

REIVINDICACIONES

1. Un método de generación de una célula genéticamente modificada, comprendiendo el método modificar genéticamente una célula mediante:

(i) la introducción de una delección y/o inserción de al menos un par de bases en el genoma de la célula en un sitio dentro o cerca del locus del gen beta-2 microglobulina (B2M);
y

(ii) la introducción en el genoma de la célula de una inserción de un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico, en donde el factor tolerogénico es el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), en el que el polinucleótido que codifica PD-L1 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 17,

en donde la modificación genética comprende administrar un sistema de endonucleasa guiada por ARN, en donde el sistema de endonucleasa guiada por ARN es un sistema CRISPR que comprende una nucleasa CRISPR y un ARN guía, en donde el ARN guía comprende una secuencia espaciadora que comprende una secuencia de ARN correspondiente a cualquiera de SEQ ID NOS: 1-3 o SEQ ID NOS: 35-44, en donde el sistema se dirige al sitio dentro del locus del gen B2M, y el polinucleótido que codifica el factor tolerogénico está flanqueado por (a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 que tiene homología de secuencia con una región ubicada a la izquierda del sitio en (i) y (b) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 que tiene una homología de secuencia con una región ubicada a la derecha del sitio en (i), en donde el locus del gen B2M se escinde en el sitio diana y el polinucleótido que codifica PD-L1 se inserta en el locus del gen B2M en un sitio dentro de 50 pares de bases de del sitio de (i), generando así la célula genéticamente modificada, en donde el método es realizado *in vitro*.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la célula genéticamente modificada tiene mayor evasión inmunitaria y/o mayor supervivencia celular en comparación con una célula no modificada.

3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el polinucleótido que codifica PD-L1 está unido operativamente a un promotor exógeno.

4. El método de la reivindicación 3, en donde el promotor exógeno es un promotor constitutivo, inducible, temporal, específico del tejido o específico del tipo de célula, en donde, opcionalmente, el promotor exógeno es un promotor de CMV, EFla, PGK, CAG o UBC.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la nucleasa CRISPR es Cas9, Cpf1, un homólogo de las mismas, una versión modificada de las mismas, una versión con optimización de codones de las mismas o cualquier combinación de las mismas.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la nucleasa CRISPR es una Cas9 de *S. pyogenes*.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la nucleasa CRISPR comprende una señal de localización nuclear N-terminal (NLS) y/o una NLS C-terminal.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la nucleasa CRISPR y el ARN guía están presentes en una proporción en peso de 1:1.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la célula es una célula de mamífero, opcionalmente, en donde la célula es una célula humana.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la célula es una célula madre.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la célula es una célula madre pluripotente (PSC), una célula madre embrionaria (ESC), una célula madre adulta (ASC), una célula madre pluripotente inducida (iPSC) o una célula madre y progenitora hematopoyética (HSPC).
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la célula es una célula diferenciada o una célula somática.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la célula genéticamente modificada es capaz de diferenciarse en células progenitoras de linaje restringido o células somáticas completamente diferenciadas.
14. El método de la reivindicación 13, en donde las células progenitoras de linaje restringido son células progenitoras endodérmicas pancreáticas, células progenitoras endocrinas pancreáticas, células progenitoras mesenquimatosas, células progenitoras musculares, blastocitos o células progenitoras neuronales.
15. El método de la reivindicación 13, en donde las células somáticas completamente diferenciadas son células secretoras endocrinas tales como células beta pancreáticas, células

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

16. Una pluralidad de células genéticamente modificadas generadas mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde al menos una porción de la pluralidad de células genéticamente modificadas comprende;

(i) Una delección dentro o cerca del locus del gen beta-2-microglobulina (B2M); y

(ii) Una inserción de un polinucleótido que codifica un factor tolerogénico en un sitio dentro de 50 pares de bases de una delección genética de (i), en donde el factor tolerogénico es el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), y en donde el polinucleótido que codifica PD -L1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17.

17. La pluralidad de células genéticamente modificadas de la reivindicación 16, mantenidas durante un tiempo y en condiciones suficientes para que las células se sometan a diferenciación.

18. Una composición que comprende células que comprenden:

(i) Una delección dentro o cerca del locus del gen beta-2-microglobulina (B2M); y

(ii) Una inserción de un polinucleótido que codifica a un factor tolerogénico en un sitio dentro de 50 pares de bases del sitio de una delección genética de (i), en donde el factor tolerogénico es el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), en donde el polinucleótido que codifica el factor tolerogénico está flanqueado por (a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 que tiene homología de secuencia con una región ubicada a la izquierda del sitio en (i) y (b) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 que tiene una homología de secuencia con una región ubicada a la derecha del sitio en (i), y en donde el polinucleótido que codifica PD-L1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17.