humana. En una modalidad, una copia del gen de B2M/HLA*0101 y una copia del gen de B2M/HLA*0103 se insertan en el locus de cada una de las dos copias del gen de B2M natural de la célula, que inactiva de esta manera, el gen de B2M natural. Un ejemplo se ilustra en la figura 1.

En una modalidad, el gen de B2M/HLA no comprende una secuencia que codifica un péptido líder de HLA de clase I preunido y la proteína B2M/HLA no comprende un péptido líder de HLA de clase I preunido.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el uso de constructos de fusión de genes de B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103 que no comprenden una secuencia que codifica un péptido líder de HLA de clase I preunido en células con deficiencia de B2M genera el fenotipo de superficie celular de células HLA-A/B/C^{-/-} HLA-E*0101⁺ HLA-E*0103⁺ con una densidad de HLA-E alta y robusta, máxima diversidad de unión a péptido endógeno, protección óptima contra la lisis de células diana no infectadas mediada por células NK y reconocimiento mejorado y eliminación óptima por las células NK de células de mamífero diana infectadas con virus u otro patógeno.

La presente invención permite ventajosamente A) aumentar constitutivamente la densidad de proteínas HLA-E en la superficie de la célula donante para inhibir el rechazo mediado por células NK de células con deficiencia de B2M, B) retener las funciones normales de vigilancia inmunitaria de HLA-E a través de la unión a péptidos endógenos naturales (que da como resultado una ligera reducción de la capacidad tolerogénica), C) maximizar la diversidad de péptidos endógenos potenciales unidos a las proteínas HLA mediante la inclusión de múltiples isotipos de HLA-E y D) mitigar el riesgo de infección viral o desdiferenciación maligna de las células que ya no están sometidas a vigilancia inmunitaria regular.

Para proporcionar una densidad de HLA-E aumentada y lograr la ventaja A) a través de un promotor no natural, se insertan en la célula dos, en lugar de uno, alelos de los genes de B2M/HLA-E. Para lograr la ventaja B), los inventores usan un gen de B2M/HLA-E que codifica una proteína de fusión B2M/HLA-E que carece de modificación genética previa, es decir, péptido líder de HLA de clase I preunido, y que a su vez utiliza mecanismos de procesamiento y carga de péptidos endógenos naturales. Para lograr la ventaja C) se utilizan ambos alelos principales de HLA-E, HLA-E*0101 y HLA-E*0103. Las dos proteínas HLA-E*0101 y HLA-E*0103 codificadas cargan y presentan diferentes subconjuntos de péptidos endógenos, lo que aumenta de esta manera la posibilidad de que las proteínas HLA se carguen adecuadamente con péptido endógeno tolerogénico en circunstancias normales y con el péptido endógeno de activación durante la infección viral. Para lograr la ventaja D) los inventores han introducido 4 copias del gen de HSV-TK que sirven como un interruptor robusto que puede matar rápidamente las células si así se

desea. La combinación de varias modificaciones contienen el potencial tanto para la retención celular sustancialmente mejor como para la vigilancia inmunitaria en condiciones de infección.

Ventajosamente, la combinación de la carga de péptidos endógenos normal (al no
5 usar un péptido preunido) y múltiples isotipos de HLA-E permite la vigilancia inmunitaria
expandida de las células para la infección viral y/o bacteriana mientras que conserva un
fenotipo tolerogénico máximo. Durante la infección, varios péptidos de patógenos virales o
bacterianos pueden desplazar a los péptidos endógenos normales de HLA-E. Cuando
10 HLA-E presenta péptidos derivados de patógenos, estimula la lisis por NK de la célula
infectada; al contrario de HLA-E con un péptido preunido que indicaría un “estado
saludable” a las células NK, no estimularía la lisis por NK y de esta manera proporciona
una función de tolerancia). Esta es una característica de seguridad importante lograda
con la presente invención.

En una modalidad, la célula de mamífero de la presente invención tiene deficiencia
15 de HLA-II. En una modalidad, la célula de mamífero tiene deficiencia de CIITA.

Puede usarse cualquier tecnología de edición génica disponible y relevante
(CRISPR, TALEN, ZFN, endonucleasa de referencia, recombinación adenoviral, etc.) para
modificar las células de manera que ambos alelos de la B2M natural se suprimen mientras
que simultáneamente se incorporan una o más copias de cada uno de los genes de
20 B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103.

La incorporación de los genes de B2M/HLA-E, tales como los genes de B2M/HLA-
E*0101 y B2M/HLA-E*0103, puede realizarse directamente sobre el locus del gen de B2M
natural, sobre otros loci, tales como los loci de puerto seguro, tal como el locus de puerto
seguro AAVS1, o cualquier combinación de los mismos. Puede usarse cualquier promotor
25 disponible para estos genes incorporados, por ejemplo, un promotor seleccionado del
grupo que consiste en EF1a mini, EF1a, UbC, PGK, CMV y CAG. De acuerdo con la
presente invención, el aumento conveniente en la densidad de HLA-E se obtiene a través
de incorporaciones de HLA-E bialélicas controladas por promotores constitutivamente
activos. En una célula natural, los promotores de HLA-E endógenos están controlados por
30 elementos de respuesta de IFN gamma del promotor.

De manera similar, los genes de HSV-TK pueden incorporarse en las ubicaciones
convenientes, es decir, en los loci dianas. Puede usarse cualquiera de las tecnologías de
edición génica disponible y relevante.

Las células de la presente invención comprenden al menos 4 genes de HSV-TK en
35 ubicaciones distintas y conocidas.

En la presente invención, los genes de HSV-TK sirven como un sistema de
‘interruptor suicida’ inducible para controlar la supervivencia de la célula de mamífero
modificada genéticamente, por ejemplo, en un organismo huésped. El concepto de un
interruptor suicida implica la introducción genómica de un gen que hace que la célula sea
40 sensible a una molécula exógena, que puede administrarse cuando sea necesario. El gen
de HSV-TK codifica una timidina quinasa que convierte el fármaco antiviral de molécula
pequeña común ganciclovir en una sustancia tóxica dentro de la célula que expresa la
HSV-TK. Un problema con dichos genes suicidas es que, en teoría, podrían inactivarse o

eliminarse por eliminación genómica espontánea o corte y empalme del promotor, lo que daría como resultado la pérdida del control previsto por el 'interruptor suicida'.

En una modalidad de la invención, los genes suicidas de HSV-TK se colocan en los loci de puerto seguro en el genoma. En una modalidad de la invención, la expresión de HSV-TK es conducida por un promotor con un elemento UCO aguas arriba. En una modalidad de la invención, la expresión de genes suicidas de HSV-TK está conducida por un promotor UbC con un elemento UCO aguas arriba.

En una modalidad de la presente invención, se insertan cuatro copias del gen suicida de HSV-TK en el genoma de la célula.

En una modalidad de la presente invención, las incorporaciones de 4 genes de HSV-TK, es decir, de 4 copias del gen de HSV-TK, se encuentran en ubicaciones distintas, es decir, en ubicaciones en el genoma que tienen cierta separación, tal como para proporcionar un sistema seguro que no pueda deteriorarse debido a reordenamientos o eliminaciones genéticas. En una modalidad, los 4 genes de HSV-TK se incorporan en el mismo cromosoma y se separan entre sí por al menos 10 Kpb, tal como al menos 100 Kpb, al menos 1 Mpb o al menos 20 Mpb. En otra modalidad, los 4 genes de HSV-TK se incorporan en ubicaciones en 4 cromosomas diferentes. En otra modalidad, los 4 genes de HSV-TK se incorporan en ubicaciones en 3 cromosomas diferentes. En otra modalidad, los 4 genes de HSV-TK se incorporan en ubicaciones en 2 cromosomas diferentes, tales como dos copias de HSV-TK en la misma ubicación en cada uno de los cromosomas 3 y dos copias de HSV-TK en la misma ubicación en ambos cromosomas 19 en una célula diploide. En otra modalidad de la presente invención, 2 genes de HSV-TK se incorporan en sitios de puerto genómico seguro. En otra modalidad, un gen de HSV-TK se incorpora para interrumpir y eliminar un alelo de B2M. En otra modalidad, un gen de HSV-TK se incorpora para eliminar un alelo de CIITA.

La seguridad de los pacientes es un parámetro muy importante en la terapia celular.

Al insertar 4 copias del gen suicida de TK también aumenta ventajosamente la seguridad a los pacientes. Sorprendentemente, se encontró que una célula con 4 copias del gen suicida de TK es significativamente más sensible al tratamiento con ganciclovir que una célula con 2 copias, lo que logra la muerte celular con menores cantidades de ganciclovir.

Al colocar los genes suicidas de TK en ubicaciones predefinidas, conocidas, aumenta ventajosamente la seguridad a los pacientes en comparación con la integración aleatoria en un genoma celular. En comparación con la integración aleatoria, la integración dirigida disminuye el riesgo de alteración de genes importantes o de la regulación de la expresión de genes importantes. También disminuye el riesgo de que los genes suicidas se integren aleatoriamente en una región de actividad de expresión subóptima. De esta manera, se garantiza un nivel de expresión de TK óptimo.

Al colocar los genes suicidas de TK en ubicaciones distintas aumenta además la seguridad de los pacientes al limitar el riesgo de que todas las copias del gen suicida de TK se silencien o se regulen negativamente una vez en el caso de que sus loci de inserción se expongan al silenciamiento génico o a la regulación negativa de la transcripción.

Al colocar los genes suicidas de TK en los loci de puerto seguro aumenta ventajosamente la seguridad a los pacientes. Los loci de puerto seguro son regiones del genoma que se expresan constantemente. Este enfoque disminuye el riesgo de que los genes suicidas se silencien o regulen negativamente de manera involuntaria, lo que
 5 aumenta de esta manera la posibilidad de un nivel de expresión óptimo de la proteína TK suicida en todo momento y subsecuentemente una muerte celular controlada cuando sea necesario tras la administración de ganciclovir.

Resulta que al colocar 4 copias de genes suicidas de TK en ubicaciones conocidas y distintas, tales como los loci de puerto seguro, proporcionan seguridad
 10 significativamente mejorada para pacientes que reciben terapia celular según la presente invención.

En una modalidad, se incorporan al menos 2 genes de HSV-TK en un sitio de puerto seguro, tal como el locus del gen de AAVS1 o el locus del gen de hROSA26 o el locus del gen de CLYBL. En una modalidad, se incorporan 2 genes de HSV-TK en un sitio de
 15 puerto seguro, tal como el locus del gen de AAVS1 o el locus del gen de hROSA26 o el locus del gen de CLYBL y se incorporan 2 genes de HSV-TK en el locus del gen de CIITA.

En otra modalidad, se incorporan 2 genes de HSV-TK en un sitio de puerto seguro y se incorporan 2 genes de HSV-TK en otro sitio de puerto seguro y se suprime el locus del
 20 gen de CIITA. En una modalidad más específica, se incorporan 2 genes de HSV-TK en el locus del gen de AAVS1 y se incorporan 2 genes de HSV-TK en el locus del gen de CLYBL y se suprime el gen de CIITA.

En una modalidad, un gen de B2M/HLA-E se incorpora en los loci del gen de B2M, que inactiva de esta manera el gen de B2M natural de la célula. En una modalidad, un
 25 gen de B2M/HLA-E*01:01 o un gen de B2M/HLA-E*01:03 se incorpora en los loci del gen de B2M, que inactiva de esta manera el gen de B2M natural de la célula. En una modalidad, un gen de B2M/HLA-E*0101 se incorpora en el locus de una copia del gen de B2M, un gen de B2M/HLA-E*0103 se incorpora en el locus de la otra copia del gen de B2M, que inactiva de esta manera el gen de B2M natural de la célula. En una modalidad,
 30 se incorporan 2 genes de HSV-TK en los loci del gen de AAVS1 y se incorporan 2 genes de HSV-TK en los loci del gen de CIITA, que inactiva de esta manera el gen de CIITA natural de la célula. La inactivación del gen de CIITA natural de la célula conduce al agotamiento en las proteínas HLA-II.

En una modalidad, un gen de B2M/HLA-E*0101 se incorpora en el locus de una
 35 copia del gen de B2M, un gen de B2M/HLA-E*0103 se incorpora en el locus de la otra copia del gen de B2M, 2 copias del gen de HSV-TK se incorporan en los loci de puerto seguro, tal como el gen de AAVS1 y 2 genes de HSV-TK se incorporan en los loci del gen de CIITA.

En una modalidad, un gen de B2M/HLA-E*0101 se incorpora en el locus de una
 40 copia del gen de B2M, un gen de B2M/HLA-E*0103 se incorpora en el locus de la otra copia del gen de B2M, 2 copias del gen de HSV-TK se incorporan en los loci del gen de AAVS1, 2 genes de HSV-TK se incorporan en los loci del gen de CLYBL y el gen de CIITA se suprime, es decir, ambas copias del gen de CIITA se suprimen.

Los 4 genes de HSV-TK se expresan preferentemente en un grado donde cada uno de ellos solo mataría a dicha célula de mamífero tras la exposición al ganciclovir.

En una modalidad, la proteína HSV-TK comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08:

5 MASYPGHQHASAFDQAARSRGHSNRRTALRPRRQEQATEVRPEQKMPTLLRVYIDGPH
 GMGKTTTTQLLVALGSRDDIVYVPEPMTYWRVLGASETIANIYTTQHRLDQGEISAGDAA
 VVMTSAQITMGMPYAVTDAVLAPHIGGEAGSSHAPPPALTLIFDRHPAALLCYPARYLM
 GSMTQAVLAFVALIPPTLPGTNIVLGALPEDRHIDRLAKRQRPGERLDLAMLAAIRRVYG
 LLANTVRYLQCGGSWREDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGPRPHIGDTLFTLFRAPELLA
 10 PNGDLYNVFAWALDVLAKRLRSMHVFILDYDQSPAGCRDALLQLTSGMVQTHVTTGPSIP
 TICDLARTFAREMGEAN

En una modalidad, el gen de HSV-TK que codifica una proteína HSV-TK comprende la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO 09:

ATGGCTTCTTACCCTGGACACCAGCATGCTTCTGCCTTTGACCAGGCTGCCAG
 15 ATCCAGGGGCCACTCCAACAGGAGAACTGCCCTAAGACCCAGAAGACAGCAGGAAG
 CCACTGAGGTGAGGCCTGAGCAGAAGATGCCAACCTGCTGAGGGTGTACATTGAT
 GGACCTCATGGCATGGGCAAGACCACCACCACTCAACTGCTGGTGGCACTGGGCTC
 CAGGGATGACATTGTGTATGTGCCTGAGCCAATGACCTACTGGAGAGTGCTAGGAGC
 CTCTGAGACCATTGCCAACATCTACACCACCCAGCACAGGCTGGACCAGGGAGAAAT
 20 CTCTGCTGGAGATGCTGCTGTGGTGATGACCTCTGCCCAGATCACAATGGGAATGCC
 CTATGCTGTGACTGATGCTGTTCTGGCTCCTCACATTGGAGGAGAGGCTGGCTCTTC
 TCATGCCCCCTCCACCTGCCCTGACCCTGATCTTTGACAGACACCCCATTGCAGCCCT
 GCTGTGCTACCCAGCAGCAAGGTACCTCATGGGCTCCATGACCCACAGGCTGTGC
 TGGCTTTTGTGGCCCTGATCCCTCCAACCCTCCCTGGCACCAACATTGTTCTGGGAG
 25 CACTGCCTGAAGACAGACACATTGACAGGCTGGCAAAGAGGCAGAGACCTGGAGAG
 AGACTGGACCTGGCCATGCTGGCTGCAATCAGAAGGGTGTATGGACTGCTGGCAAA
 CACTGTGAGATACCTCCAGTGTGGAGGCTCTTGAGAGAGGAGTGGGGACAGCTCT
 CTGGAACAGCAGTGCCCCCTCAAGGAGCTGAGCCCCAGTCCAATGCTGGTCCAAGA
 CCCCACATTGGGGACACCCTGTTACCCCTGTTGAGAGCCCCTGAGCTGCTGGCTCCC
 30 AATGGAGACCTGTACAATGTGTTTGCCTGGGCTCTGGATGTTCTAGCCAAGAGGCTG
 AGGTCCATGCATGTGTTTCATCCTGGACTATGACCAGTCCCCTGCTGGATGCAGAGAT
 GCTCTGCTGCAACTAACCTCTGGCATGGTGCAGACCCATGTGACCACCCCTGGCAGC
 ATCCCCACCATCTGTGACCTAGCCAGAACCTTTGCCAGGGAGATGGGAGAGGCCAA
 C.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- proporcionar una célula de mamífero,
 - incorporar al menos un gen de fusión de B2M/HLA-E, tal como un gen de B2M/HLA-E*0101 y/o un gen de B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero,
 - 40 • inactivar los genes de B2M naturales de dicha célula de mamífero,
 - opcionalmente diferenciar dicha célula de mamífero,
- de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

El orden de las etapas puede variar donde tenga sentido. Por ejemplo, las etapas de modificación genética y la(s) etapa(s) de diferenciación celular pueden ocurrir en diferentes órdenes, la incorporación de un gen de B2M/HLA-E puede ocurrir antes de la inactivación del gen de B2M, la etapa de diferenciación puede tener lugar antes de la inactivación del gen de B2M/HLA-E y/o del gen de B2M.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- proporcionar una célula de mamífero,
 - incorporar al menos un gen de fusión de B2M/HLA-E, tal como un gen de B2M/HLA-E*0101 y/o un gen de B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero,
 - inactivar los genes de B2M naturales de dicha célula de mamífero,
 - incorporar al menos 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas en dicha célula de mamífero,
 - opcionalmente diferenciar dicha célula de mamífero,
- de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- proporcionar una célula de mamífero,
 - incorporar al menos un gen de fusión de B2M/HLA-E, tal como un gen de B2M/HLA-E*0101 y/o un gen de B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero,
 - inactivar los genes de B2M naturales de dicha célula de mamífero,
 - incorporar al menos 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas,
 - inactivar los genes de HLA-II naturales o los genes de CIITA naturales de dicha célula de mamífero,
 - opcionalmente diferenciar dicha célula de mamífero,
- de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- proporcionar una célula de mamífero con deficiencia de B2M y CIITA,
 - incorporar un gen de fusión de B2M/HLA-E, tal como un gen de B2M/HLA-E*0101 y/o un gen de B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero con deficiencia de B2M y CIITA,
 - incorporar 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas,
- de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- proporcionar una célula de mamífero,
 - incorporar un gen de B2M/HLA-E*0101 y/o un gen de B2M/HLA-E*0103 en el gen de B2M de dicha célula,
- de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable, tiene deficiencia de B2M y expresa las proteínas B2M/HLA-E*0101 y/o B2M/HLA-E*0103.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- proporcionar una célula de mamífero,
 - incorporar un gen de B2M/HLA-E*0101 y/o uno B2M/HLA-E*0103 en el gen de B2M de dicha célula de mamífero,
 - incorporar 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas en el genoma de dicha célula de mamífero,
 - opcionalmente diferenciar dicha célula de mamífero,
- de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable, tiene deficiencia de B2M y expresa las proteínas B2M/HLA-E*0101 y/o las proteínas B2M/HLA-E*0103 y las proteínas HSV-TK.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una célula de mamífero con deficiencia de B2M,
- b) incorporar B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103 en dicha célula de mamífero con deficiencia de B2M,

de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una célula de mamífero con deficiencia de B2M y CIITA,
 - b) incorporar B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103 en dicha célula de mamífero con deficiencia de B2M y CIITA,
 - c) incorporar 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas,
- de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

Se prevé que la célula de mamífero que se somete a las modificaciones genéticas según el método de la invención puede estar en diversas etapas de diferenciación y puede, según sea necesario, someterse a diferenciación adicional. Por ejemplo, en el caso de una célula madre, una célula pluripotente o una célula en una etapa de diferenciación temprana, esta célula puede diferenciarse a una etapa de diferenciación más avanzada, un tipo de célula más madura antes de la implantación. El método de la invención podría aplicarse, además, a un tipo celular funcional que no requiere diferenciación adicional antes de la implantación.

Aún en otra modalidad, la presente invención proporciona el uso de una célula de mamífero de acuerdo con la invención para la prevención, el tratamiento o la cura de una enfermedad tal como una enfermedad crónica. Se prevé que las células de mamífero y los métodos de la presente invención puedan ser útiles en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades crónicas. También se prevé que puedan ser útiles para prevenir enfermedades crónicas, así como también otras enfermedades.

En una modalidad, dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, degeneración macular seca, retinitis pigmentosa, enfermedad neurológica, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica y enfermedad renal crónica.

En una modalidad, la célula de mamífero es una célula animal. En otra modalidad, la célula de mamífero es una célula humana.

En una modalidad, la célula de mamífero es una célula no diferenciada. En una modalidad, la célula de mamífero es una célula madre, tal como una célula madre humana, una célula pluripotente, tal como una célula humana pluripotente o una célula iPS (célula madre pluripotente inducida), tal como una célula iPS humana.

- 5 En una modalidad, la célula de mamífero de la invención es una célula no diferenciada, tal como una célula madre, una célula pluripotente o una célula iPS, que se diferencia además en un tipo celular funcional.

En otra modalidad, la célula de mamífero es una célula diferenciada.

- 10 En una modalidad, la célula de mamífero es una célula humana diferenciada derivada de una célula madre, de una célula pluripotente o de una célula iPS de la invención.

En modalidades particulares de la presente invención, la célula de mamífero es una célula diferenciada seleccionada de la lista más abajo.

- 15 Dicha célula diferenciada puede derivarse de una célula madre, una célula pluripotencial o una célula iPS de la invención de acuerdo con uno de los métodos de diferenciación descritos en las publicaciones mencionadas en la lista más abajo:

- una célula beta, por ejemplo, una célula doble positiva para INS+ y NKX6.1+ o unas células doble positivas para péptido C+/NKX6.1+, una célula productora de insulina, una célula tipo beta derivada in vitro, una célula endocrina pancreática o un célula endocrina, como la obtenible por el método descrito en el documento WO2017/144695
- una célula progenitora endocrina o una célula doble positiva para NGN3+/NKX2.2+, como la obtenible por el método descrito en la solicitud de patente WO2015028614
- 25 • una célula neural, tal como una neurona, una célula interneurona, un oligodendrocito, un astrocito, una célula dopaminérgica, como la obtenible por los métodos descritos en Nolbrant S. y otros, Nat. Protocol. septiembre de 2017, 12(9):1962-1979; Kirkeby A. y otros, Cell Rep. 28 de junio de 2012, 1(6):703-14; Aktinson-Dell R. y otros, Adv Exp Med Biol. 2019, 1175:383-405; Ni P. y otros, Mol Ther Methods Clin Dev. 8 de abril de 2019, 13:414-430;
- 30 • una célula de exosoma, tal como las ESC (célula madre embrionaria) o las NSC (célula madre neuronal) o una célula de exosoma derivada de una ESC o NSC como la obtenible por los métodos descritos en Chen B. Stem Cell Res Ther. 21 de mayo de 2019, 10(1):142; Sun X. y otros, Front Cell Neurosci. 3 de septiembre de 2019, 13:394; Dougherty J.A. y otros, Front Physiol. 14 de diciembre de 2018, 9:1794; Candelario K.M. y otros, J Comp Neurol. 19 de noviembre de 2019; Yang R. y otros, Front Immunol. 16 de octubre de 2019, 10:2346;
- 35 • una célula inmunitaria, tal como una célula T, una célula NK, un macrófago, una célula dendrítica como la obtenible por los métodos descritos en Ackermann M. y otros, Nat Commun. 30 de noviembre de 2018;9(1):5088; Good ML. y otros J Vis Exp. 24 de octubre de 2019 (152); Zhu H. y otros Methods Mol Biol. 2019, 2048:107-119; Kitadani J. y otros, Sci Rep. 15 de marzo de 2018;8(1):4569;
- 40

- un hepatocito como la obtenible por el método descrito en Li Z. y otros Cell Death Dis. 10 de octubre de 2019, 10(10):763;
- una célula estrellada como la obtenible por los métodos descritos en Coll M. Cell Stem Cell. 5 de julio de 2018, 23(1):101-113;
- 5 • un fibroblasto, un queratinocito o una célula pilosa como la obtenible por los métodos descritos en Miyake T. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1 de septiembre de 2019, 105(1):193-205;
- una célula del oído interno como la obtenible por el método descrito en Jeong M. y otros, Cell Death Dis. 11 de septiembre de 2018;9(9):922;
- 10 • una célula intestinal o célula de organoide como la obtenible por los métodos descritos en Negro R. y otros Stem Cell Reports, 11 de diciembre de 2018, 11(6):1539-1550; Lees EA y otros J Vis Exp. 12 de mayo de 2019, (147);
- una célula nefroide u otra célula relacionada con el riñón como la obtenible por los métodos descritos en Vanslambrouck JM y otros J Am Soc Nephrol. 30 de octubre de 2019 (10):1811-1823;
- 15 • un cardiomiocito como el obtenible por el método descrito en Huang CY y otros J Mol Cell Cardiol. 23 de octubre de 2019, 138:1-11;
- una célula de la retina, una célula del epitelio pigmentario de la retina como la obtenible por los métodos descritos en Ben M'Barek K y otros Biomaterials. 6 de noviembre de 2019:119603,
- 20 • una célula madre mesenquimal como la obtenible por el método descrito en Chen KH y otros Am J Transl Res. 15 de septiembre de 2019;11(9):6232-6248).

En una modalidad del método de la invención, donde se aplica una etapa de diferenciación, la célula de mamífero es una célula no diferenciada, tal como célula madre, célula pluripotente o célula iPS y se diferencia en una célula seleccionada de la lista anterior.

En una modalidad del método de la invención, la célula de mamífero implantable es una célula diferenciada seleccionada de la lista anterior.

Las modalidades no limitantes de la invención incluyen:

- 30 1. La célula de mamífero que comprende al menos un gen de B2M/HLA-E en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables.
2. La célula de mamífero de acuerdo con la modalidad 1 que comprende un gen de B2M/HLA-E*0101 y un gen de B2M/HLA-E*0103 en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables.
- 35 3. La célula de mamífero de acuerdo con la modalidad 1 que comprende un gen de B2M/HLA-E*0101 o un gen de B2M/HLA-E*0103.
4. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha célula tiene incorporaciones de 4 o al menos 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.
- 40 5. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades previas, en donde dichos genes de B2M/HLA-E*0101 y/o B2M/HLA-E*0103 se han incorporado en las secuencias de B2M naturales de dicha célula de mamífero.

6. La célula de mamífero que comprende B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103 en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables.
7. La célula de mamífero que tiene incorporaciones tanto de B2M/HLA-E*0101 como de B2M/HLA-E*0103 en una célula con deficiencia de beta 2 microglobulina (B2M) de cualquier otra manera.
8. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades 6-7, en donde dichos B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103 se han incorporado directamente en las secuencias de B2M naturales de la célula usada para producir dicha célula con deficiencia de B2M.
9. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha célula de mamífero tiene el fenotipo de superficie celular HLA-A/B/C^{-/-} HLA-E⁺, tal como el fenotipo de superficie celular HLA-A/B/C^{-/-} HLA-E*0103⁺ y/o HLA-A/B/C^{-/-} HLA-E*0101⁺.
10. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha célula de mamífero tiene el fenotipo de superficie celular HLA-A/B/C^{-/-} HLA-E⁺ y comprende incorporaciones de 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.
11. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha célula de mamífero tiene el fenotipo de superficie celular HLA-A/B/C^{-/-} HLA-E*0101⁺ y HLA-E*0103⁺.
12. La célula de mamífero que comprende los genes de B2M/HLA-E*0101 y B2M/HLA-E*0103 en donde dicha célula de mamífero no comprende otros genes de B2M expresables, es con deficiencia de CIITA y tiene incorporaciones de 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.
13. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha célula de mamífero es una célula universalmente trasplantable.
14. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha célula de mamífero es una célula madre o una célula pluripotente.
15. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha célula de mamífero se selecciona del grupo que consiste en una neurona, un cardiomiocito, una célula de la retina, una célula del epitelio pigmentario de la retina y una célula beta.
16. La célula de mamífero de acuerdo con la modalidad 15, en donde dicha célula de mamífero es una célula beta o un precursor de la misma.
17. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha célula de mamífero se selecciona del grupo que consiste en una célula madre mesenquimal, una célula madre embrionaria, una célula madre neural.
18. La célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicho(s) gen(es) de B2M/HLA-E, tales como los genes de B2M/HLA-E*0101 y/o B2M/HLA-E*0103, cada uno incluye un promotor o se

incorporan en los loci que están bajo el control de un promotor funcional o al lado de un promotor.

19. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la incorporación de dichos genes de B2M/HLA-E está sobre el locus de B2M natural, que utiliza (es decir, bajo el control de) el promotor de B2M natural.
20. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-19, en donde la incorporación de dichos genes de B2M/HLA-E*0101 y/o B2M/HLA-E*0103 está sobre los loci de B2M natural y utiliza (es decir, está bajo el control de) un promotor de B2M no natural.
21. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-19, en donde dichos genes de B2M/HLA-E*0101 y/o B2M/HLA-E*0103 se incorporan en los loci diferentes de los loci de B2M natural y que utilizan un promotor alternativo.
22. La célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-21, en donde la densidad de HLA-E deseada se genera a través de incorporaciones de HLA-E bialélicas.
23. La célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde no se usa carga preferencial del péptido de secuencia señal de HLA-G.
24. La célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el gen de B2M/HLA-E no comprende un péptido líder de HLA-I preunido.
25. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicho gen de B2M/HLA-E*0101 codifica una proteína B2M/HLA-E*0101 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o una variante de la misma que tiene un total de 1-10 sustituciones, eliminaciones o adiciones.
26. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicho gen de B2M/HLA-E*0103 codifica una proteína B2M/HLA-E*0103 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 o una variante de la misma que tiene un total de 1-10 sustituciones, eliminaciones o adiciones.
27. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde dicha célula de mamífero tiene deficiencia de HLA-II, tal como deficiencia de CIITA.
28. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, que comprende incorporaciones de 4 o al menos 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.
29. La célula de mamífero de acuerdo con la modalidad 28, en donde dichas incorporaciones de 4 genes de HSV-TK están en ubicaciones separadas por al menos 10 Kpb, tal como al menos 100 Kpb, al menos 1 Mpb o al menos 20 Mpb.

30. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades 28-29, en donde dichas incorporaciones de 4 genes de HSV-TK están en ubicaciones en 4 cromosomas diferentes.
- 5 31. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades 28-29, en donde dichas incorporaciones de 4 genes de HSV-TK están en ubicaciones en 3 cromosomas diferentes.
32. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades 28-29, en donde dichas incorporaciones de 4 genes de HSV-TK están en ubicaciones en 2 cromosomas diferentes.
- 10 33. La célula de mamífero de acuerdo con la modalidad 28, en donde dichos 4 genes de HSV-TK se expresan en un grado en el que cada uno de ellos solo mataría a dicha célula de mamífero tras la exposición al ganciclovir.
- 15 34. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde 2 o al menos 2 genes de HSV-TK se incorporan en sitios de puerto genómico seguro.
35. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde un gen de HSV-TK se incorpora para eliminar un alelo de B2M.
- 20 36. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, en donde un gen de HSV-TK se incorpora para eliminar un alelo de CIITA.
37. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades 4-36, en donde dichos 4 genes de HSV-TK se incorporan en sitios de puerto seguro, tales como AAVs1, hROSA, AAVS1, CLYBL o cualquiera de sus combinaciones.
- 25 38. La célula de mamífero de acuerdo con cualquiera de las modalidades precedentes, cuya célula de mamífero no es una célula asesina natural (NK).
39. Un método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:
 - proporcionar una célula de mamífero,
 - 30 • incorporar al menos un gen de fusión de B2M/HLA-E, tal como un gen de B2M/HLA-E*0101 y/o un gen de B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero,
 - inactivar los genes de B2M naturales de dicha célula de mamífero,
 - opcionalmente diferenciar dicha célula de mamífero,
- 35 de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.
40. El método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:
 - proporcionar una célula de mamífero,
 - incorporar al menos un gen de fusión de B2M/HLA-E, tal como un gen de
 - 40 B2M/HLA-E*0101 y/o un gen de B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero,
 - inactivar los genes de B2M naturales de dicha célula de mamífero,
 - diferenciar dicha célula de mamífero,

de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

41. El método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una célula de mamífero,
- 5 b) incorporar un gen de B2M/HLA-E en los loci del gen de B2M en dicha célula de mamífero,

de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

42. El método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- 10 a) proporcionar una célula de mamífero no diferenciada con deficiencia de B2M,
- b) incorporar un gen de B2M/HLA-E en dicha célula de mamífero no diferenciada con deficiencia de B2M, y
- c) diferenciar dicha célula no diferenciada en una célula diferenciada funcional,

de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

15 43. El método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una célula de mamífero con deficiencia de B2M,
- b) incorporar un gen de B2M/HLA-E, tal como B2M/HLA-E*0101 y/o un gen de B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero con deficiencia de B2M,

20 de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

44. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-43 que comprende además una etapa de: incorporar al menos 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.

25 45. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-44, en donde al menos 2 genes de HSV-TK se incorporan en los loci de puerto seguro.

46. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-45, en donde 4 genes de HSV-TK se incorporan en los loci de puerto seguro.

30 47. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-46 que comprende además una etapa de: inactivar los genes de HLA-II naturales o los genes de CIITA naturales de dicha célula de mamífero.

48. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-47, en donde dichos genes de B2M/HLA-E, tales como los genes de B2M/HLA-E*0101 y/o B2M/HLA-E*0103, se han incorporado directamente sobre las secuencias de B2M naturales de la célula usada para producir dicha célula con deficiencia de B2M.

35 49. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-48, en donde dicho gen de B2M/HLA-E comprende un gen de B2M/HLA-E*0101 y un gen de B2M/HLA-E*0103.

40 50. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-49, en donde dicha célula de mamífero tiene el fenotipo de superficie celular de células HLA-A/B/C^{-/-} HLA-E*0101⁺ HLA-E*0103⁺.

51. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-50, en donde dicha célula de mamífero es una célula madre.

52. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-51, en donde dicha célula de mamífero o dicha célula de mamífero trasplantable se selecciona de una neurona, un cardiomiocito, célula de la retina, una célula del epitelio pigmentario de la retina, una célula madre mesenquimal y una célula beta.
- 5 53. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-52 que comprende las etapas de:
- proporcionar una célula madre de mamífero o célula pluripotente,
 - incorporar al menos un gen de B2M/HLA-E*0101 y un gen de B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero,
 - 10 • inactivar los genes de B2M naturales de dicha célula de mamífero,
 - incorporar al menos 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas,
 - diferenciar dicha célula de mamífero,
- de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.
- 15 54. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-53, en donde en la etapa de diferenciación, dicha célula de mamífero se diferencia en una célula beta, una célula doble positiva para INS+ y NKX6.1+ o unas células doble positivas para péptido C+/NKX6.1+, una célula productora de insulina, una célula tipo beta derivada in vitro, una célula endocrina pancreática o una célula endocrina, una célula progenitora endocrina o una célula doble positiva para NGN3+/NKX2.2+, una célula neural, tal como una neurona, una célula interneurona, un oligodendrocito, un astrocito, una célula dopaminérgica, una célula de exosoma, tales como las ESC o las NSC, o una célula de exosoma derivada de una ESC o NSC, una célula inmunitaria, tal como una célula T, una
- 20 célula NK, un macrófago, una célula dendrítica, un hepatocito, una célula estrellada, un fibroblasto, un queratinocito o una célula pilosa, una célula del oído interno, una célula intestinal o una célula de organoide, una célula nefroide o una célula relacionada con el riñón, un cardiomiocito, una célula de la retina, una célula del epitelio pigmentario de la retina, una célula madre mesenquimal.
- 25 55. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-54, en donde dicha célula de mamífero implantable se selecciona de una célula beta, una célula doble positiva para INS+ y NKX6.1+ o unas células doble positivas para péptido C+/NKX6.1+, una célula productora de insulina, una célula tipo beta derivada in vitro, una célula endocrina pancreática o una célula endocrina, una célula progenitora endocrina o una célula doble positiva para NGN3+/NKX2.2+, una célula neural, tal como una neurona, una célula interneurona, un oligodendrocito, un astrocito, una célula dopaminérgica, una célula de exosoma, tales como las ESC o las NSC, o una célula de exosoma derivada de una ESC o NSC, una célula inmunitaria, tal como una célula T, una célula NK, un macrófago, una
- 30 célula dendrítica, un hepatocito, una célula estrellada, un fibroblasto, un queratinocito o una célula pilosa, una célula del oído interno, una célula intestinal o una célula de organoide, una célula nefroide u otra célula relacionada con el
- 35
- 40

riñón, un cardiomiocito, una célula de la retina, una célula del epitelio pigmentario de la retina, una célula madre mesenquimal.

56. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-55, en donde los genes de B2M/HLA-E incorporados, tales como el gen de B2M/HLA-E*0101 y/o el gen de B2M/HLA-E*0103, cada uno incluye un promotor o en donde dichos genes de B2M/HLA-E se incorporan al lado de un promotor o en los loci bajo el control de promotor(es) funcional(es).
57. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-56, en donde la incorporación de dicho gen de B2M/HLA-E*0101 y gen de B2M/HLA-E*0103 está sobre el locus de B2M natural, que utiliza el promotor de B2M natural.
58. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-57, en donde la incorporación de dicho gen de B2M/HLA-E*0101 y gen de B2M/HLA-E*0103 está sobre el locus de B2M natural, que utiliza un promotor de B2M no natural alternativo.
59. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-58, en donde la incorporación tanto del gen de B2M/HLA-E*0101 como del gen de B2M/HLA-E*0103 están en loci distintos de los loci de B2M natural y utilizan o están bajo el control de un promotor alternativo.
60. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-59, en donde dicho gen de B2M/HLA-E*0101 codifica una proteína B2M/HLA-E*0101 de secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4 o una variante de la misma que tiene un total de 1-10 sustituciones, eliminaciones o adiciones.
61. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 39-60, en donde dicho gen de B2M/HLA-E*0103 codifica una proteína B2M/HLA-E*0103 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 o una variante de la misma que tiene un total de 1-10 sustituciones, eliminaciones o adiciones.
62. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 39-61, en donde la densidad de HLA-E conveniente se genera a través de incorporaciones bialélicas.
63. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 39-62, en donde no se usa una carga preferencial del péptido de secuencia señal de HLA-G.
64. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 39-63, en donde dicha célula de mamífero tiene deficiencia de CIITA.
65. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 39-64, que comprende una etapa de inactivar la expresión de proteínas HLA-II funcionales.
66. El método de acuerdo con la modalidad 65 que comprende una etapa de inactivar el gen de CIITA.
67. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 41-66, que comprende además la etapa: c) incorporar 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas.
68. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 44-67, en donde dichas incorporaciones de 4 genes de HSV-TK están en ubicaciones separadas por al menos 10 Kpb, tal como al menos 100 Kpb, al menos 1 Mpb o al menos 20 Mpb.

69. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 44-68, en donde dichas incorporaciones de 4 genes de HSV-TK están en ubicaciones en 4 cromosomas diferentes.
- 5 70. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 44-69, en donde dichas incorporaciones de 4 genes de HSV-TK están en ubicaciones en 2 cromosomas diferentes.
71. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 44-70, en donde las proteínas HSV-TK expresadas por solo uno de dichos 4 genes de HSV-TK son suficientes para matar dicha célula de mamífero tras la exposición al ganciclovir.
- 10 72. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 44-71, en donde 2 o al menos 2 genes de HSV-TK se incorporan en sitios de puerto genómico seguro.
73. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 44-72, en donde un gen de HSV-TK se incorpora para eliminar un alelo de B2M.
- 15 74. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 44-73, en donde un gen de HSV-TK se incorpora para eliminar un alelo de CIITA.
75. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 39-74, en donde dichas incorporaciones y/o inactivación(ones) génica(s) se realiza(n) mediante el uso de una tecnología de edición génica seleccionada de nucleasas de dedos de zinc (ZFN), CRISPR, TALEN o recombinación adenoviral.
- 20 76. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 39-75, en donde dicha célula de mamífero con deficiencia de B2M es una célula madre que se ha modificado al suprimir ambos alelos de B2M naturales.
77. El uso de una célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-38 para la prevención, tratamiento o cura de una enfermedad crónica.
- 25 78. El uso de acuerdo con la modalidad 77, en donde dicha enfermedad crónica se selecciona del grupo que consiste en diabetes, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, degeneración macular seca, retinitis pigmentosa, enfermedad neurológica, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardíaca, insuficiencia cardíaca crónica y enfermedad renal crónica.
- 30 79. Una célula de mamífero de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-38, en donde un gen de HSV-TK se incorpora para eliminar un alelo de B2M y otro gen de HSV-TK se incorpora para eliminar un alelo de CIITA.
- 35 80. El método para producir una célula de mamífero implantable, que comprende las etapas de:
- proporcionar una célula de mamífero con deficiencia de B2M y con deficiencia de CIITA,
 - incorporar un gen de B2M/HLA-E, tal como uno o ambos de un gen de B2M/HLA-E*0101 y un B2M/HLA-E*0103, en dicha célula de mamífero con deficiencia de B2M y CIITA,
 - incorporar 4 genes de HSV-TK en ubicaciones distintas y conocidas,
- 40 de manera que se obtiene dicha célula de mamífero implantable.

81. El método de la modalidad 80, en donde dicha célula de mamífero implantable tiene un fenotipo de superficie celular HLA-A/B/C/- HLA-E.
82. El método de la modalidad 80-81, en donde dicha célula de mamífero implantable tiene el fenotipo de superficie celular de células HLA-A/B/C/- HLA-E*0101+ HLA-E*0103+.
83. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 80-82, en donde dicha célula de mamífero es una célula madre, una célula pluripotente o una célula iPS.
84. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 80-83, en donde dicha célula de mamífero se selecciona de una neurona, un cardiomiocito, una célula de la retina, una célula del epitelio pigmentario de la retina, una célula madre mesenquimal y una célula beta.
85. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 80-84, que comprende una etapa de diferenciar dicha célula de mamífero.
86. El método de acuerdo con la modalidad 85, en donde, en la etapa de diferenciación, dicha célula de mamífero se diferencia en una célula beta, una célula doble positiva para INS+ y NKX6.1+ o unas células doble positivas para péptido C+/NKX6.1+, una célula productora de insulina, una célula tipo beta derivada in vitro, una célula endocrina pancreática o una célula endocrina, una célula progenitora endocrina o una célula doble positiva para NGN3+/NKX2.2+, una célula neural, tal como una neurona, una célula interneurona, un oligodendrocito, un astrocito, una célula dopaminérgica, una célula de exosoma, una célula inmunitaria, tal como una célula T, una célula NK, un macrófago, una célula dendrítica, un hepatocito, una célula estrellada, un fibroblasto, un queratinocito o una célula pilosa, una célula del oído interno, una célula intestinal o una célula de organoide, una célula nefroide u otra célula relacionada con el riñón, un cardiomiocito, una célula de la retina, una célula del epitelio pigmentario de la retina, una célula madre mesenquimal.
87. El método de acuerdo con cualquiera de las modalidades 80-84, en donde dichas incorporaciones de 4 genes de HSV-TK están en ubicaciones en 4 cromosomas diferentes.
88. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 80-85, en donde 2 genes de HSV-TK se incorporan en sitios de puerto genómico seguro.

EJEMPLOS

35 EJEMPLO 1- Ensayo con ganciclovir

Descripción

Una línea celular hESC (célula madre embrionaria humana) progenitora no diferenciada (WT), una línea celular hESC con 2 copias del gen de HSV-TK (2xHSV-TK) y una línea celular hESC con 4 copias del gen de HSV-TK (4xHSV-TK) se colocaron en placas sobre hFN (recubrimiento de fibronectina humana). Las células se sembraron a 60 000 células/pocillo en placas con formato de 24 pocillos y se cultivaron durante la noche en medio DEF-CS. A continuación, las células se cultivaron en medio DEF-CS que contenía ganciclovir (GCV) a 5 concentraciones diferentes durante 7 días: 0, 1, 12,5, 25, 50 o 100

μM. El medio DEF-CS que contenían ganciclovir se cambió todos los días. Las células se subcultivaron 1:2 en DEF-CS con ganciclovir, cuando alcanzaron el 90 % de confluencia. Después de 7 días en cultivo, las células se tiñeron con DAPI y se capturaron imágenes. Las imágenes de los resultados se muestran en la figura 3.

5 Conclusión

Las células que tienen cuatro copias de HSV-TK en distintos sitios en el genoma son más sensibles al ganciclovir, que las células que solo tienen dos copias de HSV-TK en distintos sitios en el genoma.

EJEMPLO 2 – Protocolo de generación de células seguras para el sistema inmunitario

- 10 Las células madres embrionarias humanas (SA121) se electroporan con un total de 500 ng del par de ARNm de TALEN[®] (ThermoFisher[®], secuencia diana directa: CTGTCCCCTCCACCCCAC, secuencia diana inversa: TTCTGTCACCAATCCTGT) contra AAVS1 y 500 ng del plásmido donante que contiene brazos de homología de 300 pb que flanquean el sitio de corte de TALEN[®] en AAVS1, un casete de HSV-TK seguido por un
15 casete de selección de mCherry. Las células se cultivan durante una semana y las células positivas para mCherry se clasifican en masa mediante el uso de un clasificador celular FACS. Las células se cultivan durante una semana adicional antes de que se electroporen con un total de 500 ng del par de ARNm de TALEN[®] (ThermoFisher[®], secuencia diana directa: CTCAAGTAGGTCTCTTTC, secuencia diana inversa:
20 GAAAGTCTTCTCCTCCAA) contra CLYBL y 500 ng del plásmido donante que contiene brazos de homología de 300 pb que flanquean el sitio de corte de TALEN[®] en CLYBL, un casete de HSV-TK seguido por un casete de selección de eGFP. Las células se cultivan durante una semana y las células doble positivas para mCherry/eGFP se clasifican en masa mediante el uso de un clasificador celular FACS. Las células se cultivan durante
25 una semana adicional antes de que se electroporen con 100 ng de ARNm de recombinasa Cre para escindir los casetes de selección. Las células doble negativas para mCherry/eGFP se clasifican como células individuales en una placa de 96 pocillos mediante el uso de un clasificador celular FACS y se cultivan durante dos a cuatro semanas. Los clones celulares se determinan para la integración bialélica dirigida
30 mediante el uso de PCR.

- Un clon que contiene cuatro copias de HSV-TK del protocolo anterior se electropora con un total de 200 ng del par de ARNm de TALEN[®] (ThermoFisher[®], secuencia diana directa: TCTCGCTCCGTGGCCTT, secuencia diana inversa: AGCCTCCAGGCCAGAAAG) contra B2M y 200ng de plásmido donante que contiene brazos de homología de 300 pb que
35 flanquean el sitio de corte de TALEN[®] en B2M, un casete de fusión B2M-HLAIE01:01 seguido por un casete de selección de mCherry y 200 ng de plásmido donante que contiene brazos de homología de 300 pb que flanquean el sitio de corte de TALEN[®] en B2M, un casete de fusión B2M-HLAIE01:03 seguido por un casete de selección de eGFP. Las células se cultivan durante una semana y las células doble positivas para
40 mCherry/eGFP se clasifican en masa mediante el uso de un clasificador celular FACS. Las células se cultivan durante una semana adicional antes de que se electroporen con 100 ng de ARNm de recombinasa Cre para escindir los casetes de selección. Las células doble negativas para mCherry/eGFP se clasifican como células individuales en una placa

de 96 pocillos mediante el uso de un clasificador celular FACS y se cultivan durante dos a cuatro semanas. Los clones celulares se determinan para la integración monoalélica dirigida mediante el uso de PCR

5 Todas las electroporaciones se realizan mediante el uso de 10 ul del estuche de transfección Neon de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (ThermoFisher® #MPK1025, voltaje de pulso 1100V, ancho de pulso 20, pulso no 2, 4e5 células).

Las células se cultivan en DEF-CS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Takara® #Y30017).