

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención como antecede, se considera como una novedad y, por lo tanto, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para generar una célula donante universal, comprendiendo el método suministrar a una célula:
- (a) una primera nucleasa dirigida al sitio que se dirige a un sitio dentro o cerca de un gen que codifica un factor de supervivencia; y
- (b) un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que
10 codifica un primer factor tolerogénico que está flanqueado por (i) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la izquierda del sitio diana de (a) y (ii) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha del sitio diana de (a),
- en donde la primera nucleasa dirigida al sitio escinde el sitio diana de (a) y el
15 primer ácido nucleico de (b) se inserta en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de (a), generando de este modo una célula donante universal, en donde la célula donante universal tiene una mayor supervivencia celular en comparación con una célula en la que el ácido nucleico de (b) no se ha insertado.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde el factor de supervivencia es TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK o MANF.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el primer factor tolerogénico es PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 o CD47.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el factor de
25 supervivencia es TXNIP.
5. El método de la reivindicación 4, en donde el primer factor tolerogénico es HLA-E.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la primera
30 nucleasa dirigida al sitio es un sistema CRISPR que comprende una nucleasa CRISPR y un ARN guía (ARNg).
7. El método de la reivindicación 6, en donde la nucleasa CRISPR es una nucleasa Cas9 de Tipo II o una nucleasa Cfp1 de Tipo V, y la nucleasa CRISPR está unida a al menos una señal de localización nuclear.
8. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde el ARNg comprende una
35 secuencia espaciadora correspondiente a una secuencia diana que consiste en las SEQ ID NO: 15-24.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la secuencia de nucleótidos de (b)(i) consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 25, y la secuencia de nucleótidos de (b)(iii) consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 32.

5 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el método comprende además suministrar a la célula:

(c) una segunda nucleasa dirigida al sitio que se dirige a un sitio dentro o cerca de un gen que codifica uno o más de un antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo MHC-I o MHC-II; y

10 (d) un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo factor tolerogénico que está flanqueado por (iii) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la izquierda del sitio diana de (c) y una (iv) secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha del sitio diana de (c), en donde el factor tolerogénico de (d) difiere del primer factor tolerogénico de (b),

15 en donde la segunda nucleasa dirigida al sitio escinde el sitio diana de (c) y el segundo ácido nucleico de (d) se inserta en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de (c), en donde la célula donante universal tiene una mayor evasión inmunitaria y/o supervivencia celular en comparación con una célula en la que el segundo ácido nucleico de (d) no se ha insertado.

20 11. El método de la reivindicación 10, en donde el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o el componente o el regulador de la transcripción del complejo MHC-I o MHC-II es HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP o RFXANK.

25 12. El método de la reivindicación 10 u 11, en donde el segundo factor tolerogénico es PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 o CD47.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o el componente o el regulador de la transcripción del complejo MHC-I o MHC-II es B2M.

30 14. El método de la reivindicación 13, en donde el segundo factor tolerogénico es PD-L1.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde la segunda nucleasa dirigida al sitio es un sistema CRISPR que comprende una nucleasa CRISPR y un ARNg.

16. El método de la reivindicación 15, en donde la nucleasa CRISPR es una nucleasa Cas9 de Tipo II o una nucleasa Cfp1 de Tipo V, y la nucleasa CRISPR está unida a al menos una señal de localización nuclear.

5 17. El método de la reivindicación 15 o 16, en donde el ARNg comprende una secuencia espaciadora correspondiente a una secuencia diana que consiste en las SEQ ID NO: 1-3 o 35-44.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde la secuencia de nucleótidos de (d)(iii) consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 7, y la secuencia de nucleótidos de (d)(iv) consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 13.

10 19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o las reivindicaciones 15 a 18, en donde la nucleasa CRISPR y el ARNg están presentes en una relación molar de 1:3.

20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el primer factor tolerogénico está unida operativamente a un promotor exógeno y la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo factor tolerogénico está unida operativamente a un promotor exógeno.

21. El método de la reivindicación 20, en donde el promotor exógeno es un promotor constitutivo, inducible, temporal, específico del tejido o específico del tipo de célula, opcionalmente en donde el promotor exógeno es un promotor de CMV, EF1 α , PGK, CAG o UBC.

20 22. Un método para generar una célula donante universal, comprendiendo el método suministrar a una célula:

(a) una primera nucleasa dirigida al sitio que se dirige a un sitio dentro o cerca de un gen que codifica un factor de supervivencia;

25 (b) un primer ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un primer factor tolerogénico que está flanqueado por (i) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la izquierda del sitio diana de (a) y (ii) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha del sitio diana de (a), en donde la primera nucleasa dirigida al sitio escinde el sitio diana de (a) y, a través de un proceso de recombinación homóloga, el primer ácido nucleico de (b) se utiliza como molde para insertar la secuencia de nucleótidos que codifica el primer factor tolerogénico en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de (a), interrumpiendo de este modo el gen de (a);

30 (c) una segunda nucleasa dirigida al sitio dentro o cerca de un gen que codifica uno o más de un antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo MHC-I o MHC-II; y

35

(d) un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo factor tolerogénico que está flanqueado por (iii) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la izquierda del sitio diana de (c) y una (iv) secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha del sitio diana de (c), en donde el factor tolerogénico de (d) difiere del factor tolerogénico (b), en donde la segunda nucleasa dirigida al sitio escinde el sitio diana de (c) y, a través de un proceso de recombinación homóloga, el segundo ácido nucleico de (d) se utiliza como molde para insertar la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo factor tolerogénico en un sitio que se solapa parcialmente con, se solapa completamente con o está contenido dentro del sitio de (c), interrumpiendo de este modo el gen de (c), generando de este modo una célula donante universal, en donde la célula donante universal tiene una mayor supervivencia celular en comparación con una célula en la que el primer ácido nucleico de (b) y el segundo ácido nucleico de (d) no se han insertado.

23. El método de la reivindicación 22, en donde el factor de supervivencia es TXNIP, el primer factor tolerogénico es HLA-E, el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo MHC-I o MHC-II es B2M, y el segundo factor tolerogénico es PD-L1.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde la célula es una célula de mamífero, opcionalmente, en donde la célula es una célula humana.

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la célula es una célula madre.

26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la célula es una célula madre pluripotente, una célula madre embrionaria, una célula madre adulta, una célula madre pluripotente inducida o una célula madre hematopoyética.

27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la célula es una célula diferenciada o una célula somática.

28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la célula donante universal es capaz de diferenciarse en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas.

29. El método de la reivindicación 28, en donde las células progenitoras de linaje restringido son células progenitoras del endodermo pancreático, células progenitoras endocrinas pancreáticas, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras musculares, blastocitos, células progenitoras hematopoyéticas o células progenitoras neuronales.

30. El método de la reivindicación 28, en donde las células somáticas completamente diferenciadas son células beta pancreáticas, células epiteliales, células endodérmicas, macrófagos, hepatocitos, adipocitos, células renales, células sanguíneas, cardiomiocitos o células del sistema inmunitario.

5 31. Una pluralidad de células donantes universales generadas mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27.

32. La pluralidad de células donantes universales de la reivindicación 31, mantenidas durante un tiempo y en condiciones suficientes para que las células experimenten diferenciación.

10 33. La pluralidad de células de las reivindicaciones 31 o 32 para su uso en el tratamiento de un sujeto que lo necesite.

34. La pluralidad de células para el uso de la reivindicación 33, en donde el sujeto es un ser humano que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad.

15 35. Un método que comprende administrar a un sujeto la pluralidad de células donantes universales de la reivindicación 31 o 32.

36. Un método para tratar a un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método:

(a) obtener o haber obtenido la pluralidad de células donantes universales de la reivindicación 31 después de la diferenciación en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas; y

20 (b) administrar al sujeto las células progenitoras de linaje restringido o las células somáticas completamente diferenciadas.

37. Un método de obtención de células para su administración a un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método:

25 (a) obtener o haber obtenido las células donantes universales de la reivindicación 31; y

(b) 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.

30 38. El método de la reivindicación 36 o 37, en donde las células progenitoras de linaje restringido son células progenitoras del endodermo pancreático, células progenitoras endocrinas pancreáticas, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras musculares, blastocitos, células progenitoras hematopoyéticas o células progenitoras neuronales.

35 39. El método de la reivindicación 36 o 37, en donde las células somáticas completamente diferenciadas son células beta pancreáticas, células epiteliales, células

endodérmicas, macrófagos, hepatocitos, adipocitos, células renales, células sanguíneas, cardiomiocitos o células del sistema inmunitario.

40. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 39, en donde el sujeto es un ser humano que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad.

41. El método de la reivindicación 40, en donde la enfermedad es una enfermedad hereditaria genéticamente.

42. Un ARN guía que comprende una secuencia espaciadora correspondiente a una secuencia diana que consiste en las SEQ ID NO: 15-24.

43. Un proceso para generar células donantes universales, comprendiendo el proceso:

(a) modificar las células madre insertando una secuencia de nucleótidos que codifica un primer factor tolerogénico dentro o cerca de un gen que codifique un antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un complejo MHC-I o MHC-II, generando de este modo células positivas para el primer factor tolerogénico;

(b) enriquecer las células positivas para el primer factor tolerogénico;

(c) modificar las células positivas para el primer factor tolerogénico de (b) insertando una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo factor tolerogénico dentro o cerca de un gen que codifica un factor de supervivencia, generando de este modo células positivas para el primer factor tolerogénico/positivas para el segundo factor tolerogénico;

(d) enriquecer las células positivas para el primer factor tolerogénico/positivas para el segundo factor tolerogénico;

(e) clasificar las células individualmente para seleccionar las células positivas para el primer factor tolerogénico/positivas para el segundo factor tolerogénico;

(f) caracterizar las células de (e) como células donantes universales; y

(g) congelar las células donantes universales para su almacenamiento a largo plazo.

44. El proceso de la reivindicación 43, en donde el enriquecimiento en células positivas para el primer factor tolerogénico en (b) comprende la clasificación celular asistida magnéticamente (MACS), la clonación de células individuales, la expansión de dichas células positivas para el primer factor tolerogénico o una combinación de las mismas.

45. El proceso de la reivindicación 43 o 44, en donde el enriquecimiento en células positivas para el primer factor tolerogénico/positivas para el segundo factor tolerogénico en (b) comprende la clasificación celular asistida magnéticamente, la clonación de células individuales,

la expansión de dichas células positivas para el primer factor tolerogénico/positivas para el segundo factor tolerogénico o una combinación de las mismas.

46. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 45, que comprende además en (a) expandir las células positivas para el primer factor tolerogénico generadas, en
5 (c) expandir las células positivas para el primer factor tolerogénico/positivas para el segundo factor tolerogénico generadas, en (e) expandir las células positivas para el primer factor tolerogénico/positivas para el segundo factor tolerogénico seleccionadas o una combinación de los mismos.

47. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46, en donde la
10 modificación en (a) comprende suministrar a las células madre (1) una primera nucleasa guiada por ARN y un primer ARN guía (ARNg) que se dirige a un sitio diana en un antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un locus del gen del complejo MHC-I o MHC-II y (2) un primer vector que comprende un primer ácido nucleico, comprendiendo el primer ácido nucleico (i) una secuencia de nucleótidos homóloga
15 con una región ubicada a la izquierda del sitio diana en los antígenos leucocitarios humanos MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un locus del gen del complejo MHC-I o MHC-II, (ii) la secuencia de nucleótidos que codifica el primer factor tolerogénico y (iii) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha del sitio diana en los antígenos leucocitarios humanos MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un locus del gen del complejo MHC-I o MHC-II, en donde el
20 antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un locus del gen del complejo MHC-I o MHC-II se escinde en el sitio diana y el primer ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el primer factor tolerogénico se inserta en el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o
25 un regulador de la transcripción de un locus del gen del complejo MHC-I o MHC-II, interrumpiendo de este modo el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un gen del complejo MHC-I o MHC-II.

48. El proceso de la reivindicación 47, en donde la primera nucleasa guiada por ARN y el primer ARNg forman un primer complejo de ribonucleoproteína (RNP).

49. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46, en donde la
30 modificación en (a) comprende suministrar a las células madre (1) un primer complejo de ribonucleoproteína (RNP) que comprende una primera nucleasa guiada por ARN y un primer ARN guía (ARNg) que se dirige a un sitio diana en un antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un locus del gen del complejo MHC-I o MHC-II y (2) un primer vector que comprende un primer ácido nucleico, comprendiendo
35 el primer ácido nucleico (i) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la

5 izquierda del sitio diana en el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un locus del gen del complejo MHC-I o MHC-II, (ii) la secuencia de nucleótidos que codifica el primer factor tolerogénico y (iii) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha del sitio diana en el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un locus del gen del complejo MHC-I o MHC-II, en donde el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un locus del gen del complejo MHC-I o MHC-II se escinde en el sitio diana y el primer ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el primer factor tolerogénico se inserta en el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un locus del gen del complejo MHC-I o MHC-II, interrumpiendo de este modo el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un gen del complejo MHC-I o MHC-II.

15 50. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 49, en donde el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un gen del complejo MHC-I o MHC-II es HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP o RFXANK.

20 51. El proceso de la reivindicación 50, en donde el antígeno leucocitario humano MHC-I o MHC-II o un componente o un regulador de la transcripción de un gen del complejo MHC-I o MHC-II es B2M.

52. El proceso de la reivindicación 51, en donde la secuencia de nucleótidos de (a)(2)(i) consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 7, y la secuencia de nucleótidos de (a)(2)(iii) consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 13.

25 53. El proceso de las reivindicaciones 51 o 52, en donde el primer ARNg comprende una secuencia espaciadora correspondiente a una secuencia diana que consiste en la SEQ ID NO: 2.

54. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 47 a 53, en donde la primera nucleasa guiada por ARN es una nucleasa Cas9.

30 55. El proceso de la reivindicación 54, en donde la nucleasa Cas9 se une a al menos una señal de localización nuclear.

56. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 47 a 55, en donde la primera RNP comprende una relación molar de primer ARNg:primera nucleasa guiada por ARN de 3:1.

35 57. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 56, en donde el primer factor tolerogénico es PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 o CD47.

58. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 57, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el primer factor tolerogénico está unida operativamente a un promotor exógeno.

5 59. El proceso de la reivindicación 58, en donde el promotor exógeno es un promotor de CMV, EF1 α , PGK, CAG o UBC.

60. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 59, en donde el primer factor tolerogénico es PD-L1.

61. El proceso de la reivindicación 60, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica PD-L1 consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 11.

10 62. El proceso de la reivindicación 61, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica PD-L1 está unida operativamente a un promotor CAG.

63. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 60 a 62, en donde el primer vector comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 33.

15 64. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 63, en donde la modificación en (c) comprende suministrar a las células madre (1) una segunda nucleasa guiada por ARN y un segundo ARN guía (ARNg) que se dirige a un sitio diana en un locus del gen del factor de supervivencia y (2) un segundo vector que comprende un segundo ácido nucleico, comprendiendo el segundo ácido nucleico (i) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la izquierda del sitio diana en el locus del gen del factor de supervivencia, (ii)
20 la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo factor tolerogénico y (iii) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha del sitio diana en el locus del gen del factor de supervivencia, en donde el locus del gen del factor de supervivencia se escinde en el sitio diana y el segundo ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo factor tolerogénico se inserta en el locus del gen del factor de supervivencia,
25 interrumpiendo de este modo el gen del factor de supervivencia.

65. El proceso de la reivindicación 64, en donde la segunda nucleasa guiada por ARN y el segundo ARNg forman un segundo complejo de ribonucleoproteína (RNP).

30 66. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 63, en donde la modificación en (c) comprende suministrar a las células positivas para el primer factor tolerogénico (1) un segundo complejo de ribonucleoproteína (RNP) que comprende una segunda nucleasa guiada por ARN y un segundo ARN guía (ARNg) que se dirige a un sitio diana en un locus del gen del factor de supervivencia y (2) un segundo vector que comprende un segundo ácido nucleico, comprendiendo el segundo ácido nucleico (i) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la izquierda del sitio diana en el locus del gen
35 del factor de supervivencia, (ii) la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo factor tolerogénico y (iii) una secuencia de nucleótidos homóloga con una región ubicada a la derecha

del sitio diana en el locus del gen del segundo factor de supervivencia, en donde el locus del gen del factor de supervivencia se escinde en el sitio diana y el segundo ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo factor tolerogénico se inserta en el locus del gen del factor de supervivencia, interrumpiendo de este modo el gen del factor de supervivencia.

67. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 66, en donde el gen de supervivencia es TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK o MANF.

68. El proceso de la reivindicación 67, en donde el gen de supervivencia es TXNIP.

69. El proceso de la reivindicación 68, en donde el segundo ARNg comprende una secuencia espaciadora correspondiente a una secuencia diana que consiste en la SEQ ID NO: 20.

70. El proceso de las reivindicaciones 68 o 69, en donde la secuencia de nucleótidos de (c)(2)(i) consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 25, y la secuencia de nucleótidos de (c)(2)(iii) consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 32.

71. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 64 a 70, en donde la segunda nucleasa guiada por ARN es una nucleasa Cas9.

72. El proceso de la reivindicación 71, en donde la nucleasa Cas9 se une a al menos una señal de localización nuclear.

73. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 64 a 72, en donde la segunda RNP comprende una relación molar de segundo ARNg:segunda nucleasa guiada por ARN de 3:1.

74. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 73, en donde el segundo factor tolerogénico es PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 o CD47.

75. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 74, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo factor tolerogénico está unida operativamente a un promotor exógeno.

76. El proceso de la reivindicación 75, en donde el promotor exógeno es un promotor de CMV, EF1 α , PGK, CAG o UBC.

77. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 76, en donde el segundo factor tolerogénico es HLA-E.

78. El proceso de la reivindicación 77, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica HLA-E comprende una secuencia que codifica un trímero de HLA-E que comprende un péptido señal de B2M fusionado a un péptido de presentación de HLA-G fusionado a una proteína de membrana B2M fusionada a HLA-E sin su péptido señal.

79. El proceso de la reivindicación 78, en donde la secuencia que codifica el trímero de HLA-E consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 55.

80. El proceso de las reivindicaciones 78 o 79, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica HLA-E está unida operativamente a un promotor CAG.

81. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 77 a 80, en donde el segundo vector comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 34 o 56.

82. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 81, en donde la clasificación de células individuales en (e) comprende la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), la clonación de células individuales, la expansión de dichas células clasificadas en células individuales o una combinación de las mismas.

83. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 82, en donde la caracterización en (f) comprende el análisis de ADN para el perfil de cigosidad y/o indel.

84. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 83, en donde la caracterización en (f) comprende análisis celulares para determinar la morfología, viabilidad, cariotipo, niveles de endotoxina, niveles de micoplasma, análisis de dianas activadas/inactivadas, inserción de vectores aleatoriamente, Cas9 residual, vector residual, estado de pluripotencia, capacidad de diferenciación o una combinación de los mismos.

85. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 84, en donde el proceso comprende además la congelación antes de la caracterización en (f).