

GENERACIÓN ALTERNATIVA DE CÉLULAS T HUMANAS ALOGENEICAS

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos No. 63/242,909, presentada el 10 de Septiembre de 2021, cuyo contenido se incorpora específicamente como referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[002] La inmunoterapia adoptiva implica la transferencia de células T autólogas específicas de antígeno generadas ex vivo a un paciente y ha demostrado ser una estrategia prometedora para el tratamiento de cánceres, infecciones y enfermedades autoinmunes. Las células T utilizadas para la inmunoterapia adoptiva son células primarias diseñadas por ingeniería genética para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T recombinante (TCR) y expandirse ex vivo para redirigir las células inmunitarias primarias contra células patológicas, tales como las células cancerosas. Los CAR son moléculas sintéticas similares a anticuerpos que consisten de una fracción objetivo asociada con uno o más dominios de señalización en una sola molécula de fusión y están diseñadas para transmitir especificidad de antígeno a las células T. Los CAR han permitido con éxito que las células T se redirijan contra antígenos expresados en la superficie de

células tumorales de diversas neoplasias malignas, incluidos linfomas y tumores sólidos. Las células T que expresan CAR también exhiben eficacia a largo plazo para el tratamiento de ciertos tipos de cánceres.

[003] Sin embargo, la inmunoterapia adoptiva se basa actualmente en la transferencia de células autólogas. En la inmunoterapia autóloga, un paciente recibe un tratamiento personalizado basado en sus propios linfocitos, que fueron aislados del paciente, modificados genéticamente o seleccionados *ex vivo*, cultivados *in vitro* y reinfundidos en el paciente. A pesar de la aprobación y el éxito general de las terapias de inmunoterapia adoptiva autóloga, la escalabilidad y viabilidad de tales terapias presentan desafíos importantes. La terapia de inmunoterapia adoptiva autóloga sigue siendo bastante complicada: requiere experiencia y gestión clínica, además de costosas instalaciones dedicadas. Muchos pacientes tampoco pueden recibir inmunoterapia adoptiva debido a la rápida progresión de la enfermedad durante la manufacturación del CAR o a la degradación de la función inmune del paciente antes de tal tratamiento. Como tal, la aplicación clínica generalizada de la inmunoterapia contra el cáncer está limitada por la considerable restricción económica impuesta por la preparación personalizada de células CART autólogas. Por consiguiente, existe la necesidad de una inmunoterapia adoptiva estandarizada en la que las células terapéuticas

alogeneicas estén pre-manufacturadas, caracterizadas en detalle y disponibles para administración inmediata a una amplia gama de pacientes.

[004] La inmunoterapia alogeneica sigue siendo un procedimiento peligroso con muchas posibles complicaciones, tal como las respuestas alogeneicas de las células T, que se manifiesta clínicamente como enfermedad de injerto contra hospederio (GVHD) y/o enfermedad de hospederio contra injerto (HvGD, rechazo del injerto). La GvHD es causada por el ataque de los tejidos del receptor por células CAR-T alogeneicas infundidas mediadas por TCR aloreactivo en células CAR del donante. En particular, las cadenas endógenas del receptor de células T alfa ($TCR\alpha$; TRAC) y beta ($TCR\beta$; TRBC) en células T infundidas pueden reconocer antígenos de histocompatibilidad mayores y menores en el receptor, lo que lleva a (GvHD). Por el contrario, las células CART alogeneicas infundidas pueden ser rechazadas por los linfocitos T del receptor, lo que conduce a HvGD. Como tal, la aplicabilidad y versatilidad de la inmunoterapia adoptiva mejorarán mediante el uso de células T con CAR alogeneicas siempre que se identifique una solución estandarizada que controle las respuestas inmunes alogeneicas inherentes. La inhibición específica de GvHD permitirá el uso seguro y efectivo de células CART alogeneicas.

[005] Por consiguiente, existe una necesidad de métodos mejorados de células CAR-T que no

invoquen una respuesta inmune del hospedero. Específicamente, existe una necesidad de composiciones y métodos novedosos y alternativos para generar células T alogeneicas con aptitud mejorada.

[006] La presente invención proporciona métodos y composiciones que atienden estas necesidades.

SUMARIO DE LA INVENCION

[007] En un aspecto, la presente descripción proporciona una célula inmunitaria modificada que comprende: (a) una inserción y/o supresión en uno o más loci del gen, que codifica cada uno una proteína inmune endógena seleccionada a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). La inserción y/o supresión es capaz de regular negativamente la expresión del gen de uno o más genes inmunes endógenos. Además, la célula inmunitaria modificada comprende (b) un ácido nucleico exógeno que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor de células T diseñado por ingeniería genética (TCR), un receptor similar a inmunoglobulina de células Asesinas (KIR), un polipéptido de unión al antígeno, un ligando del receptor de la superficie celular, o un antígeno tumoral. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada comprende además un receptor negativo dominante, un receptor de cambio, una quimiocina, un receptor de

quimiocina, una citocina, un receptor de citocina, IL-7, IL-7R, IL-15, IL-15R, IL-21, IL-18, CCL21, CCL19, o cualquier combinación de los mismos.

[008] En algunas modalidades, la inserción y/o supresión es capaz de regular negativamente la expresión del gen de: (a) una subunidad del receptor de células T seleccionada a partir de CD3 δ , CD3 ϵ , y/o CD3 γ ; (b) una molécula HLA clase I seleccionada a partir de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, y/o NLRC5; y (c) una molécula HLA clase II seleccionada a partir de HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y/o cadena invariante (Cadena Ii).

[009] En algunas modalidades, la inserción y/o supresión es capaz de regular negativamente (a) la expresión del gen de CD3 δ , y (b) la expresión del gen de una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y cualquier combinación de los mismos.

[0010] En algunas modalidades, la inserción y/o supresión es capaz de regular negativamente: (a) la expresión del gen de CD3 ϵ , y (b) la expresión del gen de una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, CIITA, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), o cualquier combinación de los mismos.

[0011] En algunas modalidades, la

inserción y/o supresión es capaz de regular negativamente: (a) la expresión del gen de CD3 γ , y (b) la expresión del gen de una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, CIITA, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), o cualquier combinación de los mismos.

[0012] En algunas modalidades, la inserción y/o supresión es capaz de regular negativamente la expresión del gen de: (a) CD3 ϵ , B2M, y CIITA; (b) CD3 ϵ , B2M, y RFX5; (c) CD3 ϵ , B2M, y RFXAP; (d) CD3 ϵ , B2M, y RFXANK; (e) CD3 ϵ , B2M, y HLA-DM; (f) CD3 ϵ , B2M, y cadena Ii; (g) CD3 ϵ , TAP1, y CIITA; (h) CD3 ϵ , TAP1, y RFX5; (i) CD3 ϵ , TAP1, y RFXAP; (j) CD3 ϵ , TAP1, y RFXANK; (k) CD3 ϵ , TAP1, y HLA-DM; (l) CD3 ϵ , TAP1, y cadena Ii; (m) CD3 ϵ , TAP2, y CIITA; (n) CD3 ϵ , TAP2, y RFX5; (o) CD3 ϵ , TAP2, y RFXAP; (p) CD3 ϵ , TAP2, y RFXANK; (q) CD3 ϵ , TAP2, y HLA-DM; (r) CD3 ϵ , TAP2, y cadena Ii; (s) CD3 ϵ , NLRC5, y CIITA; (t) CD3 ϵ , NLRC5, y RFX5; (u) CD3 ϵ , NLRC5, y RFXAP; (v) CD3 ϵ , NLRC5, y RFXANK; (w) CD3 ϵ , NLRC5, y HLA-DM; (x) CD3 ϵ , NLRC5, y cadena Ii; (y) CD3 ϵ , TAPBP, y CIITA; (z) CD3 ϵ , TAPBP, y RFX5; (aa) CD3 ϵ , TAPBP, y RFXAP; (bb) CD3 ϵ , TAPBP, y RFXANK; (cc) CD3 ϵ , TAPBP, y HLA-DM; o (dd) CD3 ϵ , TAPBP, y cadena Ii.

[0013] En algunas modalidades, la inserción y/o supresión es capaz de regular negativamente la expresión del gen de: (a) CD3 δ , B2M, y CIITA; (b) CD3 δ , B2M, y RFX5; (c) CD3 δ , B2M, y RFXAP; (d) CD3 δ , B2M, y RFXANK; (e)

CD3 δ , B2M, y HLA-DM; (f) CD3 δ , B2M, y cadena Ii; (g) CD3 δ , TAP1, y CIITA; (h) CD3 δ , TAP1, y RFX5; (i) CD3 δ , TAP1, y RFXAP; (j) CD3 δ , TAP1, y RFXANK; (k) CD3 δ , TAP1, y HLA-DM; (l) CD3 δ , TAP1, y cadena Ii; (m) CD3 δ , TAP2, y CIITA; (n) CD3 δ , TAP2, y RFX5; (o) CD3 δ , TAP2, y RFXAP; CD3 δ , TAP2, y RFXANK; CD3 δ , TAP2, y HLA-DM; (r) CD3 δ , TAP2, y cadena Ii; (s) CD3 δ , NLRC5, y CIITA; (t) CD3 δ , NLRC5, y RFX5; (u) CD3 δ , NLRC5, y RFXAP; (v) CD3 δ , NLRC5, y RFXANK; (w) CD3 δ , NLRC5, y HLA-DM; (x) CD3 δ , NLRC5, y cadena Ii; (y) CD3 δ , TAPBP, y CIITA; (z) CD3 δ , TAPBP, y RFX5; (aa) CD3 δ , TAPBP, y RFXAP; (bb) CD3 δ , TAPBP, y RFXANK; (cc) CD3 δ , TAPBP, y HLA-DM; o (dd) CD3 δ , TAPBP, y cadena Ii.

[0014]

En algunas modalidades, la inserción y/o supresión es capaz de regular negativamente la expresión del gen de: (a) CD3 γ , B2M, y CIITA; (b) CD3 γ , B2M, y RFX5; (c) CD3 γ , B2M, y RFXAP; (d) CD3 γ , B2M, y RFXANK; (e) CD3 γ , B2M, y HLA-DM; (f) CD3 γ , B2M, y cadena Ii; (g) CD3 γ , TAP1, y CIITA; (h) CD3 γ , TAP1, y RFX5; (i) CD3 γ , TAP1, y RFXAP; (j) CD3 γ , TAP1, y RFXANK; (k) CD3 γ , TAP1, y HLA-DM; (l) CD3 γ , TAP1, y cadena Ii; (m) CD3 γ , TAP2, y CIITA; (n) CD3 γ , TAP2, y RFX5; (o) CD3 γ , TAP2, y RFXAP; (p) CD3 γ , TAP2, y RFXANK; (q) CD3 γ , TAP2, y HLA-DM; (r) CD3 γ , TAP2, y cadena Ii; (s) CD3 γ , NLRC5, y CIITA; (t) CD3 γ , NLRC5, y RFX5; (u) CD3 γ , NLRC5, y RFXAP; (v) CD3 γ , NLRC5, y RFXANK; (w) CD3 γ , NLRC5, y HLA-DM; (x) CD3 γ , NLRC5, y cadena Ii; (y) CD3 γ , TAPBP, y CIITA; (z) CD3 γ , TAPBP, y RFX5; (aa) CD3 γ , TAPBP, y RFXAP;

(bb) CD3 γ , TAPBP, y RFXANK; (cc) CD3 γ , TAPBP, y HLA-DM; o (dd) CD3 γ , TAPBP, y cadena Ii.

[0015] En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada se selecciona a partir del grupo que consiste de una célula T, una célula asesina natural (célula NK), una célula T asesina natural, una célula progenitora linfoide, una célula troncal hematopoyética, una célula troncal, un macrófago, una célula dendrítica, o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada es una célula T CD4⁺ o célula T CD8⁺. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada es una célula T alogeneica o célula T humana autóloga.

[0016] En algunas modalidades, la inserción y/o supresión es el resultado de la edición del gen seleccionada a partir del grupo que consiste de: (a) un sistema de endonucleasa asociado a CRISPR (Cas) (CRISPR-Cas) y un ARN de guía; (b) un sistema de edición de gen TALEN, un sistema de edición de gen de nucleasa dedo de zinc (ZFN), un sistema de edición de gen de meganucleasa, o un sistema de edición de gen mega-TALEN; y (c) un sistema de silenciamiento de gen seleccionado a partir de ARN antisentido, ARN antigómero, ARNi, ARNsi, o ARNsh. En algunas modalidades, el sistema CRISPR-Cas comprende un vector pAd5/F35-CRISPR. En algunas modalidades, la endonucleasa Cas comprende Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d,

Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, *S. pyogenes* Cas9, *Staphylococcus aureus* Cas9, nucleasa MAD7 (una nucleasa CRISPR tipo V), o cualquier combinación de las mismas.

[0017] En algunas modalidades, el sistema de endonucleasa CRISPR-Cas comprende un ARN de guía. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro de uno o más loci de gen que codifica cada proteína inmune seleccionada a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). En algunas modalidades, el ARN de guía es complementario con una secuencia dentro de uno o más exones de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ . En algunas modalidades, el ARN de guía es complementario con una secuencia dentro del exón 1 de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ .

[0018] En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen CD3 δ y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 53. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen CD3 ϵ y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 52. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen CD3 γ y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la

SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen B2M y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 55. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen CIITA y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 61. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen TAP1 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 56. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen TAP2 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 57. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen TAPBP y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen NRLC5 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 60. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen HLA-DM y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 62. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen

RFX5 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen RFXANK y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 65. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen RFXAP y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 66. En algunas modalidades, la secuencia complementaria del ARN de guía está dentro del locus del gen de Cadena Ii y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, o cualquier combinación de las mismas.

[0019] En un aspecto de la presente descripción, la célula inmunitaria modificada ejerce una respuesta inmune reducida en un sujeto cuando la célula inmunitaria modificada se administra al sujeto, comparada con la respuesta inmune ejercida por una célula inmunitaria no modificada administrada al mismo sujeto.

[0020] En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada ejerce una respuesta inmune reducida en un sujeto cuando la célula inmunitaria modificada se administra al sujeto, comparada con la respuesta inmune ejercida por una célula inmunitaria que comprende una inserción y/o supresión capaz de regular negativamente la

expresión del gen de TRAC, TRBC, B2M, y CIITA. En algunas modalidades, la respuesta inmune es una respuesta de la enfermedad de injerto contra hospedero (GvHD). En algunas modalidades, la respuesta reducida de GvHD por la célula inmunitaria modificada es comparada con una célula inmunitaria equivalente sin la supresión y/o inserción en uno o más loci del gen, o una célula inmunitaria que comprende la supresión y/o inserción en TRAC, TRBC, B2M, y CIITA. En algunas modalidades, la respuesta de GvHD reducida es provocada contra una célula desemparejada HLA-I o contra una célula emparejada HLA-II.

[0021]

En algunas modalidades, la respuesta de GvHD es reducida por aproximadamente 10% o más, aproximadamente 20% o más, aproximadamente 30% o más, aproximadamente 40% o más, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 70% o más, aproximadamente 80% o más, aproximadamente 90% o más, o aproximadamente 95% o más. En algunas modalidades, la respuesta de GvHD es reducida por aproximadamente 1-vez o más, aproximadamente 2-veces o más, aproximadamente 3-veces o más, aproximadamente 4-veces o más, aproximadamente 5-veces o más, aproximadamente 6-veces o más, aproximadamente 7-veces o más, aproximadamente 8-veces o más, aproximadamente 9-veces o más, aproximadamente 10-veces o más, aproximadamente 20-veces o más, aproximadamente 30-veces o más, aproximadamente 50-veces o más, aproximadamente 100-veces o más, aproximadamente 150-

veces o más, o aproximadamente 200-veces o más.

[0022] En un aspecto de la presente descripción, el ácido nucleico exógeno codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio de unión al antígeno, un dominio bisagra, un dominio de la transmembrana, un dominio de señalización coestimuladora, y un dominio de señalización intracelular. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo de longitud completa o un fragmento del mismo de unión al antígeno, un Fab, un F(ab)₂, un Fab₂ monoespecífico, un Fab₂ biespecífico, un Fab₂ triespecífico, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), un diacuerpo, un triacuerpo, un minicuerpo, un V-NAR, o un VhH.

[0023] En algunas modalidades de la célula inmunitaria modificada, el dominio de la transmembrana se selecciona a partir de una secuencia hidrofóbica artificial, un dominio de la transmembrana de una proteína de la transmembrana tipo I, una cadena alfa, beta, o zeta de un receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD2, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), ICOS (CD278), CD154, CD357 (GITR), receptor 1 similar a Toll (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, y un dominio de la transmembrana derivado a partir de un receptor similar a la inmunoglobulina asesina (KIR).

[0024] En algunas modalidades de la

célula inmunitaria modificada, el dominio coestimulador comprende uno o más de un dominio coestimulador de una proteína seleccionada a partir del grupo que consiste de proteínas en la superfamilia del TNFR, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS (CD278), NKG2C, B7-H3 (CD276), y un dominio intracelular derivado a partir de un receptor similar a inmunoglobulina asesina (KIR), o una variante de los mismos.

[0025] En algunas modalidades de la célula inmunitaria modificada, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio intracelular seleccionado a partir del grupo que consiste de dominios de señalización citoplásmica de una cadena zeta CD2, CD3 humana (CD3 ζ), Fc γ RIII, Fc ϵ RI, una cola citoplásmica de un receptor Fc, una porción de activación a base de tirosina del inmunorreceptor (ITAM) que lleva el receptor citoplásmico, TCR zeta, FcR gamma, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, y CD66d, o una variante de los mismos. En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular comprende una cadena zeta CD3 humana (CD3 ζ).

[0026] En algunas modalidades de la célula inmunitaria modificada, el dominio de unión al antígeno se dirige a un antígeno tumoral asociado con una neoplasia maligna hematológica, y/o asociado con un tumor sólido. En algunas modalidades, el dominio de unión al

antígeno se dirige a un antígeno tumoral seleccionado a partir del grupo que consiste de ROR1, mesotelina, c-Met, PSMA, PSCA, receptor de Folato alfa, receptor de Folato beta, EGFR, EGFRvIII, GPC2, GPC2, Mucina 1(MUC1), antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAca-Ser/Thr)), TnMUC1, receptor alfa-4 de la familia GDNF (GFRa4), proteína de activación del fibroblasto (FAP), y subunidad alfa-2 del receptor de Interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2).

[0027] En algunas modalidades, el CAR comprende (a) un dominio de unión al antígeno PSMA, un dominio coestimulador CD2, y un dominio de señalización intracelular CD3 zeta; o (b) un dominio de unión al antígeno de mesotelina, un dominio coestimulador 4-1BB, y un dominio de señalización CD3 zeta; o (c) un dominio de unión al antígeno TnMUC1, un dominio coestimulador CD2, y un dominio de señalización CD3 zeta.

[0028] En un aspecto de la presente descripción, la célula inmunitaria modificada comprende además un receptor de cambio. En algunas modalidades, el receptor de cambio comprende un domino extracelular de una proteína de señalización asociada con una señal negativa, un dominio de la transmembrana, y un dominio intracelular de una proteína de señalización asociada con una señal positiva.

[0029] En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada comprende además un receptor negativo dominante. En algunas modalidades, el receptor

negativo dominante comprende (a) una variante truncada de una proteína de tipo silvestre asociada con una señal negativa; o (b) una variante de una proteína de tipo silvestre asociada con una señal negativa que comprende un dominio extracelular, un dominio de la transmembrana, y que carece sustancialmente de un dominio de señalización intracelular; o (c) un dominio extracelular de una proteína de señalización asociada con una señal negativa, y un dominio de la transmembrana. En algunas modalidades, el receptor negativo dominante es el receptor negativo dominante PD1, VSIG3, VSIG8, o TGF β R.

[0030] En algunas modalidades, la proteína asociada con la señal negativa se selecciona a partir del grupo que consiste de CTLA4, PD-1, TGF β R11, BTLA, VSIG3, VSIG8, y TIM-3. En algunas modalidades, la proteína asociada con la señal positiva se selecciona a partir del grupo que consiste de CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS, y CD27.

[0031] En algunas modalidades, el receptor de cambio se selecciona a partir del grupo que consiste de PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β R11-CD27, TGF β R11-CD28, TGF β R11-4-1BB, TGF β R11-ICOS,

TGF β R_{II}-IL12R β 1, y TGF β R_{II}-IL12R β 2.

[0032] En algunas modalidades de la célula inmunitaria modificada, el dominio de la transmembrana del receptor de cambio se selecciona a partir de un dominio de la transmembrana de una proteína seleccionada a partir del grupo que consiste de CTLA4, PD-1, VSIG3, VSIG8, TGF β R_{II}, BTLA, TIM-3, CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS, y CD27. En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana del receptor de cambio se selecciona a partir de la transmembrana de la proteína asociada con una señal negativa o el dominio de la transmembrana de la proteína asociada con la señal negativa.

[0033] En un aspecto, la presente descripción proporciona una célula T modificada aislada, que comprende al menos un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). En algunas modalidades, la célula T modificada que comprende el polipéptido funcionalmente alterado exhibe al menos uno de (i) expresión reducida del receptor de células T comparada con una célula T no modificada; (ii) expresión reducida del polipéptido alterado; (iii) ausencia completa de la expresión de superficie del complejo del receptor de células T; y/o (iv) reticulación reducida o insuficiente del receptor de células T. En algunas modalidades, la célula T ejerce una respuesta

inmune reducida en un sujeto cuando la célula T modificada se administra al sujeto, comparada con la respuesta inmune ejercida por una célula T no modificada administrada al mismo sujeto.

[0034] En algunas modalidades, la célula T comprende dos o más polipéptidos funcionalmente alterados, y en donde el segundo polipéptido alterado es la cadena α del receptor de células T (TRAC) y/o cadena β del receptor de células T (TRBC).

[0035] En algunas modalidades, la célula T modificada comprende: (a) tres o más polipéptidos funcionalmente alterados seleccionados a partir de TRAC, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii; o (b) dos polipéptidos funcionalmente alterados seleccionados a partir de CD3 α , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii; o (c) tres polipéptidos funcionalmente alterados seleccionados a partir de CD3 α , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii; o (d) un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , y CD3 γ , y al menos un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir de TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii; o (e) un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir del grupo que consiste de CD3 δ ,

CD3 ϵ , y CD3 γ , y un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir de TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii.

[0036] En algunas modalidades, la célula T modificada comprende: (a) CD3 δ funcionalmente alterado y al menos un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir de TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii; (b) CD3 ϵ funcionalmente alterado y al menos un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir de TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii; o (c) CD3 γ funcionalmente alterado y al menos un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir de TRAC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii.

[0037] En algunas modalidades, la célula T modificada comprende dos o más polipéptidos funcionalmente alterados seleccionados a partir de TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii. En algunas modalidades, la célula T modificada tiene una expresión reducida de TRAC, TRBC, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena Ii, o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, la célula T modificada no expresa CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena Ii, o cualquier

combinación de las mismas.

[0038] En algunas modalidades, la célula T modificada comprende además un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir de TRAC, TRBC, B2M, y C2TA. En algunas modalidades, la célula T modificada tiene una expresión reducida de TRAC, TRBC, B2M, o C2TA o no expresa TRAC, TRBC, B2M, o C2TA. En algunas modalidades, la modificación de CD3 δ , CD3 ϵ , y/o CD3 γ conduce a una función alterada del complejo TCR/CD3. En algunas modalidades, al menos uno de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ es modificado dirigiendo uno o más exones de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ , opcionalmente el exón 1 de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ .

[0039] Un aspecto de la presente descripción proporciona un método para generar una célula inmunitaria modificada que comprende: (a) introducir en la célula inmunitaria uno o más ácidos nucleicos capaces de regular negativamente la expresión del gen de uno o más genes inmunes endógenos que codifican una proteína inmune endógena seleccionada a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii); (b) introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico exógeno que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor de células T diseñado por ingeniería genética (TCR), un receptor similar a inmunoglobulina de células Asesinas (KIR), un polipéptido de unión al antígeno, un ligando del

receptor de la superficie celular, o un antígeno tumoral; y (c) expandir la célula inmunitaria modificada para generar una población de células T. En algunas modalidades, el método para generar una célula inmunitaria modificada que comprende además introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico exógeno que codifica un receptor negativo dominante, un receptor de cambio, o una combinación de los mismos.

[0040] En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos introducidos en la célula inmunitaria modificada son capaces de regular negativamente la expresión del gen de: (a) una subunidad del receptor de células T seleccionada a partir de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ ; y/o (b) una molécula HLA clase I seleccionada a partir de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, o NLRC5; y/o (c) una molécula HLA clase II seleccionada a partir de HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena invariante (Cadena Ii).

[0041] En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos introducidos en la célula inmunitaria modificada son capaces de regular negativamente la expresión del gen de CD3 δ , y la expresión del gen de una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos introducidos en la célula inmunitaria modificada son capaces de regular negativamente la expresión del gen de CD3 ϵ , y una molécula de

HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, CIITA, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos introducidos en la célula inmunitaria modificada son capaces de regular negativamente la expresión del gen de CD3 γ , y una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, CIITA, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos.

[0042]

En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos introducidos en la célula inmunitaria modificada son capaces de regular negativamente la expresión del gen de (a) CD3 ϵ , B2M, y CIITA; (b) CD3 ϵ , B2M, y RFX5; (c) CD3 ϵ , B2M, y RFXAP; (d) CD3 ϵ , B2M, y RFXANK; (e) CD3 ϵ , B2M, y HLA-DM; (f) CD3 ϵ , B2M, y cadena Ii; (g) CD3 ϵ , TAP1, y CIITA; (h) CD3 ϵ , TAP1, y RFX5; (i) CD3 ϵ , TAP1, y RFXAP; (j) CD3 ϵ , TAP1, y RFXANK; (k) CD3 ϵ , TAP1, y HLA-DM; (l) CD3 ϵ , TAP1, y cadena Ii; (m) CD3 ϵ , TAP2, y CIITA; (n) CD3 ϵ , TAP2, y RFX5; (o) CD3 ϵ , TAP2, y RFXAP; (p) CD3 ϵ , TAP2, y RFXANK; (q) CD3 ϵ , TAP2, y HLA-DM; (r) CD3 ϵ , TAP2, y cadena Ii; (s) CD3 ϵ , NLRC5, y CIITA; (t) CD3 ϵ , NLRC5, y RFX5; (u) CD3 ϵ , NLRC5, y RFXAP; (v) CD3 ϵ , NLRC5, y RFXANK; (w) CD3 ϵ , NLRC5, y HLA-DM; (x) CD3 ϵ , NLRC5, y cadena Ii; (y) CD3 ϵ , TAPBP, y CIITA; (z) CD3 ϵ , TAPBP, y RFX5; (aa) CD3 ϵ , TAPBP, y RFXAP; (bb) CD3 ϵ , TAPBP, y RFXANK; (cc) CD3 ϵ , TAPBP, y HLA-DM; o (dd) CD3 ϵ , TAPBP, y

cadena Ii.

[0043]

En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos introducidos en la célula inmunitaria modificada son capaces de regular negativamente la expresión del gen de: (a) CD3 δ , B2M, y CIITA; (b) CD3 δ , B2M, y RFX5; (c) CD3 δ , B2M, y RFXAP; (d) CD3 δ , B2M, y RFXANK; (e) CD3 δ , B2M, y HLA-DM; (f) CD3 δ , B2M, y cadena Ii; (g) CD3 δ , TAP1, y CIITA; (h) CD3 δ , TAP1, y RFX5; (i) CD3 δ , TAP1, y RFXAP; (j) CD3 δ , TAP1, y RFXANK; (k) CD3 δ , TAP1, y HLA-DM; (l) CD3 δ , TAP1, y cadena Ii; (m) CD3 δ , TAP2, y CIITA; (n) CD3 δ , TAP2, y RFX5; (o) CD3 δ , TAP2, y RFXAP; (p) CD3 δ , TAP2, y RFXANK; (q) CD3 δ , TAP2, y HLA-DM; (r) CD3 δ , TAP2, y cadena Ii; (s) CD3 δ , NLRC5, y CIITA; (t) CD3 δ , NLRC5, y RFX5; (u) CD3 δ , NLRC5, y RFXAP; (v) CD3 δ , NLRC5, y RFXANK; (w) CD3 δ , NLRC5, y HLA-DM; (x) CD3 δ , NLRC5, y cadena Ii; (y) CD3 δ , TAPBP, y CIITA; (z) CD3 δ , TAPBP, y RFX5; (aa) CD3 δ , TAPBP, y RFXAP; (bb) CD3 δ , TAPBP, y RFXANK; (cc) CD3 δ , TAPBP, y HLA-DM; o (dd) CD3 δ , TAPBP, y cadena Ii.

[0044]

En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos introducidos en la célula inmunitaria modificada son capaces de regular negativamente la expresión del gen de: (a) CD3 γ , B2M, y CIITA; (b) CD3 γ , B2M, y RFX5; (c) CD3 γ , B2M, y RFXAP; (d) CD3 γ , B2M, y RFXANK; (e) CD3 γ , B2M, y HLA-DM; (f) CD3 γ , B2M, y cadena Ii; (g) CD3 γ , TAP1, y CIITA; (h) CD3 γ , TAP1, y RFX5; (i) CD3 γ , TAP1, y RFXAP; (j) CD3 γ , TAP1, y RFXANK; (k) CD3 γ , TAP1, y HLA-DM; (l) CD3 γ , TAP1, y

cadena Ii; (m) CD3 γ , TAP2, y CIITA; (n) CD3 γ , TAP2, y RFX5; (o) CD3 γ , TAP2, y RFXAP; (p) CD3 γ , TAP2, y RFXANK; (q) CD3 γ , TAP2, y HLA-DM; (r) CD3 γ , TAP2, y cadena Ii; (s) CD3 γ , NLRC5, y CIITA; (t) CD3 γ , NLRC5, y RFX5; (u) CD3 γ , NLRC5, y RFXAP; (v) CD3 γ , NLRC5, y RFXANK; (w) CD3 γ , NLRC5, y HLA-DM; (x) CD3 γ , NLRC5, y cadena Ii; (y) CD3 γ , TAPBP, y CIITA; (z) CD3 γ , TAPBP, y RFX5; (aa) CD3 γ , TAPBP, y RFXAP; (bb) CD3 γ , TAPBP, y RFXANK; (cc) CD3 γ , TAPBP, y HLA-DM; o (dd) CD3 γ , TAPBP, y cadena Ii.

[0045] En algunas modalidades, la célula inmunitaria que será modificada se selecciona a partir del grupo que consiste de una célula T, una célula asesina natural (célula NK), una célula T asesina natural, una célula progenitora linfoide, una célula troncal hematopoyética, una célula troncal, un macrófago, y una célula dendrítica. En algunas modalidades, la célula inmunitaria que será modificada la célula inmunitaria es una célula T CD4+ o célula T CD8+. En algunas modalidades, la célula inmunitaria que será modificada es una célula T alogeneica o célula T autóloga.

[0046] En algunas modalidades, los ácidos nucleicos se introducen en la célula inmunitaria mediante transducción viral. En algunas modalidades, la transducción viral comprende poner en contacto la célula inmunitaria con un vector viral que comprende uno o más ácidos nucleicos. En algunas modalidades, el vector viral se

selecciona a partir del grupo que consiste de un vector retroviral, vectores virales sendai, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, y vectores lentivirales.

[0047] En algunas modalidades, cada uno de uno o más ácidos nucleicos que son capaces de regular negativamente la expresión de uno o más genes inmunes endógenos comprende un sistema de edición de gen seleccionado a partir del grupo que consiste de: (a) un sistema de endonucleasa asociado a CRISPR (Cas) (CRISPR-Cas) y un ARN de guía; (b) un sistema de edición de gen TALEN, un sistema de edición de gen de nucleasa dedo de zinc (ZFN), un sistema de edición de gen de meganucleasa, o un sistema de edición de gen mega-TALEN; y (c) un sistema de silenciamiento de gen seleccionado a partir de ARN antisentido, ARN antigómero, ARNi, ARNsi, o ARNsh.

[0048] En algunas modalidades, la endonucleasa Cas comprende Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, *S. pyogenes* Cas9, *Staphylococcus aureus* Cas9, nucleasa MAD7 (una nucleasa CRISPR tipo V), o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, el sistema CRISPR-Cas comprende un vector pAd5/F35-CRISPR.

[0049] En algunas modalidades, el ARN de guía del sistema CRISPR-Cas comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro de uno o

más loci de gen que codifica cada proteína inmune seleccionada a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii).

[0050] En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro de uno o más exones de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ . En algunas modalidades, el ARN de guía es complementario con una secuencia dentro del exón 1 de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ .

[0051] En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen CD3 δ y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 53. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen CD3 ϵ y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 52. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen CD3 γ y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen B2M

y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 55. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen CIITA y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 61. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen TAP1 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 56. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen TAP2 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 57. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen TAPBP y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen NLRC5 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 60. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia

dentro del locus del gen HLA-DM y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 62. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen RFX5 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen RFXANK y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 65. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen RFXAP y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 66. En algunas modalidades, el ARN de guía introducido en la célula inmunitaria modificada es complementario con una secuencia dentro del locus del gen de Cadena Ii y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico codificada por la SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, o cualquier combinación de las mismas.

[0052]

En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada generada por el método descrito ejerce una respuesta inmune reducida en un sujeto cuando la célula inmunitaria modificada es administrada a un sujeto,

comparada con la respuesta inmune ejercida por una célula inmunitaria no modificada administrada al mismo sujeto.

[0053] En alguna modalidad, la célula inmunitaria modificada generada por el método descrito ejerce una respuesta inmune reducida en un sujeto cuando la célula inmunitaria se administra al sujeto, comparada con la respuesta inmune ejercida por una célula inmunitaria que comprende uno o más ácidos nucleicos capaces de regular negativamente la expresión del gen de TRAC, TRBC, B2M, y CIITA. En algunas modalidades, la respuesta de GvHD reducida por la célula inmunitaria modificada generada por el método descrito es comparada con una célula inmunitaria equivalente sin la supresión y/o inserción en uno o más loci del gen, o una célula inmunitaria que comprende la supresión y/o inserción en TRAC, TRBC, B2M, y CIITA.

[0054] En algunas modalidades, la respuesta inmune es una respuesta de la enfermedad de injerto contra hospedero (GvHD). En algunas modalidades, la respuesta de GvHD reducida es provocada contra una célula desemparejada HLA-I o contra una célula emparejada HLA-II. En algunas modalidades, la respuesta GvHD provocada por una célula inmunitaria modificada generada por el método descrito se reduce por aproximadamente 10% o más, aproximadamente 20% o más, aproximadamente 30% o más, aproximadamente 40% o más, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 70% o más, aproximadamente 80% o más,

aproximadamente 90% o más, o aproximadamente 95% o más. En algunas modalidades, la respuesta GvHD provocada por una célula inmunitaria modificada generada por el método descrito se reduce por aproximadamente 1-veces o más, aproximadamente 2-veces o más, aproximadamente 3-veces o más, aproximadamente 4-veces o más, aproximadamente 5-veces o más, aproximadamente 6-veces o más, aproximadamente 7-veces o más, aproximadamente 8-veces o más, aproximadamente 9-veces o más, aproximadamente 10-veces o más, aproximadamente 20-veces o más, aproximadamente 30-veces o más, aproximadamente 50-veces o más, aproximadamente 100-veces o más, aproximadamente 150-veces o más, o aproximadamente 200-veces o más.

[0055] En algunas modalidades, el ácido nucleico exógeno introducido en la célula inmunitaria codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio de unión al antígeno, un dominio bisagra, un dominio de la transmembrana, un dominio de señalización coestimuladora, y un dominio de señalización intracelular.

[0056] En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno se dirige a un antígeno tumoral asociado con una neoplasia maligna hematológica; y/o asociado con un tumor sólido. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno se dirige a un antígeno tumoral seleccionado a partir del grupo que consiste de ROR1, mesotelina, c-Met, PSMA, PSCA, receptor de Folato alfa,

receptor de Folato beta, EGFR, EGFRvIII, GPC2, GPC2, Mucina 1(MUC1), antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAca-Ser/Thr)), TnMUC1, receptor alfa-4 de la familia GDNF (GFRa4), proteína de activación del fibroblasto (FAP), y subunidad alfa-2 del receptor de Interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2).

[0057] En algunas modalidades, el CAR introducido en la célula inmunitaria modificada comprende: (a) un dominio de unión al antígeno PSMA (por ejemplo, SEQ ID NOs: 73 o 74), un dominio coestimulador CD2, y un dominio de señalización intracelular CD3 zeta; o (b) un dominio de unión al antígeno de mesotelina (por ejemplo, SEQ ID NO: 75), un dominio coestimulador 4-1BB, y un dominio de señalización CD3 zeta; o (c) un dominio de unión al antígeno TnMUC1, un dominio coestimulador CD2, y un dominio de señalización CD3 zeta. En algunas modalidades, el CAR de TnMUC1 comprende una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 70, y el CAR de mesotelina comprende una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72. En algunas modalidades, el CAR de TnMUC1 es codificado por una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 69.

[0058] En un aspecto de la descripción, el receptor de cambio introducido en la célula inmunitaria modificada comprende: (a) un domino extracelular de una proteína de señalización asociada con una señal negativa seleccionado a partir del grupo que consiste de CTLA4, PD-1, VISG3, VSIG8, TGFβRII, BTLA, y TIM-3, (b) un

dominio de la transmembrana, y (c) un dominio intracelular de una proteína de señalización asociada con una señal positiva seleccionado a partir del grupo que consiste de CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS, y CD27.

[0059] En algunas modalidades, el receptor de cambio se selecciona a partir del grupo que consiste de PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β RII-CD27, TGF β RII-CD28, TGF β RII-4-1BB, TGF β RII-ICOS, TGF β RII-IL12R β 1, y TGF β RII-IL12R β 2.

[0060] En algunas modalidades, el receptor negativo dominante introducido en la célula inmunitaria modificada comprende: (a) una variante truncada de una proteína de tipo silvestre asociada con una señal negativa, o (b) una variante de una proteína de tipo silvestre asociada con una señal negativa que comprende un dominio extracelular, un dominio de la transmembrana, y que carece sustancialmente de un dominio de señalización intracelular; o (c) un dominio extracelular de una proteína de señalización asociada con una señal negativa, y un dominio de la transmembrana. En algunas modalidades, el receptor negativo dominante es el receptor negativo dominante PD1,

VSIG3, VSIG8, o TGF β R.

[0061] En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana del receptor de cambio se selecciona a partir de un dominio de la transmembrana de una proteína seleccionada a partir del grupo que consiste de CTLA4, PD-1, BTLA, TGF β RII, BTLA, TIM-3, CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS, y CD27. En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana del receptor de cambio se selecciona a partir de la transmembrana de la proteína asociada con una señal negativa o el dominio de la transmembrana de la proteína asociada con la señal negativa.

[0062] Un aspecto de la presente descripción proporciona expandir la célula inmunitaria modificada. En algunas modalidades, expandir la célula inmunitaria modificada comprende cultivar la célula T con un factor seleccionado a partir del grupo que consiste de flt3-L, IL-1, IL-3, IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, TGF β beta, IL-10, y ligando c-kit. Un aspecto de la presente descripción proporciona además introducir un polipéptido y/o un ácido nucleico que codifica a Klf4, Oct3/4 y Sox2 en la célula inmunitaria para inducir pluripotencia de la célula inmunitaria.

[0063] En algunas modalidades, la célula inmunitaria se obtiene a partir de una muestra de sangre, una muestra de sangre completa, una muestra de célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), o una muestra de

anféresis. En algunas modalidades, la muestra de anféresis es una muestra criopreservada. En algunas modalidades, la muestra de anféresis es una muestra fresca. En algunas modalidades, la célula inmunitaria se obtiene a partir de un sujeto humano.

[0064] Un aspecto de la presente descripción proporciona una población de células inmunitarias modificadas obtenidas por el método de cualquiera de las modalidades precedentes. En algunas modalidades, la composición comprende la célula inmunitaria modificada de cualquiera de las modalidades precedentes. En algunas modalidades, la composición comprende una población de células inmunitarias modificadas generadas por los métodos descritos en cualquiera de las modalidades precedentes y portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0065] Un aspecto de la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad o condición asociada con inmunidad mejorada en un sujeto que comprende administrar una cantidad efectiva de la composición descrita en cualquiera de las modalidades precedentes a un sujeto en necesidad del mismo. En algunas modalidades, la condición es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de piel, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de cerebro, linfoma, leucemia,

cáncer de pulmón, y cualquier combinación de los mismos. En algunas modalidades, el cáncer es un tumor sólido, o una neoplasia maligna hematológica. En algunas modalidades, un método para tratar un cáncer comprende administrar a un sujeto las células inmunitarias modificadas de cualquiera de las modalidades precedentes, la población de células T modificadas de cualquiera de las modalidades precedentes, o la composición de cualquiera de las modalidades precedentes.

[0066] Un aspecto de la presente descripción proporciona un método para estimular una respuesta inmune mediada por células T a una célula o tejido objetivo en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de una composición farmacéutica que comprende la célula inmunitaria modificada de cualquiera de las modalidades precedentes, la población de células inmunitarias modificadas de cualquiera de las modalidades precedentes, o la composición de cualquiera de las modalidades precedentes.

[0067] Un aspecto de la presente descripción proporciona un kit que comprende las células inmunitarias modificadas de cualquiera de las modalidades precedentes, la población de células T modificadas de cualquiera de las modalidades precedentes, o la composición de cualquiera de las modalidades precedentes, que comprende opcionalmente una instrucción para uso.

[0068] Tanto el resumen anterior

como la siguiente descripción de los dibujos y la descripción detallada son ejemplares y explicativos. Su objetivo es proporcionar más detalles de la descripción, pero no deben interpretarse como limitantes. Otros objetivos, ventajas y características novedosas resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada de la descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0069] La **Figura 1** muestra una representación esquemática del complejo CD3 del receptor de células T humanas (TCR), que comprende la cadena TCR alfa variable (TCR- α , TRAC), y cadena TCR beta (TCR- β , TRBC) acoplada a tres módulos diméricos CD3 δ /CD3 ϵ , CD3 γ /CD3 ϵ , y CD3 ζ /CD3 ζ . Los módulos CD3 δ /CD3 ϵ , y CD3 γ /CD3 ϵ son el objetivo de la presente descripción.

[0070] Las **Figuras 2A-2C** muestran barras que ilustran la eficiencia de interrupción de las cadenas TCR- α y TCR- β en células T humanas, como se mide por citometría de flujo después de la interrupción dirigida de genes CD3 δ (**FIG. 2A**), CD3 ϵ (**FIG. 2B**), y CD3 γ (**FIG. 2C**) usando un sistema CRISPR/Cas.

[0071] La **Figura 3** muestra una gráfica que ilustra la expansión de células CART alogeneicas generadas usando la estrategia de la Figura 1, e ilustra el número de duplicaciones de la población durante un periodo de diez días. Las células CART alogeneicas probadas son células

T diseñadas por ingeniería genética que comprenden inactivación de TRAC (TRAC KO), inactivación de CD3 δ (D1 KO), inactivación de CD3 γ (G4 KO), e inactivación de CD3 ϵ (E4 KO).

[0072] Las **Figuras 4A y 4B** muestran resultados de citometría de flujo que comparan la regulación negativa mediada por CRISPR de la inactivación de la cadena TCR- α (TRAC), inactivación de CD3 δ (D1 KO), inactivación de CD3 γ (G4 KO) e inactivación de CD3 ϵ (E4 KO). La **Figura 4A** muestra que la inactivación de CD3 ϵ (E4 KO) es un mejor objetivo para la inactivación del receptor de células T, como se mide por la expresión de superficie de la cadena TCR- α/β . La **Figura 4B** muestra que las células CART alogeneicas que comprenden inactivación de CD3 ϵ (E4 KO) tienen mayor eficiencia de transducción y fueron funcionalmente mejores que las células CART que comprenden, por ejemplo, inactivación de CD3 γ o CD3 δ ; se ilustra una modalidad de una célula PSMA CART.

[0073] La **Figura 5** muestra un gráfico que demuestra la capacidad de destrucción de tumores de células PSMA CART alogeneicas que comprenden la inactivación de la cadena TCR- α (TRAC), inactivación de CD3 δ (D1), inactivación de CD3 ϵ (E4) e inactivación de CD3 γ (G4); e ilustran que las células CART alogeneicas PSMA E4 tienen la mejor capacidad de destrucción. Las células objetivo fueron células PC3.

[0074] Las **Figuras 6A-6D** muestran

la actividad CRISPR-Cas ilustrada con el ensayo de detección de desemparejamiento de endonucleasa T7 (T7E1). La **Figura 6A** muestra una imagen de electroforesis en gel representativa de productos de PCR tratados con T7E1 amplificados a partir de los sitios de tres diferentes genes CRISPR-Cas C2TA (CIITA) usando tres diferentes ARNg. Las **Figuras 6B-6D** muestran electroferogramas generados por electroferograma Bioanalizador Agilent del ensayo de endonucleasa T7E1 demostrando la eficiencia de edición CRISPR-Cas.

[0075] Las **Figuras 7A-D** muestran electroferogramas de Bioanalizador Agilent y electroforesis de gel de PCR tratado con T7E1 y de control ilustrando resultados de eficiencia de edición CRISPR de C2TA (CIITA). En particular, la **Figura 7A** muestra los resultados totales para la muestra C2TA-1-PCR, La **Figura 7B** muestra los resultados totales para la muestra C2TA-1-T7E1, la **Figura 7C** muestra los resultados totales para la muestra C2TA-2-PCR, y la **Figura 7D** muestra los resultados totales para la muestra C2TA-2-T7E1.

[0076] La **Figura 8** muestra una gráfica que ilustra el resultado del ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR); y demostrando la viabilidad de células T de control (2^{do.} donante), células PSMA CART alogeneicas solas o en co-cultivo; e ilustrando que las células T de un 2^{do.} donante (irrelevante) no proliferan en respuesta a células PSMA CART alogeneicas en co-cultivo a pesar de la presencia

de un desemparejamiento de HLA. Las células CART alogeneicas comprenden un PSMA CAR y un ARNg TRAC/B2M/C2TA editado con CRISPR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. GENERALIDADES

[0077] El complejo del receptor de células T (TCR) es un gran complejo de múltiples subunidades comprendidas por al menos ocho subunidades polipeptídicas (TCR $\alpha\beta$, CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$, y CD3 $\zeta\zeta$). El heterodímero TCR $\alpha\beta$ es la subunidad de unión al ligando responsable de reconocer antígenos unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y clase II. CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ζ son organizados como dímeros para formar tres módulos diméricos CD3 δ /CD3 ϵ , CD3 γ /CD3 ϵ , y CD3 ζ /CD3 ζ que transducen la señal generada por el heterodímero TCR $\alpha\beta$. Hasta la fecha, la estrategia para evitar GvHD y/o HvHD ha sido la generación de células T alogeneicas que comprenden la regulación negativa de la cadena TCR α a través de la interrupción dirigida del locus del gen *TRAC*. Antes de la presente descripción, no se investigó el papel modulador de CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ y CD3 ζ en la promoción de GvHD y HvHD ya que se cree que la interrupción de CD3 α/β fue fundamental para la generación exitosa de células T alogeneicas. La presente descripción detalla un descubrimiento sorprendente que la interrupción dirigida de locis CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ζ genera célula CAR T alogeneicas que fueron tan eficientes y/o mejor que las

células CAR T que comprenden una interrupción dirigida del locus TRAC. En la presente descripción, se prefiere la interrupción de al menos uno de los genes CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ .

[0078] La presente invención incluye métodos y composiciones para generar una célula T modificada mediante inactivación negativa de una o más expresión del gen del complejo del receptor de células T endógenas y expresar ya sea un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor de células T diseñado por ingeniería genética (TCR), un receptor similar a inmunoglobulina de células Asesinas (KIR), un polipéptido de unión al antígeno, un ligando del receptor de la superficie celular, un antígeno tumoral, un receptor negativo dominante, un receptor de cambio, una quimiocina, un receptor de quimiocina, una citocina, o un receptor de citocina.

[0079] De este modo, la presente descripción se basa en la observación que células inmunitarias modificadas que comprenden al menos uno de un gen CD3 δ editado genéticamente, gen CD3 ϵ , gen CD3 ζ y/o gen CD3 γ de un complejo del receptor de células T, combinado con un receptor de antígeno quimérico (CAR), y/o un receptor de cambio, y/o un factor de mejoramiento inmune, son células T alogeneicas mejoradas con aptitud mejorada que demuestran una potente actividad citosólica contra varias líneas celulares cancerosas *in vitro*, así como también una importante erradicación de tumores *in vivo* en comparación con células T

alogeneicas estándares conocidas en la técnica.

[0080] La inmunoterapia adoptiva ofrece una promesa interesante para los pacientes con cáncer. Sin embargo, actualmente existen varios desafíos relacionados con la manufactura de células CAR-T y TCR. Estos desafíos impactan el éxito potencial de la inmunoterapia adoptiva.

[0081] A pesar de la aprobación y el éxito general de las inmunoterapias adoptivas autólogas, la escalabilidad y viabilidad de tales terapias presentan desafíos importantes. En particular, la aplicación clínica generalizada de la inmunoterapia adoptiva está limitada por las considerables limitaciones económicas impuestas por la preparación personalizada de células CART autólogas. Aún, una inmunoterapia adoptiva estandarizada en la que las células terapéuticas alogeneicas son pre-manufacturadas, se caracteriza en detalle y está disponible para su administración inmediata a una amplia gama de pacientes sigue siendo un procedimiento peligroso con muchas complicaciones posibles, tales como las respuestas de las células T alogeneicas. La respuesta de las células T alogeneicas se manifiesta clínicamente como enfermedad de injerto contra hospedero (GVHD) y/o enfermedad de hospedero contra injerto (HvGD, rechazo del injerto). La GvHD es causada por el ataque de los tejidos del receptor por células CAR-T alogeneicas infundidas mediadas por TCR aloreactivo en células CAR del donante. En particular, las cadenas endógenas del receptor de

células T alfa ($TCR\alpha$; TRAC) y beta ($TCR\beta$; TRBC) en células T infundidas reconocen antígenos de histocompatibilidad mayores y menores en el receptor, lo que conduce a (GvHD). Por el contrario, las células CART alogeneicas infundidas pueden ser rechazadas por los linfocitos T del receptor, lo que conduce a HvGD.

[0082] Antes de la presente descripción, un procedimiento para atender la respuesta de las células T alogeneicas fue diseñar por ingeniería genética células T alogeneicas usando técnicas de edición del genoma para abolir la expresión de $TCR\alpha$, $TCR\beta$ y/o uno o más complejos de Histocompatibilidad Mayor (MHC) de clase I (MHCI) y/o MHC clase II en células T alogeneicas de donantes. Debido a que el heterodímero $TCR\alpha\beta$ es necesario para el ensamblaje y la actividad de todo el complejo TCR, la inactivación de la expresión de ya sea las cadenas α o β de TCR previene que las células T CAR del donante reconozcan los aloantígenos del hospedero y, por lo tanto, la GVHD. Más aún, la edición del MHC I en las células T del donante previene por el contrario, el reconocimiento de estas células T alogeneicas por parte de las células T del receptor y, de este modo, el rechazo del injerto. Hasta la fecha, la supresión de la cadena α mediante el rompimiento dirigido del locus *TRAC* se ha utilizado como una estrategia para evitar la GVHD principalmente debido a que la cadena β está codificada por dos genes *TRBC* (*TRBC1* y *TRBC2*). Como tal, la inactivación del gen *TRBC* es

potencialmente más complicada.

[0083] Aún queda por establecer un protocolo óptimo para introducir Cas9/sgARN de manera eficiente en células T con una toxicidad mínima. Más aún, las técnicas actuales no dan como resultado la inactivación de TCR en el 100% de las células CART. Esto es importante ya que la generación exitosa de células alogeneicas útiles en la terapia CART se beneficiaría de una inactivación del 100% del TCR.

[0084] Para atender este problema, la presente descripción detalla la interrupción del gen CD3 ϵ , el gen CD3 γ , y/o el gen CD3 δ (véase **Figura 1**), tanto individualmente así como también combinados con al menos otro gen inactivado, como se detalla en la Tabla 1 a continuación. (El gen CD3 ζ también puede estar interrumpido). La descripción también abarca constructos y usos de los mismos donde al menos uno de CD3 ϵ , CD3 γ y/o CD3 δ (y opcionalmente el gen CD3 ζ) está interrumpido. La interrupción de al menos uno de CD3 ϵ , CD3 γ , y/o CD3 δ (y opcionalmente el gen CD3 ζ) también puede ser combinada con la interrupción de uno o más de CD3 α y CD3 β (por ejemplo, la inactivación del gen CD3 ϵ y el gen CD3 γ ; inactivación del gen CD3 ϵ y el gen CD3 α ; inactivación del gen CD3 γ y el gen CD3 δ , etc.). Véase por ejemplo, Ejemplo 2 y Tabla 1, la cual ilustra una nueva estrategia de CART alogeneico de la presente invención que involucra la inactivación (KO) de subunidades alternativas del receptor de

células T (CD3 δ , CD3 γ , y CD3 ϵ) y genes críticos adicionales en las trayectorias de procesamiento y presentación de antígeno.

Tabla 1

		receptor de Células T				HLA-I					HLA-II					
		TRAC	CD3δ	CD3ε	CD3γ	B2M	TAP1	TAP2	TAPBP	NLRC5	C2TA	HLA-DM	RFX5	RFXANK	RFXAP	Cadena li
receptor de Células T	TRAC	■				1					1					
	CD3δ		■													
	CD3ε			■												
	CD3γ				■											
HLA-I	B2M	1				■					1					
	TAP1						■									
	TAP2							■								
	TAPBP								■							
	NLRC5									■						
HLA-II	C2TA	1				1					■					
	HLA-DM											■				
	RFX5												■			
	RFXANK													■		
	RFXAP														■	
	Cadena li															■

[0085] Se encontró de manera sorprendente, que dos o tres (o más) interrupciones interfieren con la expresión del receptor de células T, y resultan de manera exitosa con la regulación negativa del TCR con una toxicidad mínima.

[0086] Además, las células T negativas a TRAC se mostraron por persistir más en tumores (Stadtmauer et. al., *Science*, 367(6481): eaba7365 (2020)), de

manera que fue sorprendente que el enfoque en la interrupción del gen CD3 ϵ , gen CD3 γ , gen CD3 ζ y/o gen CD3 δ también produce células T efectivas en inmunoterapia adoptiva (aunque como se indica en la presente descripción también abarca interrupción de uno o más de los genes CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 ζ y/o CD3 δ combinado con la interrupción de los genes CD3 α y/o CD3 β).

[0087] La presente descripción proporciona procedimientos novedosos y alternativos para modular las propiedades funcionales de las células T sintonizando y modulando alternativamente la señalización de TCR asociada con respuestas de células T alogeneicas. En particular, la presente descripción demuestra que la regulación negativa de al menos uno del gen CD3 ϵ , gen CD3 γ , gen CD3 ζ y/o CD3 δ , ya sea solo o en combinación con uno o más componentes del complejo TCR adicionales, reduce significativamente las respuestas de células T alogeneicas, mientras preserva las propiedades antitumorales benéficas de las células CART, generando de este modo células CART seguras y efectivas. Las ventajas de estos procedimientos novedosos y alternativos se describen con más detalle a continuación.

II. RESULTADOS EXPERIMENTALES

[0088] El porcentaje de la eficiencia de interrupción de las cadenas TCR- α y TCR- β en células T humanas se mide por citometría de flujo después de la interrupción dirigida de genes CD3 δ (**Figura 2A**), CD3 ϵ (**Figura 2B**), y CD3 γ (**Figura 2C**) usando un sistema CRISPR/Cas

(véase también Ejemplo 3 a continuación). La **Figura 2A** muestra los resultados después de la interrupción de CD3 δ usando cuatro diferentes ARNs guía: ARNg1, ARNg2, ARNg3, y ARNg4. La interrupción dirigida de CD3 δ usando los ARNs guía ARNg1 y ARNg3 en el sistema CRISPR/Cas resultó en 100% de eficiencia de KO de TCR α/β , mientras el uso de ARNg2 y ARNg4 en el sistema CRISPR/Cas resultó en más de aproximadamente 90% de eficiencia de KO de TCR α/β . De este modo, el uso de ARNg1 y ARNg3 es preferido en un sistema CRISPR/Cas para interrumpir a CD3 δ .

[0089] La **Figura 2B** muestra los resultados después de la interrupción dirigida de CD3 ϵ usando cinco diferentes ARNs guía: ARNg1, ARNg2, ARNg3, ARNg4, y ARNg5. La interrupción de CD3 ϵ usando los ARNs guía ARNg4 y ARNg5 en el sistema CRISPR/Cas resultó en 100% de eficiencia de KO de TCR α/β , mientras el uso de ARNg1 resultó en solamente aproximadamente un 50% de eficiencia de KO de TCR α/β , y finalmente el uso de ARNg2 y ARNg3 guía en el sistema CRISPR/Cas resultó en más de aproximadamente 90% de eficiencia de KO de TCR α/β . De este modo, el uso de los ARNs guía ARNg4 y ARNg5 es preferido en un sistema CRISPR/Cas para interrumpir a CD3 ϵ .

[0090] La **Figura 2C** muestra los resultados después de la interrupción dirigida de CD3 γ usando cinco diferentes ARNs guía: ARNg1, ARNg2, ARNg3, ARNg4, y ARNg5. La interrupción de CD3 ϵ usando los ARNs guía ARNg4 en

el sistema CRISPR/Cas resultó en 100% de eficiencia de KO de TCR α/β , mientras el uso de ARNg5 resultó en más de aproximadamente 95% de KO de eficiencia de TCR α/β , y finalmente el uso de los ARNs guía ARNg1, ARNg2 y ARNg3 en el sistema CRISPR/Cas resultó en eficiencia de KO menos favorable de TCR α/β . De este modo, el uso del ARN guía ARNg4 es preferido en un sistema CRISPR/Cas para interrumpir a CD3 γ .

[0091] En otro experimento con detalles proporcionados en el Ejemplo 4 a continuación, se evaluó la expansión de diferentes constructos de células CART alogeneicas durante un período de 10 días. Estos datos son importantes ya que si las células inmunitarias modificadas no se expanden, no se generará una cantidad suficiente de células para una terapia exitosa. Los diferentes constructos probados incluyen células CART alogeneicas que comprenden: (1) inactivación de TRAC (ALO (TRAC KO) en la **Figura 3**) (por ejemplo, la inactivación usada antes de la presente descripción), (2) inactivación de CD3 δ (ALO (D1 KO) en la **Figura 3**), (3) inactivación de CD3 γ (ALO (G4 KO) en la **Figura 3**), y (4) inactivación de CD3 ϵ (ALO (E4 KO) en la **Figura 3**). El porcentaje del doble de la población celular se muestra en el eje Y mientras el número de días se muestra en el eje X. Los resultados detallados en la **Figura 3** muestran que todas las células modificadas producen aproximadamente 4x veces el doble, o más, durante un periodo de tiempo de 9 días, de este modo demostrando que las células modificadas producen una

cantidad útil de material útil para inmunoterapia.

[0092] El Ejemplo 5 evaluó varios constructos de inactivación diferentes para evaluar la expresión de superficie de la cadena TCR- α/β . En particular, las **Figuras 4A y 4B** muestran resultados de citometría de flujo comparando la regulación negativa mediada por CRISPR de inactivación de la cadena TCR- α (TRAC) (por ejemplo, el constructo usado antes de la presente descripción), inactivación de CD3 δ (D1 KO), inactivación de CD3 γ (G4 KO), e inactivación de CD3 ϵ (E4 KO). La **Figura 4A** muestra que la inactivación de CD3 ϵ (E4 KO) fue un mejor objetivo para la inactivación del receptor de células T, como se mide por la expresión de superficie de la cadena TCR- α/β . La **Figura 4B** muestra que las células CART alogeneicas que comprenden inactivación de CD3 ϵ (E4 KO) tienen elevada eficiencia de transducción y fueron funcionalmente mejor que las células CART que comprenden, por ejemplo inactivación de CD3 γ o CD3 δ ; se ilustra una modalidad de células PSMA CART. Más aún, la Figura 4B muestra que la mayoría de las células CART fueron alogeneicas (negativas a CD3 y TCR), lo cual significa que los pacientes administrados con células CART de la presente invención serán infundidos con un número elevado de células CART alo.

[0093] En un experimento adicional detallado en el Ejemplo 6 a continuación, se evaluó la capacidad de destrucción de tumores de diferentes constructos

de células PSMA CART, como se muestra en la **Figura 5**. En particular, la **Figura 5** muestra una gráfica que demuestra la capacidad de destrucción tumoral de células PSMA CART alogeneicas que comprenden la inactivación de la cadena TCR- α (TRAC) (*por ejemplo*, el constructo usado antes de la presente descripción), inactivación de CD3 δ (D1), inactivación de CD3 ϵ (E4), e inactivación de CD3 γ (G4). Los resultados ilustran que las células CART alogeneicas PSMA E4 tienen la mejor capacidad de destrucción. Las células objetivo fueron células PC3, que es una línea celular de cáncer de próstata humano. Inesperadamente se descubrió que E4 fue más potente que D1 y G4. Las células Alo CART elaboradas dirigiéndose a la molécula CD3 ϵ fueron más potentes (*por ejemplo*, destruyen las células tumorales mucho más rápido) en comparación con las otras células alo CART evaluadas. La mayor potencia de las células CART con inactivación de CD3 ϵ (E4) significa que las células tumorales a las que se dirigen estas células CART se erradicarán mucho más rápido en comparación con las células CART con inactivación de la cadena TCR- α (TRAC), las células CART con inactivación de CD3 δ (D1) y/o o células CART con inactivación de CD3 γ (G4). Y el tiempo es esencial para que esta estrategia alo del gen tenga éxito en los pacientes.

[0094] El Ejemplo 7 describe la evaluación de la efectividad de la metodología CRISPR-Cas efectuando una inactivación del gen objetivo. En particular, las **Figuras 6A-6D** muestran la actividad de CRISPR-Cas

ilustrada con el ensayo de detección de desemparejamiento de endonucleasa T7 (T7E1). La **Figura 6A** muestra una imagen de electroforesis en gel representativa de productos de PCR tratados con T7E1 amplificados a partir de los sitios de tres diferentes genes CRISPR-Cas C2TA (CIITA) usando tres diferentes ARNg. Las **Figuras 6B-6D** muestran electroferogramas generados por electroferograma Bioanalizador Agilent del ensayo de endonucleasa T7E1 demostrando la eficiencia de edición CRISPR-Cas.

[0095] Además, las **Figuras 7A-D** muestran electroferogramas de Bioanalizador Agilent y electroforesis de gel de PCR tratado con T7E1 y de control ilustrando resultados de eficiencia de edición CRISPR de C2TA (CIITA). La **Figura 7A** muestra los resultados totales para la muestra C2TA-1-PCR, la **Figura 7B** muestra los resultados totales para la muestra C2TA-1-T7E1, la **Figura 7C** muestra los resultados totales para la muestra C2TA-2-PCR, y la **Figura 7D** muestra los resultados totales para la muestra C2TA-2-T7E1.

[0096] Finalmente, se condujo un ensayo de linfocitos mixtos (MLA). La **Figura 8** muestra una gráfica que ilustra el resultado del ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR) con células Alo solas, células T (2^{do}.donante; células T de un donante diferente) solas, células Alo en co-cultivo, y células T (2^{do}.donante) en co-cultivo. En particular, las células T del receptor (células T de un donante diferente) se co-cultivaron con células CART

alogeneicas durante 14 días y se analizó la proliferación de células T. Los resultados demuestran la viabilidad de las células T de control (2^{do} donante), células PSMA CART alogeneicas solas o en co-cultivo, y muestran que las células T “del receptor” no reaccionaron (no proliferaron) a la presencia de células alogeneicas. Por lo tanto, la Figura 8 muestra que las células T de un 2^{do} donante (irrelevante) no proliferaron en respuesta a células PSMA CART alogeneicas en co-cultivo debido a la presencia de un desemparejamiento de HLA. Las CART alo de los genes comprenden PSMA CART y ARNg TRAC/B2M/C2TA editados con CRISPR. Por consiguiente, las células CART alogeneicas de la presente invención tendrán una ventana de oportunidad para destruir células tumorales sin ser detectadas por el sistema inmunitario del receptor (es decir, células T).

III. CÉLULAS T ALOGENEICAS

A. Regulación negativa de Proteínas Inmunes Endógenas

[0097] Un aspecto de la presente descripción proporciona una célula inmunitaria modificada que comprende (1) una inserción y/o supresión en uno o más loci del gen que codifica cada uno una proteína inmune endógena; (2) un ácido nucleico exógeno que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor de células T diseñado por ingeniería genética (TCR), un receptor similar a inmunoglobulina de células Asesinas (KIR), un polipéptido de unión al antígeno, un ligando del receptor de la superficie

celular, o un antígeno tumoral. Por consiguiente, la célula modificada de la presente invención es genéticamente editada para interrumpir la expresión de cualquiera de los genes endógenos descritos en el presente documento. En algunas modalidades, una célula modificada que comprende un sistema de expresión TCR o CAR diseñado por ingeniería genética de la presente invención es genéticamente editado para interrumpir la expresión de uno o más de los genes endógenos descritos en el presente documento. En algunas modalidades, donde uno o más de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii), son interrumpidos, se produce una célula T alogeneica (es decir, célula inmunitaria universal). Como se usa en el presente documento, el término "célula inmunitaria universal", o "célula T universal" se refiere a una célula inmunitaria alogeneica o una célula T que es pre-modificada/pre-manufacturada para administración en cualquier paciente. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada de la presente invención es un producto de células T alogeneicas con respuesta reducida o suprimida de células T alogeneicas. En algunas modalidades, la regulación negativa de uno o más loci del gen de una proteína inmune endógena reduce y/o elimina la GvHD y/o HvHD.

[0098]

En algunas modalidades, la célula inmunitaria ejerce una respuesta inmune reducida en un sujeto cuando la célula inmunitaria modificada se administra

al sujeto, comparada con la respuesta inmune ejercida por una célula inmunitaria no modificada administrada al mismo sujeto. En algunas modalidades, la célula inmunitaria de la presente descripción ejerce una respuesta inmune reducida en un sujeto cuando la célula inmunitaria modificada se administra al sujeto, comparada con la respuesta inmune ejercida por una célula inmunitaria que comprende una inserción y/o supresión capaz de regular negativamente la expresión del gen de TRAC, TRBC, B2M, y CIITA. En algunas modalidades, la respuesta inmune es una respuesta de enfermedad de injerto contra hospedero (GvHD) o enfermedad hospedero contra injerto (HvHD; rechazo al injerto). En algunas modalidades, la respuesta de GvHD reducida es provocada contra una célula desemparejada HLA-I o contra una célula emparejada HLA-II. En algunas modalidades, la respuesta de GvHD es reducida por aproximadamente 10% o más, aproximadamente 20% o más, aproximadamente 30% o más, aproximadamente 40% o más, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 70% o más, aproximadamente 80% o más, aproximadamente 90% o más, o aproximadamente 95% o más. En algunas modalidades, la respuesta de GvHD es reducida por aproximadamente 1-veces o más, aproximadamente 2-veces o más, aproximadamente 3-veces o más, aproximadamente 4-veces o más, aproximadamente 5-veces o más, aproximadamente 6-veces o más, aproximadamente 7-veces o más, aproximadamente 8-veces o más, aproximadamente 9-veces o más, aproximadamente 10-veces o más,

aproximadamente 20-veces o más, aproximadamente 30-veces o más, aproximadamente 50-veces o más, aproximadamente 100-veces o más, aproximadamente 150-veces o más, o aproximadamente 200-veces o más. En algunas modalidades, la respuesta de GvHD reducida por la célula inmunitaria modificada es comparada con una célula inmunitaria equivalente sin la supresión y/o inserción en uno o más loci del gen, o una célula inmunitaria que comprende la supresión y/o inserción en TRAC, TCR β , B2M, y CIITA.

[0099] En algunas modalidades, la inserción y/o supresión en uno o más loci del gen es capaz de regular negativamente la expresión del gen de uno o más loci de proteínas inmunes endógenas. En algunas modalidades, la proteína inmune endógena es uno de los componentes del complejo TCR. En algunas modalidades, la proteína inmune endógena es una o más de CD3 ϵ CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ζ , que se organizan como heterodímeros y forman tres módulos diméricos CD3 δ /CD3 ϵ , CD3 γ /CD3 ϵ , y CD3 ζ /CD3 ζ que transducen una señal generada por el ligando que se une al heterodímero TCR $\alpha\beta$. En algunas modalidades, el ligando es un antígeno unido a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y clase II (MHC-I; MHC-II), que es reconocido por el heterodímero TCR $\alpha\beta$.

[0100] En algunas modalidades, la proteína inmune endógena es una molécula MHC clase I (MHC-I) y/o MHC clase II (MHC-II). En algunas modalidades, la

proteína inmune endógena es B2M (Beta-2-microglobulina), CIITA (transactivador clase II), TAP1 (transportador ABC asociado con el procesamiento de antígeno 1; Transportel, miembro de la subfamilia B del casete de unión a ATP), TAP2 (transportador ABC asociado con procesamiento de antígeno 2; Transporte2, miembro de la subfamilia B del casete de unión a ATP), TAPBP (proteína de unión a TAP; tapasina; proteína asociada a TAP), NLRC5 (dominio CARD de la familia NLR que contiene 5), HLA-DM, RFX5 (factor regulador X5), RFXANK (Proteína que contiene anquirina asociada al factor regulador X), RFXAP (Proteína asociada al factor regulador X) y cadena invariante (Cadena Ii).

[0101] Al igual que el TCR, el MHC-I y el MHC-II desempeñan funciones esenciales en la activación de respuestas inmunes adaptativas al presentar antígenos a los linfocitos T. Los seres humanos tienen tres loci principales de MHC-I (HLA-A, HLA-B y HLA-C), que son vitales para la detección y eliminación de virus, células cancerosas y células trasplantadas. Además, existen tres moléculas MHC-I no clásicas (HLA-E, HLA-F y HLA-G), que tienen funciones inmunorreguladoras. Las moléculas MHC-II humanas también comprenden tres loci (HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR). Cada uno de los MHC de clase I y II también comprende varias proteínas reguladoras. Las proteínas moduladoras del MHC-I incluyen Beta-2-microglobulina (B2M), moléculas de procesamiento de antígenos tales como TAP1, TAP2, TAPBP y un

regulador transcripcional, tal como NLRC5. Tap1, Tap2 y TAPBP son partes del complejo transportador TAP que es esencial para cargar antígenos peptídicos en los complejos HLA de clase I. La regulación negativa de la expresión de cualquiera de B2M, NLRC5, Tap1, Tap2, y TAPBP resulta en la expresión reducida de la superficie celular de la proteína MHC clase I y respuestas inmunes alteradas. En algunas modalidades, la proteína inmune endógena contemplada por la presente descripción es un gen MHC-I seleccionado a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, y una combinación de los mismos.

[0102] Las proteínas reguladoras del MHC-II incluyen los reguladores transcripcionales CIITA, RFX5, RFXANK, RFXAP; y proteínas chaperonas involucradas en la formación y transporte del péptido MHC clase II, cadena invariante (Cadena Ii) y antígeno leucocitario humano DM (HLA-DM; HLA-DMA), HLA-DOA y HLA-DOB. Los RFX5, RFXANK, RFXAP son subunidades de un complejo trimérico de unión al ADN RFX que se une específicamente a todos los promotores de genes MHC de clase II para regular sus transcripciones. La cadena invariante (Ii) funciona como una chaperona del MHC de clase II que previene la carga de péptidos en el ER, estimula la salida del ER y modula la carga de péptidos antigénicos. De manera similar a TAPBP, HLA-DM (por ejemplo, HLA-DMA) ayuda en la carga de péptidos de moléculas de MHC-II durante el tráfico intracelular. El HLA-DM elimina/previene la

presentación de péptidos de unión débil a las proteínas MHC-II guiando la respuesta de las células T a regiones "inmunodominantes" de antígenos. En algunas modalidades, el HLA-DM (por ejemplo, HLA-DMA), promueve la eliminación de células T potencialmente autoreactivas en el procesamiento de auto-proteínas. En algunas modalidades, la proteína inmune endógena contemplada por la presente descripción es un gen MHC-II seleccionado a partir del grupo que consiste de CIITA, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos.

[0103] Por lo tanto, la remoción eficiente de la barrera HLA para reducir HvHD o GvHD se puede realizar regulando negativamente uno o más de los siguientes: (1) dirigir los genes polimórficos MHC-I (HLA-A, -B, -C) y/o genes MHC-II (HLA-DP, -DQ, -DR); (2) dirigir moléculas que modulan el tráfico de todas las moléculas de MHC-I a la superficie celular, tal como B2M, o una molécula de procesamiento de antígenos de MHC-I, tal como TAP1, TAP2 o TAPBP; (3) dirigir moléculas que modulan el tráfico de moléculas de MHC-II, tales como la cadena invariante (Ii; o CD74)) o HLA-DM; y/o (4) dirigir reguladores transcripcionales de la expresión de MHC-I (NLRC5) o MHC-II (CIITA, RFX-5, RFXANK, RFX-AP).

[0104] En algunas modalidades, la proteína inmune endógena cuya expresión del gen es regulada negativamente por la inserción y/o supresión se selecciona a

partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii; CD74), o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, una célula inmunitaria modificada (es decir, una célula T) con la expresión del gen regulada negativamente de una proteína inmune endógena seleccionada a partir de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii; CD74), y una combinación de los mismos tiene inmunogenicidad reducida en un entorno alogeneico. En algunas modalidades, regular negativamente la expresión del gen de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii; CD74), o cualquier combinación de los mismos remueve la presentación de superficie de aloantígenos en la célula T que podría causar HvHD y/o GvHD y/o previene la expresión de la membrana del receptor de células T.

[0105] En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada usada para generar un producto de célula T alogeneica comprende una inactivación triple que comprende la regulación negativa de una subunidad del receptor de células T, una molécula HLA clase I; y una molécula HLA clase II. En algunas modalidades, la subunidad del receptor de células T se selecciona a partir de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ ; la molécula HLA clase I se selecciona a partir de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, o NLRC5; y la molécula HLA clase

II seleccionado a partir de HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena invariante (Cadena Ii). En algunas modalidades, el producto de células T alogeneicas comprende más de tres inactivaciones de proteína inmune endógena. En tal modalidad, la subunidad del receptor de células T se selecciona a partir de CD3 δ , CD3 ϵ , y/o CD3 γ ; la molécula HLA clase I se selecciona a partir de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, y/o NLRC5; y la molécula HLA clase II se selecciona a partir de HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y/o cadena invariante (Cadena Ii). En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada para generar un producto de células T alogeneicas comprende una o más inactivaciones de proteína inmune endógena que comprende la regulación negativa de al menos dos subunidades del receptor de células T, al menos dos moléculas HLA clase I; y al menos dos moléculas HLA clase II. En algunas modalidades, la subunidad del receptor de células T se selecciona a partir de al menos dos de CD3 δ , CD3 ϵ , y CD3 γ ; la molécula HLA clase I se selecciona a partir de al menos dos de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, y NLRC5; y la molécula HLA clase II se selecciona a partir de al menos dos HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii).

[0106]

En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada comprende una inserción y/o supresión que regula negativamente la expresión del gen CD3 δ y la expresión del gen de una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP,

NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada comprende una inserción y/o supresión que regula negativamente una expresión del gen CD3ε y la expresión del gen de una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada comprende una inserción y/o supresión que regula negativamente una expresión del gen CD3γ y la expresión del gen de una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos.

[0107] En algunas modalidades, cuando la expresión del gen de CD3δ, CD3ε, y/o CD3γ es regulada negativamente, la expresión de superficie del receptor alfa y beta de las células T es regulada negativamente por al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 99%, o al menos aproximadamente 100%. En algunas modalidades, la regulación negativa de CD3ε genera una eficiencia mayor de inactivación del receptor de células T cuando se compara con la regulación negativa de CD3γ, y/o CD3δ. En algunas modalidades, la

eficiencia de inactivación del receptor de células T inducida por la regulación negativa de CD3 ϵ es mayor o igual a la regulación negativa de TRAC.

[0108] En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada usada para generar un producto de célula T alogeneica comprende una inactivación triple. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada comprende la expresión reducida o eliminada del gen de (1) CD3 ϵ , B2M, y CIITA; (2) CD3 ϵ , B2M, y RFX5; (3) CD3 ϵ , B2M, y RFXAP; (4) CD3 ϵ , B2M, y RFXANK; (5) CD3 ϵ , B2M, y HLA-DM; (6) CD3 ϵ , B2M, y cadena Ii; (7) CD3 ϵ , TAP1, y CIITA; (8) CD3 ϵ , TAP1, y RFX5; (9) CD3 ϵ , TAP1, y RFXAP; (10) CD3 ϵ , TAP1, y RFXANK; (11) CD3 ϵ , TAP1, y HLA-DM; (12) CD3 ϵ , TAP1, y cadena Ii; (13) CD3 ϵ , TAP2, y CIITA; (14) CD3 ϵ , TAP2, y RFX5; (15) CD3 ϵ , TAP2, y RFXAP; (16) CD3 ϵ , TAP2, y RFXANK; (17) CD3 ϵ , TAP2, y HLA-DM; (18) CD3 ϵ , TAP2, y cadena Ii; (19) CD3 ϵ , NLRC5, y CIITA; (20) CD3 ϵ , NLRC5, y RFX5; (21) CD3 ϵ , NLRC5, y RFXAP; (22) CD3 ϵ , NLRC5, y RFXANK; (23) CD3 ϵ , NLRC5, y HLA-DM; (24) CD3 ϵ , NLRC5, y cadena Ii; (25) CD3 ϵ , TAPBP, y CIITA; (26) CD3 ϵ , TAPBP, y RFX5; (27) CD3 ϵ , TAPBP, y RFXAP; (28) CD3 ϵ , TAPBP, y RFXANK; (29) CD3 ϵ , TAPBP, y HLA-DM; o (30) CD3 ϵ , TAPBP, y cadena Ii.

[0109] En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada comprende la expresión reducida o eliminada del gen de: (1) CD3 δ , B2M, y CIITA; (2) CD3 δ , B2M, y RFX5; (3) CD3 δ , B2M, y RFXAP; (4) CD3 δ , B2M, y RFXANK; (5)

CD3δ, B2M, y HLA-DM; (6) CD3δ, B2M, y cadena Ii; (7) CD3δ, TAP1, y CIITA; (8) CD3δ, TAP1, y RFX5; (9) CD3δ, TAP1, y RFXAP; (10) CD3δ, TAP1, y RFXANK; (11) CD3δ, TAP1, y HLA-DM; (12) CD3δ, TAP1, y cadena Ii; (13) CD3δ, TAP2, y CIITA; (14) CD3δ, TAP2, y RFX5; (15) CD3δ, TAP2, y RFXAP; (16) CD3δ, TAP2, y RFXANK; (17) CD3δ, TAP2, y HLA-DM; (18) CD3δ, TAP2, y cadena Ii; (19) CD3δ, NLRC5, y CIITA; (20) CD3δ, NLRC5, y RFX5; (21) CD3δ, NLRC5, y RFXAP; (22) CD3δ, NLRC5, y RFXANK; (23) CD3δ, NLRC5, y HLA-DM; (24) CD3δ, NLRC5, y cadena Ii; (25) CD3δ, TAPBP, y CIITA; (26) CD3δ, TAPBP, y RFX5; (27) CD3δ, TAPBP, y RFXAP; (28) CD3δ, TAPBP, y RFXANK; (29) CD3δ, TAPBP, y HLA-DM; o (30) CD3δ, TAPBP, y cadena Ii.

[0110] En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada comprende la expresión reducida o eliminada del gen de: (1) CD3γ, B2M, y CIITA; (2) CD3γ, B2M, y RFX5; (3) CD3γ, B2M, y RFXAP; (4) CD3γ, B2M, y RFXANK; (5) CD3γ, B2M, y HLA-DM; (6) CD3γ, B2M, y cadena Ii; (7) CD3γ, TAP1, y CIITA; (8) CD3γ, TAP1, y RFX5; (9) CD3γ, TAP1, y RFXAP; (10) CD3γ, TAP1, y RFXANK; (11) CD3γ, TAP1, y HLA-DM; (12) CD3γ, TAP1, y cadena Ii; (13) CD3γ, TAP2, y CIITA; (14) CD3γ, TAP2, y RFX5; (15) CD3γ, TAP2, y RFXAP; (16) CD3γ, TAP2, y RFXANK; (17) CD3γ, TAP2, y HLA-DM; (18) CD3γ, TAP2, y cadena Ii; (19) CD3γ, NLRC5, y CIITA; (20) CD3γ, NLRC5, y RFX5; (21) CD3γ, NLRC5, y RFXAP; (22) CD3γ, NLRC5, y RFXANK; (23) CD3γ, NLRC5, y HLA-DM; (24) CD3γ, NLRC5, y cadena Ii; (25) CD3γ, TAPBP, y CIITA; (26) CD3γ, TAPBP, y RFX5; (27)

CD3 γ , TAPBP, y RFXAP; (28) CD3 γ , TAPBP, y RFXANK; (29) CD3 γ , TAPBP, y HLA-DM; o (30) CD3 γ , TAPBP, y cadena Ii

[0111] En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada de la presente descripción es una célula T, una célula asesina natural (célula NK), una célula T asesina natural (NKT), una célula progenitora linfoide, una célula troncal hematopoyética, una célula troncal, un macrófago, o una célula dendrítica. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada es una célula inmunitaria no estimulada modificada o célula precursora de la misma. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada es una célula T no estimulada modificada, una célula NK no estimulada modificada, o una célula T NK no estimulada modificada. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada es una célula T CD4+ o célula T CD8+. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada es una célula T alogeneica o célula T humana autóloga. En alguna modalidad, la célula inmunitaria modificada es una célula humana, o célula de mamífero.

B. Células Inmunitarias Modificadas

[0112] Un aspecto de la presente descripción proporciona una célula T modificada aislada que comprende al menos un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). Como se usa

en el presente documento, el término "polipéptido funcionalmente alterado" significa que el polipéptido es mutado (*por ejemplo*, comprende una supresión, una inserción, o es una variante truncada), de manera que no puede unirse fácilmente a otros componentes del complejo TCR, o que no se incorpora en el complejo TRC. En algunas modalidades, un polipéptido alterado funcional resulta en un TCR funcionalmente alterado o suprime la expresión de un TCR funcional sobre la superficie celular. En algunas modalidades, el polipéptido alterado puede ser un polipéptido negativo dominante que inhibe sustancialmente la actividad de un complejo TCR. Una célula T modificada que comprende el polipéptido funcionalmente alterado mencionado es una célula T deficiente de TCR que no produce un TCR funcional, o expresa muy poco TCR funcional en la superficie celular. En algunas modalidades, el polipéptido alterado es un componente del complejo de señalización de TCR. En algunas modalidades, el polipéptido alterado modula la formación de un TCR funcional. En algunas modalidades, un polipéptido alterado comprende una mutación que afecta la función o expresión de una proteína funcional. En algunas modalidades, la mutación es una supresión, una inserción, una sustitución o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, un polipéptido alterado es causado por la expresión de un producto de gen defectivo, o ausencia de expresión de un gen o producto de gen deseado.

del TCR requiere la proporción estequiométrica apropiada de las proteínas que componen el complejo TCR. Como se muestra en la **Figura 1**, el complejo TCR comprende la cadena TCR-alfa variable (TCR- α , TRAC), y cadena TCR-beta (TCR- β , TRBC), las cuales están acopladas a tres módulos diméricos CD3 δ /CD3 ϵ , CD3 γ /CD3 ϵ , y CD3 ζ /CD3 ζ . Los tres módulos diméricos son una parte integral de la señalización TCR. Cada receptor CD3 comprende porciones de señalización que propagan y amplifican la activación del receptor TCR después de la interacción del heterodímero TCR- α/β con un ligando peptídico MHC después de la unión del ligando a TCR $\alpha\beta$, las subunidades CD3 sufren cambios conformacionales y las porciones de señalización (por ejemplo, ITAM) dentro de las colas citoplasmáticas de CD3 se fosforilan por las proteínas tirosina cinasas intracelulares. Posteriormente, el dominio SH2 que contiene la señalización intracelular y moléculas adaptadoras se reclutan en la membrana plasmática, donde amplifican la señal de activación de TCR al interactuar directamente con las porciones de señalización de CD3. Por lo tanto, mientras que el heterodímero TCR $\alpha\beta$ es responsable de la unión del antígeno, las subunidades CD3 sirven como elementos transductores de señales. Como tal, si uno de los receptores CD3 necesarios falta o está deteriorado, el complejo TCR se desestabiliza funcionalmente o al menos la función de señalización del TCR se debilita. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se

requiere la expresión coordinada de las seis proteínas para la expresión de superficie del complejo y/o función de TCR.

[0114] Cada componente del complejo TCR es necesario para el ensamble del complejo TCR en la superficie celular. La pérdida de un componente del complejo TCR puede resultar en la pérdida de la expresión de TCR en la superficie celular. En algunas modalidades, la pérdida de un componente puede no abolir la expresión de superficie del complejo TCR. En tales modalidades, aunque parte o incluso toda la expresión de TCR puede permanecer, es la función del receptor de TCR la que determina si el receptor de TCR induce una respuesta inmune. La presente invención contempla la deficiencia funcional, en lugar de la ausencia de un complejo TCR completo en la superficie celular. Sin querer limitarse a ninguna teoría, cuanto menor es la expresión de TCR, es menos probable que se produzca una reticulación de TCR suficiente para conducir a la activación de células T a través del complejo de TCR.

[0115] En algunas modalidades, la célula T modificada aislada comprende dos o más polipéptidos funcionalmente alterados. En tales modalidades, un polipéptido alterado puede ser una cadena α del receptor de células T (TRAC). El complejo TCR se retendrá dentro de la célula y no se trasladará a la membrana plasmática en ausencia de TRAC. Sin embargo, el receptor TCR que carece de TRAC será inestable y puede degradarse rápidamente. En

algunas modalidades, la célula T modificada comprende tres o más polipéptidos funcionalmente alterados seleccionados a partir de TRAC, TRBC, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o la cadena invariante (Ii). En algunas modalidades, la célula T modificada comprende dos polipéptidos funcionalmente alterados seleccionados a partir de CD3 α , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii. En algunas modalidades, la célula T modificada comprende tres polipéptidos funcionalmente alterados seleccionados a partir de CD3 α , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii. En algunas modalidades, la célula T modificada comprende un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , y CD3 γ , y al menos un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir de TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii. En algunas modalidades, la célula T modificada comprende al menos un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , y CD3 γ , y al menos un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir de TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii.

[0116]

En algunas modalidades, la célula T modificada comprende (a) al menos uno de un CD3 δ

funcionalmente alterado, CD3 ϵ , y/o CD3 γ y (b) al menos un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir de TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii. En algunas modalidades, la célula T modificada comprende dos o más polipéptidos funcionalmente alterados seleccionados a partir de TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii.

[0117] En algunas modalidades, el polipéptido alterado funcional reduce la expresión de la proteína. En tal modalidad, la célula T modificada tiene una expresión reducida de TRAC, TRBC, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena Ii, o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, el polipéptido alterado funcional está ausente de la expresión del gen codificado. En tal modalidad, la célula T modificada no expresa CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena Ii, o cualquier combinación de las mismas.

[0118] En algunas modalidades, la célula T modificada comprende la expresión reducida y/o carece de expresión de un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , TRAC, TRBC, B2M, C2TA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, la cadena Ii comprende además un polipéptido funcionalmente alterado seleccionado a partir de TRAC, TRBC, B2M, y C2TA. En

tal modalidad, la célula T modificada tiene una expresión reducida de TRAC, TRBC, B2M, o C2TA y/o no expresa TRAC, TRBC, B2M, o C2TA.

[0119] En algunas modalidades, la modificación de CD3 δ , CD3 ϵ , y/o CD3 γ conduce a una función del complejo del receptor TCR/CD3 alterado. En algunas modalidades, el polipéptido funcionalmente alterado contemplado por la presente invención es generado usando una tecnología de edición de gen. En algunas modalidades, la edición del gen seleccionada a partir del grupo que consiste de un sistema de endonucleasa asociado a CRISPR (Cas) (CRISPR-Cas), un sistema de edición de gen TALEN, un sistema de edición de gen de nucleasa dedo de zinc (ZFN), un sistema de edición de gen de meganucleasa, o un sistema de edición de gen mega-TALEN, ARN antisentido, ARN antigómero, ARNi, ARNsi, y ARNsh. En algunas modalidades, CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ es modificado dirigiendo uno o más exones de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ , opcionalmente el exón 1 de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ .

[0120] Puede determinarse si una célula T expresa un TCR funcional utilizando métodos de ensayo conocidos como los que se conocen en la técnica o se describen en el presente documento. En algunas modalidades, la expresión de TCR $\alpha\beta$ y CD3 se puede evaluar mediante citometría de flujo y PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR). La expresión de ARNm de TCR- α , TCR- β , CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , y CD3- ζ puede ser analizada por QRT-PCR usando un instrumento

de PCR en tiempo real ABI7300 y cebadores TAQMAN® específicos del gen usando métodos similares a aquellos usados en Sentman et al., *J. Immunol.* 173:6760-6766 (2004). Los cambios en la expresión de la superficie celular se pueden determinar usando anticuerpos específicos para TCR- α , TCR- β , CD3 ϵ , CD8, CD4, CD5, y CD45. Para probar la expresión de TCR/CD3 usando citometría de flujo, se utilizan anticuerpos etiquetados con fluorocromo contra subunidades específicas del complejo TCR. En algunas modalidades, las células vivas se tiñen con, por ejemplo, anticuerpos contra CD5, CD8 y CD4, en combinación con un anticuerpo contra CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , TCR α , TCR β , TCR γ , o TCR δ . Si se utiliza la expresión de ya sea los genes CD3 o TCR, la expresión tanto de las proteínas TCR como de las proteínas CD3 debería reducirse severamente en la célula T modificada en comparación con una célula T no modificada o una célula T que expresa un vector de control. Los anticuerpos de control de isotipo se utilizan para controlar la fluorescencia de fondo.

[0121] Para determinar si la expresión de un polipéptido funcionalmente alterado en la célula T modificada es suficiente para alterar la función de TCR y/o la función de la célula T modificada, la célula T modificada es probada para: (1) supervivencia celular *in vitro*; (2) proliferación en la presencia de PBMCs alogeneicas tratadas con mitomicina C; y/o (3) producción de citosina en respuesta a PBMCs alogeneicas, mAbs anti-CD3, o mAbs anti-TCR.

[0122] Para evaluar la deficiencia funcional del complejo TCR, se puede determinar la falta de producción de citocinas efectoras clave que impulsan la expansión de las células T. Por ejemplo, se puede usar el efecto de una estimulación anti-CD3 sobre células T modificadas para determinar la producción de interleucina-2 (IL-2) y/o interferón (IFN)-gamma.

[0123] En algunas modalidades, la célula T modificada que comprende el polipéptido funcionalmente alterado exhibe expresión reducida del receptor de células T comparada con una célula T no modificada. En algunas modalidades, la célula T modificada que comprende el polipéptido funcionalmente alterado exhibe expresión reducida del polipéptido alterado. En algunas modalidades, la célula T modificada que comprende el polipéptido funcionalmente alterado exhibe ausencia completa de la expresión de superficie del complejo del receptor de células T. En algunas modalidades, la célula T modificada que comprende el polipéptido funcionalmente alterado exhibe reticulación reducida o insuficiente del receptor de células T. En algunas modalidades, la célula T modificada expresa alguna, o todas las subunidades TCR funcionales puede ser sobre la superficie celular. Sin TCR funcionales en su superficie, la célula T modificada falla para ser completamente activada. Como tal, la célula T modificada contemplada por la presente invención no puede montar una

reacción indeseable cuando se introduce en un hospedero. Como un resultado, la célula T modificada falla para causar la GvHD o HvHD debido a que la célula T modificada no puede transducir una señal a partir de las moléculas MHC hospederas.

[0124] En algunas modalidades, la célula T modificada ejerce una respuesta inmune reducida en un sujeto cuando la célula T modificada se administra al sujeto, comparada con la respuesta inmune ejercida por una célula T no modificada administrada al mismo sujeto. La célula T modificada de la presente invención puede ser usada en todas las aplicaciones de terapias de células T. En algunas modalidades, la célula T modificada se usa en cualquiera de los métodos o composiciones donde es deseable la terapia de células T. En algunas modalidades, la célula T modificada de la presente invención puede ser usada para reducir o aliviar, o prevenir o tratar el cáncer, GVHD, rechazo al trasplante, infección, uno o más trastornos autoinmunes, enfermedad por radiación, u otras enfermedades o condiciones.

IV. SISTEMAS DE EDICIÓN DE GEN

A. CRISPR

[0125] En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada de la presente descripción es una célula inmunitaria modificada editada del gen. En algunas modalidades, la inserción y/o supresión en uno o más loci del gen que codifica cada una una proteína inmune endógena de la

presente descripción es el resultado de una edición de gen. En ciertas modalidades, el gen que codifica a CD3δ, CD3ε, CD3γ, TRAC, B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii es modificado por un sistema de edición de gen. En algunos casos, el sistema de edición de gen comprende una nucleasa guiada por ARN tal como un sistema Cas de ácido nucleico palindrómico corto agrupado regularmente interespaciado (CRISPR). El sistema CRISPR (también referido en el presente documento como el sistema CRISPR-Cas, sistema Cas, o sistema CRISPR/Cas) comprende una endonucleasa Cas y una secuencia de ácido nucleico guía específica para un gen objetivo el cual después de la introducción en una célula forma un complejo que permite a la endonucleasa Cas introducir un rompimiento (*por ejemplo*, un rompimiento de doble hebra) en el gen objetivo. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada es editada usando CRISPR/Cas9 para interrumpir una o más proteínas inmunes endógenas.

[0126] En algunas modalidades, el sistema CRISPR-Cas es usado para interrumpir uno o más de CD3δ, CD3ε, CD3γ, TRAC, B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii endógenos, de este modo resultando en la regulación negativa de la expresión del gen de CD3δ, CD3ε, CD3γ, TRAC, B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii. En algunas modalidades, la inserción y/o supresión capaz de regular

negativamente la expresión del gen de una o más proteínas inmunes endógenas regula negativamente la expresión de una o más proteínas endógenas seleccionadas a partir del grupo que consiste de CD3δ, CD3ε, CD3γ, TRAC, B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena Ii. En algunas modalidades, cada una de la inserción y/o supresión capaz de regular negativamente la expresión del gen comprende un sistema relacionado a CRISPR. En algunas modalidades, el sistema relacionado a CRISPR es una endonucleasa Cas asociada a CRISPR y un ARN de guía.

[0127] En algunas modalidades, la endonucleasa Cas comprende una endonucleasa Cas9. En algunos casos, la endonucleasa Cas9 se deriva de o se basa en, por ejemplo, una molécula Cas9 de *S. pyogenes* (por ejemplo, SpCas9), *S. thermophiles*, *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, SaCas9), o *Neisseria meningitides*. En algunos casos, la endonucleasa Cas9 se deriva de o se basa en, por ejemplo, una molécula Cas9 de *Acidovorax avenae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces* sp., *cycliphilus denitrificans*, *Aminomonas paucivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides* sp., *Blastopirellula marina*, *Bradyrhizobium* sp., *Brevibacillus latensporus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lad*, *Candidatus Puniceispirillum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium*

diphtheria, *Corynebacterium matruchotii*, *Dinoroseobacter sliibae*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium dolichum*, *gamma proteobacterium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus sputorum*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*, *Ilyobacter polytropus*, *Kingella kingae*, *Lactobacillus crispatus*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeriaceae bacterium*, *Methylocystis* sp., *Methylosinus trichosporium*, *Mobiluncus mulieris*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria* sp., *Neisseria wadsworthii*, *Nitrosomonas* sp., *Parvibaculum lavamentivorans*, *Pasteurella multocida*, *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Ralstonia syzygii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodovulum* sp., *Simonsiella muelleri*, *Sphingomonas* sp., *Sporolactobacillus vineae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus* sp., *Subdoligranulum* sp., *Tislrella mobilis*, *Treponema* sp., o *Verminephrobacter eiseniae*.

[0128] En algunas modalidades, la endonucleasa Cas9 se deriva a partir de una molécula Cas9 de: *S. pyogenes* (por ejemplo, cepa SF370, MGAS 10270, MGAS 10750, MGAS2096, MGAS315, MGAS5005, MGAS6180, MGAS9429, NZ131 y SSI-1), *S. thermophilus* (por ejemplo, cepa LMD-9), *S. pseudoporcinus* (por ejemplo, cepa SPIN 20026), *S. mutans* (por ejemplo, cepa UA 159, NN2025), *S. macacae* (por ejemplo, cepa NCTC1 1558), *S. gallolyticus* (por ejemplo, cepa UCN34, ATCC

BAA-2069), *S. equines* (por ejemplo, cepa ATCC 9812, MGCS 124), *S. dysdalactiae* (por ejemplo, cepa GGS 124), *S. bovis* (por ejemplo, cepa ATCC 700338), *S. cmginosus* (por ejemplo; cepa F021 1), *S. agalactia* (por ejemplo, cepa NEM316, A909), *Listeria monocytogenes* (por ejemplo, cepa F6854), *Listeria innocua* (*L. innocua*, por ejemplo, cepa Clip 11262), *Enterococcus italicus* (por ejemplo, cepa DSM 15952), o *Enterococcus faecium* (por ejemplo, cepa 1,23,408).

[0129] En algunos casos, la endonucleasa comprende Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, *S. pyogenes* Cas9, *Staphylococcus aureus* Cas9, nucleasa MAD7 (una nucleasa CRISPR tipo V), o cualquier combinación de las mismas.

B. ARNs Guía

[0130] En algunas modalidades, el ácido nucleico guía es una molécula de ARN de guía (ARNg), que dirige el complejo Cas-ARN a una secuencia objetivo. En algunos casos, la dirección se realiza mediante la hibridación de una porción del ARNg con el ADN (por ejemplo, a través del dominio de direccionamiento del ARNg) y mediante la unión de una porción de la molécula de ARNg a la nucleasa guiada por ARN u otra molécula efectora (por ejemplo, a través de al menos el ARNg tracr). En algunas modalidades, una molécula de ARNg consiste de una única molécula de

polinucleótido contigua, denominada en el presente documento "ARN guía único" ("ARNsg"). En otras modalidades, una molécula de ARNg consiste de una pluralidad, en general dos, moléculas de polinucleótidos, que en sí mismas son capaces de asociarse, en general a través de hibridación, denominada en el presente documento "ARN guía dual" ("ARNdg").

[0131] En algunos casos, la molécula de ARNg comprende un ARNcr y un tracr, que pueden estar opcionalmente en un único polinucleótido o en polinucleótidos separados. En algunos casos, el ARNcr comprende un dominio objetivo y una región que interactúa con un tracr para formar una región de mástil. El tracr comprende la porción de la molécula de ARNg que se une a una nucleasa u otra molécula efectora. En algunas modalidades, el tracr comprende una secuencia de ácido nucleico que se une específicamente a una endonucleasa Cas (*por ejemplo*, Cas9). En algunas modalidades, el tracr comprende una secuencia de ácido nucleico que forma parte del mástil. En algunas modalidades, el dominio objetivo es la porción de la molécula de ARNg que reconoce, *por ejemplo*, es complementaria a, una secuencia protoespaciadora dentro del ADN objetivo.

[0132] Una porción adyacente al protoespaciador (PAM) es una secuencia de ADN de 2-6 pares de bases ubicada adyacente al 3' terminal del protoespaciador y reconocida por la endonucleasa Cas. En algunos casos, cada endonucleasa Cas reconoce una secuencia PAM específica. Las

secuencias PAM ejemplares incluyen la secuencia NGG reconocida por la endonucleasa Cas9 de *S. pyogenes*; o secuencia NGGNG o NNAGAAW reconocida por la endonucleasa Cas9 de *S. thermophilus*, donde N es cualquier nucleótido. Un experto en la técnica entendería cómo diseñar una molécula de ARNg basada en la endonucleasa Cas específica utilizada junto con la secuencia PAM en la que reconocería la endonucleasa Cas.

[0133] En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es suficientemente complementaria con una secuencia objetivo del locus de proteína inmune endógena seleccionado a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro de uno o más loci de gen que codifica cada proteína inmune seleccionada a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). En algunas modalidades, el ARN de guía es complementario con una secuencia dentro de uno o más exones de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ . En algunas modalidades, el ARN de guía es complementario con una secuencia dentro del exón 1 de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ . En algunas modalidades, la secuencia nucleica de ARNg de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP,

NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena invariante (Cadena Ii) tiene la secuencia de ácido nucleico descrita en la Tabla 4.

[0134] En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen CD3δ y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 53. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen CD3ε y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico que es expuesta en la SEQ ID NO: 52. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen CD3γ y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 54. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen B2M y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 55. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen CIITA (C2TA) y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 61. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen TAP1 y el ARN de

guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 56. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen TAP2 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 57. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen TAPBP y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, o cualquier combinación de las mismas. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen NLRC5 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 60. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen HLA-DM y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 62. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen RFX5 y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen RFXANK y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la

SEQ ID NO: 65. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen RFXAP y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 66. En algunas modalidades, el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro del locus del gen de Cadena Ii y el ARN de guía comprende una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, o cualquier combinación de las mismas.

[0135] En algunas modalidades, uno o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más ácidos nucleicos guía (por ejemplo, moléculas de ARN guía) son transfectados en una célula inmunitaria con una endonucleasa Cas. En algunos casos, aproximadamente uno, dos, o tres ácidos nucleicos guía (por ejemplo, moléculas de ARN guía) son transfectados en una célula inmunitaria con una endonucleasa Cas. En algunos casos, aproximadamente tres ácidos nucleicos guía (por ejemplo, moléculas de ARN guía) son transfectados en una célula inmunitaria con una endonucleasa Cas. En algunos casos, aproximadamente dos ácidos nucleicos guía (*por ejemplo*, moléculas de ARN guía) son transfectados en una célula inmunitaria con una endonucleasa Cas. En algunos casos, aproximadamente un ácido nucleico guía (*por ejemplo*, molécula de ARN guía) es transfectado en una célula inmunitaria con una endonucleasa Cas.

[0136]

En alguna modalidad, un vector impulsa la expresión del sistema CRISPR. La técnica está repleta de vectores adecuados que son útiles en la presente invención. Los vectores que serán utilizados son adecuados para la replicación y, opcionalmente, la integración en células eucariotas. Los vectores típicos contienen terminadores de la transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada. Los vectores de la presente invención también pueden usarse para protocolos de administración de genes estándares de ácidos nucleicos. Los métodos para la administración de genes se conocen en la técnica. Además, el vector puede proporcionarse a una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., 4ta. Edición, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2012; y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, pero no se limitan a, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del herpes, virus Sindbis, retrovirus gamma y lentivirus. Sin desear limitarse a ninguna teoría, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables. En algunas modalidades, el sistema

CRISPR/Cas comprende un vector de expresión. En algunas modalidades, el sistema CRISPR/Cas comprende el vector pAd5/F35-CRISPR.

C. TALEN

[0137] En algunas modalidades, el sistema de edición de gen es un sistema de edición de gen TALEN. Los TALEN se producen artificialmente mediante la fusión de un dominio de unión al ADN efector TAL con un dominio de escisión del ADN. Los efectos similares a los activadores de la transcripción (TALE) se pueden diseñar por ingeniería genética para unirse a un ADN objetivo. Combinando un TALE diseñado por ingeniería genética con un dominio de escisión de ADN, se puede producir una enzima de restricción que sea específica de cualquier secuencia de ADN objetivo.

[0138] Los TALE son proteínas secretadas por la bacteria *Xanthomonas*. El dominio de unión al ADN contiene una secuencia repetida y altamente conservada de 33-34 aminoácidos, con la excepción de los aminoácidos 12 y 13. Estas dos posiciones son muy variables y muestran una fuerte correlación con el reconocimiento de nucleótidos específicos y, por lo tanto, pueden diseñarse por ingeniería genética para unirse a una secuencia de ADN objetivo.

[0139] Para producir un TALEN, se fusiona una proteína TALE a una nucleasa (N) que comprende, por ejemplo, una endonucleasa FokI de tipo silvestre o mutada. El dominio FokI funciona como un dímero, lo que requiere dos

constructos con dominios de unión al ADN únicos para los sitios del genoma objetivo con la orientación y el espaciado adecuados. La especificidad y el efecto fuera del objetivo se pueden modular cambiando el número de residuos de aminoácidos entre el dominio de unión al ADN de TALE y el dominio de escisión de FokI y el número de bases entre los dos sitios de unión de TALEN individuales.

D. Nucleasa Dedo de Zinc

[0140] En algunas modalidades, el sistema de edición de gen es un sistema de edición de gen de nucleasa dedo de zinc (ZFN). La nucleasa dedo de zinc es una nucleasa artificial que puede usarse para modificar uno o más sitios de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico objetivo. De manera similar al sistema de edición TALEN, una ZFN comprende un dominio de nucleasa FokI (o un derivado del mismo) fusionado a un dominio de unión al ADN. En el caso de una ZFN, el dominio de unión al ADN comprende uno o más dedos de zinc. Un dedo de zinc es una pequeña porción estructural proteica estabilizada por uno o más iones de zinc. Un dedo de zinc puede comprender, por ejemplo, Cys2His2 y puede reconocer una secuencia de aproximadamente 3 pb. Se pueden combinar varios dedos de zinc de especificidad conocida para producir polipéptidos de múltiples dedos que reconocen secuencias de aproximadamente 6, 9, 12, 15 o 18 pb.

[0141] La ZFN reconoce sitios de ADN no palindrómicos. Para escindir el sitio objetivo, un par

de ZFN se dimerizan y se ensamblan en hebras opuestas del sitio objetivo. Se encuentran disponibles varias técnicas de selección y ensamblaje modular para generar dedos de zinc (y combinaciones de los mismos) que reconocen secuencias específicas, incluida la presentación en fagos, sistemas de un híbrido de levadura, sistemas bacterianos de un híbrido y dos híbridos, y células de mamíferos.

E. Meganucleasa

[0142] En algunas modalidades, el sistema de edición de gen es un sistema de edición de gen de meganucleasa. Una meganucleasa es una nucleasa artificial que reconoce sitios de escisión de entre 15-40 pares de bases. En algunos casos, las meganucleasas se agrupan en familias basadas en sus porciones estructurales que afectan la actividad de la nucleasa y/o el reconocimiento del ADN. Los miembros de la familia LAGLIDADG se caracterizan por tener una o dos copias de la porción LAGLIDADG conservada. En algunos casos, las meganucleasas LAGLIDADG con una sola copia de la porción LAGLIDADG forman homodímeros, mientras que los miembros con dos copias de la porción LAGLIDADG se encuentran como monómeros. Los miembros de la familia GIY-YIG tienen un módulo GP-YIG, que tiene entre 70-100 residuos de largo e incluye cuatro o cinco porciones de secuencia conservadas con cuatro residuos invariantes, dos de los cuales son necesarios para la actividad. Las meganucleasas de caja His-Cys se caracterizan por una serie altamente conservada de histidinas

y cisteínas en una región que abarca varios cientos de residuos de aminoácidos. En la familia NHN, los miembros se definen por porciones que contienen dos pares de histidinas conservadas rodeadas por residuos de asparagina. En la técnica se conocen estrategias para diseñar una meganucleasa con especificidad de unión al ADN alterado (*por ejemplo, para unirse a una secuencia de ácido nucleico predeterminada*).

[0143] En algunos casos, la meganucleasa es una nucleasa híbrida denominada megaTAL que comprende un dominio TALE fusionado al N terminal de una meganucleasa. En algunos casos, la meganucleasa es miembro de la familia LAGLIDADG.

[0144] En algunas modalidades, el sistema de edición de gen es un sistema de silenciamiento de genes. El sistema de silenciamiento de gen ejemplar comprende un sistema de silenciamiento de gen mediado por ARNi, ARNsi o ARNsh.

V. ÁCIDOS NUCLEICOS EXÓGENOS

[0145] La presente invención proporciona una célula inmunitaria modificadas o células precursoras de la misma que comprenden una inserción y/o supresión en uno o más loci del gen que codifica una proteína inmune endógena que es capaz de regular negativamente la expresión del gen de la proteína inmune endógena y un ácido nucleico exógeno. En algunas modalidades, el ácido nucleico exógeno codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), un

receptor de células T diseñado por ingeniería genética (TCR), un receptor similar a inmunoglobulina de células Asesinas (KIR), un polipéptido de unión al antígeno, un ligando del receptor de la superficie celular, o un antígeno tumoral. En algunas modalidades, se describe en el presente documento una célula inmunitaria modificada que expresa un polipéptido exógeno. En algunos casos, el ácido nucleico exógeno codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunos casos, el ácido nucleico exógeno codifica un polipéptido de unión al antígeno. En algunos casos, el ácido nucleico exógeno codifica un receptor similar a inmunoglobulina de células Asesinas (KIR). En casos adicionales, el ácido nucleico exógeno codifica un ligando del receptor de la superficie celular o un antígeno tumoral.

A. Receptores de Antígeno Quimérico

[0146] La presente invención también incluye una célula T modificada con expresión del gen regulada negativamente como se describe en el presente documento y un receptor de antígeno quimérico (CAR). En algunas modalidades, la presente invención abarca la célula T modificada que comprende un CAR o un ácido nucleico que codifica un CAR, en donde el CAR comprende un dominio de unión al antígeno, un dominio bisagra, un dominio de la transmembrana, un dominio coestimulador, y un dominio de señalización intracelular. Cualquier célula modificada que comprende un CAR que comprende cualquier dominio de unión al

antígeno, cualquier bisagra, cualquier dominio de la transmembrana, cualquier dominio coestimulador, y se contempla cualquier dominio de señalización intracelular descrito en el presente documento, y puede ser comprendido y manufacturado fácilmente por una persona experta en la técnica a la vista de la descripción contenida en el presente documento.

[0147] El dominio de unión al antígeno puede ser operablemente ligado a otro dominio del CAR, tal como el dominio de la transmembrana o el dominio intracelular, ambos descritos en el presente documento, para expresión en la célula inmunitaria. En una modalidad, una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de unión al antígeno es operablemente ligada a un segundo ácido nucleico que codifica un dominio de la transmembrana, y además operablemente ligada a una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio intracelular.

[0148] Los dominios de unión al antígeno descritos en el presente documento se pueden combinar con cualquiera de los dominios de la transmembrana descritos en el presente documento, cualquiera de los dominios intracelulares o dominios citoplasmáticos descritos en el presente documento, o cualquiera de los otros dominios descritos en el presente documento que pueden incluirse en un CAR de la presente invención. Un CAR objeto de la presente invención también puede incluir un dominio espaciador como se

describe en el presente documento. En algunas modalidades, cada uno de los dominios de unión al antígeno, dominio de la transmembrana y dominio intracelular está separado por un enlazador.

1. Dominio de Unión al Antígeno

[0149] El dominio de unión al antígeno de un CAR es una región extracelular del CAR para unirse a un antígeno objetivo específico que incluye proteínas, carbohidratos y glicolípidos. En algunas modalidades, el CAR comprende afinidad por un antígeno objetivo (*por ejemplo*, un antígeno asociado a un tumor) en una célula objetivo (*por ejemplo*, una célula cancerosa). El antígeno objetivo puede incluir cualquier tipo de proteína, o epítopo de la misma, asociado con la célula objetivo. Por ejemplo, el CAR puede comprender afinidad por un antígeno objetivo en una célula objetivo que indica un estado particular de la célula objetivo.

[0150] Como se describe en el presente documento, un CAR de la presente descripción que tiene afinidad por un antígeno objetivo específico en una célula objetivo puede comprender un dominio de unión específico del objetivo. En algunas modalidades, el dominio de unión específico del objetivo es un dominio de unión específico del objetivo murino, *por ejemplo*, el dominio de unión específico del objetivo es de origen murino. En algunas modalidades, el dominio de unión específico del objetivo es

un dominio de unión específico del objetivo humano, *por ejemplo*, el dominio de unión específico del objetivo es de origen humano.

[0151] El dominio de unión al antígeno puede incluir cualquier dominio que se une al antígeno y puede incluir, pero no se une a, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo sintético, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo no humano y cualquier fragmento del mismo. Por tanto, en una modalidad, la porción del dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo de mamífero o un fragmento del mismo. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo de longitud completa. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno comprende un fragmento de unión al antígeno (*Fab*), *por ejemplo*, *Fab*, *Fab'*, $F(ab')_2$, un *Fab*₂ monoespecífico, un *Fab*₂ biespecífico, un *Fab*₂ triespecífico, un fragmento variable de cadena sencilla (*scFv*), *dAb*, *scFv* en serie, *VhH*, *V-NAR*, camélido, *diacuerpo*, *minicuerpo*, *triacuerpo* o *tetracuerpo*.

[0152] En algunas modalidades, un CAR de la presente descripción puede tener afinidad por uno o más antígenos objetivo en una o más células objetivo. En algunas modalidades, un CAR puede tener afinidad por uno o más antígenos objetivo en una única célula objetivo. En tales modalidades, el CAR es un CAR biespecífico o un CAR multiespecífico. En algunas modalidades, el CAR comprende uno

o más dominios de unión específicos del objetivo que confieren afinidad por uno o más antígenos objetivo. En algunas modalidades, el CAR comprende uno o más dominios de unión específicos del objetivo que confieren afinidad por el mismo antígeno objetivo. Por ejemplo, un CAR que comprende uno o más dominios de unión específicos del objetivo que tienen afinidad por el mismo antígeno objetivo podría unirse a distintos epítomos del antígeno objetivo. Cuando una pluralidad de dominios de unión específicos del objetivo está presente en un CAR, los dominios de unión pueden disponerse en serie y pueden estar separados por péptidos enlazadores. Por ejemplo, en un CAR que comprende dos dominios de unión específicos del objetivo, los dominios de unión están conectados entre sí de forma covalente en una cadena sencilla polipeptídica, a través de un enlazador polipeptídico, una región bisagra de Fc o una región bisagra de la membrana.

[0153] Como se usa en el presente documento, el término "fragmento variable de cadena sencilla" o "scFv" es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de una inmunoglobulina (por ejemplo, de *ratón* o humana) unida covalentemente para formar un heterodímero VH::VL. Las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) están unidas directamente o mediante un enlazador o espaciador que codifica un péptido, que conecta el N terminal de la VH con el C terminal de la VL, o el C terminal de la VL, el VH con el N terminal del VL. Los

términos "enlazador" y "espaciador" se usan indistintamente en el presente documento. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno (*por ejemplo*, dominio de unión a Tn-MUC1, dominio de unión a PSMA o dominio de unión a mesotelina) comprende un scFv que tiene la configuración desde el N terminal al C terminal, VH-enlazador-VL. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno (*por ejemplo*, un dominio de unión a Tn-MUC1, un dominio de unión a PSMA o un dominio de unión a mesotelina) comprende un scFv que tiene la configuración desde el N terminal al C terminal, VL-enlazador-VH. Los expertos en la técnica podrán seleccionar la configuración apropiada para su uso en la presente invención.

[0154] El enlazador es típicamente rico en glicina para su flexibilidad, así como en serina o treonina para su solubilidad. El enlazador puede unir la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del dominio de unión al antígeno extracelular. Se describen ejemplos no limitantes de enlazador en Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) y WO 2014/087010. Varias secuencias enlazadoras se conocen en la técnica, que incluyen, sin limitación, enlazadores de glicina serina (GS) tales como (GS)*n*, (GSGGS)*n* (SEQ ID NO: 47), (GGGS)*n* (SEQ ID NO: 48), y (GGGGS)*n* (SEQ ID NO: 49), donde *n* representa un entero de al menos 1. Secuencias enlazadoras ejemplares pueden comprender secuencias de

aminoácido que incluyen, sin limitación, GGSG (SEQ ID NO: 29), GGSGG (SEQ ID NO: 30), GSGSG (SEQ ID NO: 31), GSGGG (SEQ ID NO: 32), GGGSG (SEQ ID NO: 33), GSSSG (SEQ ID NO: 34), GGGGS (SEQ ID NO: 49), o GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 50), y similares. Aquellos expertos en la técnica podrían ser capaces de seleccionar la secuencia enlazadora apropiada para uso en la presente invención. En una modalidad, un dominio de unión al antígeno (*por ejemplo*, un dominio de unión Tn-MUC1, un dominio de unión PSMA, o un dominio de unión a mesotelina) de la presente invención comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VH y VL es separada por la secuencia enlazadora que tiene la secuencia de aminoácido GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 50). En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico enlazadora comprende la secuencia de nucleótido GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCTGGGTGGCGGCGGATCT (SEQ ID NO: 51).

[0155] A pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción de un enlazador, las proteínas scFv conservan la especificidad de la inmunoglobulina original. Los anticuerpos polipeptídicos Fv de cadena sencilla pueden expresarse a partir de un ácido nucleico que comprende secuencias que codifican VH y VL como describe por Huston, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988). Se han descrito scFv antagonistas que tienen actividad inhibidora. Véase *por ejemplo*, Zhao et al.,

Hybridoma (Larchmt), 27(6):455-51 (2008). Se han descrito scFv antagonistas que tienen actividad estimuladora. Véase *por ejemplo*, Peter et al., *J. Biol. Chem.*, 25278(38):36740-7 (2003).

[0156] Como se usa en el presente documento, "Fab" se refiere a un fragmento de una estructura de anticuerpo que se une a un antígeno pero que es monovalente y no tiene una porción Fc; *por ejemplo*, un anticuerpo digerido por la enzima papaína produce dos fragmentos Fab y un fragmento Fc (*por ejemplo*, una región constante de cadena pesada (H); región Fc que no se une a un antígeno).

[0157] En algunos casos, el dominio de unión al antígeno puede derivar de la misma especie en la que finalmente se utilizará el CAR. *Por ejemplo*, para uso en humanos, el dominio de unión al antígeno del CAR puede comprender un anticuerpo humano como se describe en otra parte del presente documento, o un fragmento del mismo.

[0158] Por consiguiente, una célula inmunitaria, *por ejemplo*, obtenida por un método descrito en el presente documento, se puede diseñar por ingeniería genética para expresar un CAR que dirige uno de los siguientes antígenos asociados al cáncer (antígenos tumorales): CD19; CD20; CD22 (Siglec 2); CD37; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (también referido como CD2 subserie 1, CRACC, SLAMF7, CD319, y 19A24); molécula 1 similar a lectina

tipo C (CLL-1 o CLECL1); CD33; CD133; receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR); receptor del factor de crecimiento epidermal variante III (EGFRvIII); receptor del factor de crecimiento epidermal humano (HER1); gangliósido G2 (GD2); gangliósido GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); maduración de células B del miembro de la familia del receptor TNF (BCMA); antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAc-Ser/Thr)); antígeno de la membrana específico de la próstata (PSMA); receptor huérfano 1 similar al receptor de tirosina cinasa (ROR1); Tirosina Cinasa 3 similar a Fms (FLT3); glicoproteína asociada al tumor 72 (TAG72); CD38; CD44v6; Antígeno carcinoembriónico (CEA); Molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); subunidad alfa-2 del receptor de Interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2); Mesotelina; receptor alfa de Interleucina 11 (IL-11Ra); antígeno de célula troncal de próstata (PSCA); Proteasa Serina 21 (Testisina o PRSS21); receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); antígeno Lewis(Y); CD24; receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR-beta); antígeno embriónico 4 específico de la etapa (SSEA-4); receptor alfa de Folato; receptor de la proteína tirosina cinasa ERBB2 (Her2/neu); Mucina 1, asociada a la superficie celular (MUC 1); GalNAc1-O-Ser/Thr (Tn) MUC 1 (TnMUC1); molécula de adhesión celular neural (NCAM); Prostasa; fosfatasa de ácido prostático (PAP); factor de elongación 2 mutado (ELF2M);

Efrina B2; proteína de activación del fibroblasto alfa (FAP); receptor del factor de crecimiento similar a insulina 1 (receptor IGF-I), anhidrasa carbónica IX (CAIX); Subunidad de Proteasoma (Prosoma, Macropain), Tipo Beta, 9 (LMP2); glicoproteína 100 (gp100); proteína de fusión del oncogén que consiste de la región de agrupamiento de punto de rompimiento (BCR) y homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson 1 (Abl) (bcr-abl); tirosinasa; receptor 2 de tipo A de efrina (EphA2); Fucosil GM1; molécula de adhesión Lewis de sialilo (sLe); gangliósido GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); transglutaminasa 5 (TGS5); antígeno asociado al melanoma de alto peso molecular (HMWMAA); o-acetil-GD2 gangliósido (OAcGD2); receptor beta de Folato; marcador 1 endotelial tumoral (TEM1/CD248); relacionado al marcador endotelial tumoral 7 (TEM7R); claudina 6 (CLDN6); receptor de la hormona estimulante tiroidea (TSHR); miembro D, grupo 5, clase C del receptor acoplado a la proteína G, miembro D (GPRC5D); marco lector abierto 61 del cromosoma X (CXORF61); CD97; CD179a; cinasa de linfoma anaplásico (ALK); ácido polisiálico; específico de la placenta 1 (PLAC1); porción de hexasacárido de glicoceramida globoH (GloboH); antígeno de diferenciación de glándula mamaria (NY-BR-1); uroplacina 2 (UPK2); proteína tirosina cinasa Met (c-Met); receptor 1 celular del virus de la Hepatitis A (HAVCR1); adrenoceptor beta 3 (ADRB3); panexina 3 (PANX3); receptor 20 acoplado a la proteína G (GPR20); complejo de antígeno 6 de

linfocito, locus K 9 (LY6K); receptor olfatorio 51E2 (OR51E2); proteína de marco lector alterno TCR gamma (TARP); proteína del tumor de Wilms (WT1); antígeno 1 de Cáncer/Testículo (NY-ESO-1); antígeno 2 de Cáncer/Testículo (LAGE-1a); antígeno 1 asociado a melanoma (MAGE-A1); gen 6 variante de translocación ETS, localizado en el cromosoma 12p (ETV6-AML); proteína de espermatozoos 17 (SPA17); Familia del Antígeno X, Miembro 1A (XAGE1); receptor 2 de la superficie de células que se unen a angiopoietina (Tie 2); antígeno-1 de melanoma de cáncer testicular (MAD-CT-1); antígeno-2 de melanoma de cáncer testicular (MAD-CT-2); antígeno 1 relacionado a Fos; proteína tumoral p53 (p53); mutante p53; proteína; surviving; telomerasa; antígeno tumoral-1 de carcinoma de próstata (PCTA-1 o Galectina 8), antígeno de melanoma reconocido por células T 1 (MelanA o MART1); sarcoma de Rata (Ras) mutante; transcriptasa inversa de Telomerasa humana (hTERT); puntos de rompimiento de translocación de sarcoma; inhibidor de melanoma de apoptosis (ML-IAP); ERG (proteína de la membrana, gen de fusión ETS de serina 2 (TMPRSS2)); N-Acetil glucosaminil-transferasa V (NA17); proteína de caja apareada Pax-3 (PAX3); receptor andrógeno; Ciclina B 1; homólogo derivado de neuroblastoma de oncogén viral de mielocitomatosis de ave v-myc (MYCN); Miembro C de la Familia Homóloga de Ras (RhoC); proteína 2 relacionada a tirosinasa (TRP-2); Citocromo P450 1B 1 (CYP1B 1); Factor de Unión similar a CCCTC (Proteína de Dedo de Zinc)- (BORIS o Brother

del Reticulador de Sitios Impresos), Antígeno de Carcinoma de Células Escamosas Reconocido por Células T 3 (SART3); proteína de caja Apareada Pax-5 (PAX5); proteína de unión a proacrosina sp32 (OY-TES 1); proteína tirosina cinasa específica del linfocito (LCK); proteína 4 de anclaje de cinasa (AKAP-4); sarcoma sinovial, punto de rompimiento X 2 (SSX2); Receptor para Productos Finales de Glicación Avanzada (RAGE-1); ubicuo renal 1 (RU1); ubicuo renal 2 (RU2); legumaina; virus del papiloma humano E6 (HPV E6); virus del papiloma humano E7 (HPVE7); carboxil esterasa intestinal; proteína de choque térmico 70-2 mutada (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; receptor 1 similar a inmunoglobulina asociada al leucocito (LAIR1); fragmento Fc del receptor IgA (FCAR o CD89); miembro 2 de la subfamilia A del receptor similar a la inmunoglobulina leucocitaria (LILRA2); miembro f de la familia similar a la molécula CD300 (CD300LF); miembro A de la familia 12 del dominio de lectina tipo C (CLEC12A); antígeno 2 de célula estromal de médula ósea (BST2); receptor tipo 2 de la hormona similar a mucina que contiene el módulo tipo GF (EMR2); antígeno de linfocito 75 (LY75); Glipicano-2 (GPC2); Glipicano-3 (GPC3); NKG2D; KRAS; receptor alfa-4 de la familia GDNF (GFRA4); IL13Ra2; receptor Fc tipo 5 (FCRL5); y polipéptido 1 similar a inmunoglobulina lambda (IGLL1).

[0159]

En algunas modalidades, la célula inmunitaria es diseñada por ingeniería genética para expresar un CAR que se dirige a CD19, CD20, CD22, BCMA, CD37,

Mesotelina, PSMA, PSCA, Tn-MUC1, EGFR, EGFRvIII, c-Met, HER1, HER2, CD33, CD133, GD2, GPC2, GPC3, NKG2D, KRAS, o WT1.

2. Dominio de la Transmembrana

[0160] Con respecto al dominio de la transmembrana, el CAR puede ser diseñado para comprender un dominio de la transmembrana que conecta el dominio de unión al antígeno del CAR al dominio intracelular. El dominio de la transmembrana de un CAR objetivo es una región que es capaz de recorrer la membrana plasmática de una célula (*por ejemplo*, una célula inmunitaria o precursor de la misma). El dominio de la transmembrana es para inserción en una membrana celular, *por ejemplo*, una membrana de célula eucariótica. En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana está interpuesto entre el dominio de unión al antígeno y el dominio intracelular de un CAR.

[0161] En una modalidad, el dominio de la transmembrana está naturalmente asociado con uno o más de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio de la transmembrana puede ser seleccionado o modificado por sustitución de aminoácido para evitar la unión de tales dominios al dominio de la transmembranas de las mismas o diferentes proteínas de la membrana de superficie para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

[0162] En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana puede ser derivado de ya sea una

fuente natural o de una fuente sintética. Donde la fuente es natural, el dominio puede ser derivada de cualquier proteína de la transmembrana o unida a la membrana, *por ejemplo*, una proteína de la transmembrana tipo I. Donde la fuente es sintética, el dominio de la transmembrana puede ser cualquier secuencia artificial que facilita la inserción del CAR en una membrana celular, *por ejemplo*, una secuencia hidrofóbica artificial. En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana de uso particular en esta invención incluye, sin limitación, un dominio de la transmembrana derivado de (la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD2, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), receptor 1 similar a Toll (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, y un receptor similar a inmunoglobulina asesina (KIR). En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana comprende al menos un receptor de la transmembrana de una proteína seleccionada a partir del grupo que consiste de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD2, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), receptor 1 similar a Toll (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, y un receptor similar a inmunoglobulina asesina (KIR). En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana puede ser

sintético. En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana sintético comprende predominantemente residuos hidrofóbicos tales como leucina y valina. En ciertas modalidades ejemplares, un triplete de fenilalanina, triptófano y valina se encontrará en cada extremo de un dominio de la transmembrana sintético.

[0163] El dominio de la transmembrana como se describe en el presente documento puede ser combinado con cualquiera de los dominios de unión al antígeno descritos en el presente documento, cualquiera de los dominios de señalización coestimuladores descritos en el presente documento, cualquiera de los dominios de señalización intracelular descritos en el presente documento, o cualquiera de los otros dominios descritos en el presente documento que pueden ser incluidos en un CAR objetivo.

[0164] En una modalidad, el dominio de la transmembrana comprende un dominio de la transmembrana CD8 α . En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana comprende un dominio de la transmembrana CD8 α que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 23. En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 24.

[0165] En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana comprende un dominio de la transmembrana CD28. En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio de la transmembrana CD28 que comprende la

secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 27. En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana CD28 comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 28.

[0166] Las variaciones tolerables del dominio bisagra y/o de la transmembrana son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica, mientras mantiene su función propuesta. En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%, al menos aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácido expuestas en las SEQ ID NOs: 23 y/o 27. En algunas modalidades el dominio de la transmembrana es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido que tiene al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%,

al menos aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótido expuestas en la SEQ ID NOs: 24 y/o 28. El dominio de la transmembrana puede ser combinado con cualquier dominio bisagra y/o puede comprender uno o más dominios de la transmembrana descritos en el presente documento.

[0167] En algunas modalidades, el CAR comprende: cualquier dominio de unión al antígeno, un dominio de la transmembrana seleccionado a partir del grupo que consiste del dominio de la transmembrana de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD2, CD3, épsilon, CD45, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), CD278 (ICOS), CD357 (GITR), receptor 1 similar a Toll (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, y un receptor similar a inmunoglobulina asesina (KIR); cualquiera de los dominios de señalización coestimuladora, y cualquiera de los dominios intracelulares o dominios citoplásmicos descritos en el presente documento, o

cualquiera de los otros dominios descritos en el presente documento que pueden ser incluidos en el CAR, y opcionalmente un dominio bisagra.

[0168] En algunas modalidades, el CAR comprende además un dominio espaciador entre el dominio extracelular y el dominio de la transmembrana del CAR, o entre el dominio intracelular y el dominio de la transmembrana del CAR. Como se usa en el presente documento, el término "dominio espaciador" significa en general cualquier oligo- o polipéptido que funciona para enlazar el dominio de la transmembrana a, ya sea el dominio extracelular o, el dominio intracelular en la cadena polipeptídica. Un dominio espaciador puede comprender hasta aproximadamente 300 aminoácidos, *por ejemplo*, aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 aminoácidos, o aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 aminoácidos. En algunas modalidades, el dominio espaciador puede ser un enlazador oligo- o polipeptídico corto, *por ejemplo*, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, doble glicina-serina proporciona un enlazador particularmente adecuado entre el dominio de la transmembrana y el dominio de señalización intracelular del CAR objetivo.

[0169] Por consiguiente, el CAR de la presente descripción puede comprender cualquiera de los dominios de la transmembrana, dominios bisagra, o dominios espaciadores descritos en el presente documento.

3. Dominio Bisagra

[0170] En algunas modalidades, el CAR objetivo de la presente invención comprende una región bisagra. La región bisagra del CAR es una región hidrofílica la cual está localizada entre el dominio de unión al antígeno y el dominio de la transmembrana. En algunas modalidades, el dominio de bisagra facilita el plegado apropiado de la proteína para el CAR. En algunas modalidades, el dominio de bisagra es un componente opcional para el CAR. En algunas modalidades, el dominio de bisagra comprende un dominio seleccionado a partir de fragmentos Fc de anticuerpos, regiones bisagra de anticuerpo, regiones CH2 de anticuerpos, regiones CH3 de anticuerpos, secuencias bisagra artificiales o combinaciones de las mismas. En algunas modalidades, el dominio de bisagra se selecciona a partir de, pero no se limita a, una bisagra CD8a, bisagras artificiales hechas de polipéptidos que pueden ser tan pequeñas como tres glicinas (Gly). En algunas modalidades, la región bisagra es un polipéptido de la región bisagra derivado de un receptor. En algunas modalidades, la región bisagra es una región bisagra derivada de CD8). En una modalidad, el dominio bisagra comprende una secuencia de aminoácidos derivada de CD8 humano, o una variante del mismo. En algunas modalidades, un CAR objetivo comprende un dominio bisagra CD8 α y un dominio de la transmembrana CD8 α . En algunas modalidades, el dominio bisagra de CD8 α comprende la secuencia de aminoácidos

expuesta en la SEQ ID NO: 25. En algunas modalidades, el dominio bisagra de CD8 α comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 26.

[0171] En algunas modalidades el domino de bisagra comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%, al menos aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácido expuestas en las SEQ ID NO 25. En algunas modalidades el domino de bisagra es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido que tiene al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%, al menos aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos

aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótido expuestas en la SEQ ID NO: 26.

[0172] En algunas modalidades, el dominio de bisagra conecta el dominio de unión al antígeno al dominio de la transmembrana, el cual, está ligado al dominio intracelular. En modalidades ejemplares, la región bisagra es capaz de soportar el dominio de unión al antígeno para reconocer y unirse al antígeno objetivo en las células objetivo. Véase por ejemplo, Hudecek et al., *Cancer Immunol. Res.*, 3(2): 125-135 (2015). En algunas modalidades, la región bisagra es un dominio flexible, de este modo permitiendo al dominio de unión al antígeno tener una estructura para reconocer de manera óptima la estructura y densidad específicas de los antígenos objetivos en una célula tal como una célula tumoral. La flexibilidad de la región de bisagra permite que la región de bisagra adopte muchas conformaciones diferentes.

[0173] En algunas modalidades, el dominio de bisagra tiene una longitud seleccionada desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 50, desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 10, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 15, desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 20, desde

aproximadamente 20 hasta aproximadamente 25, desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 30, desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 40, o desde aproximadamente 40 hasta aproximadamente 50 aminoácidos.

[0174] Las regiones bisagra adecuadas pueden seleccionarse fácilmente y pueden tener cualquiera de varias longitudes adecuadas, tales como desde aproximadamente 1 aminoácido (*por ejemplo*, Glicina (Gly)) hasta aproximadamente 20 aminoácidos, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 15, desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 12 aminoácidos, que incluyen aproximadamente 4 hasta aproximadamente 10, aproximadamente 5 hasta aproximadamente 9, aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8, o aproximadamente 7 hasta aproximadamente 8 aminoácidos, y can be aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, o aproximadamente 7 aminoácidos.

[0175] En algunas modalidades, el aminoácido es una glicina (Gly). Se pueden utilizar polímeros de glicina y glicina-serina; Tanto Gly como Ser están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como un conjunto neutral entre los componentes. Se pueden utilizar polímeros de glicina; la glicina accede a un espacio phi-psi significativamente mayor que incluso la alanina, y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas (*véase, por ejemplo*, Scheraga, Rev.

Computational. Chem. (1992) 2: 73-142). En alguna modalidad, la región bisagra comprende polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina. En algunas modalidades, la región bisagra comprende polímeros de glicina-serina seleccionados a partir del grupo que consiste de (GS)_n, (GSGGS)_n (SEQ ID NO: 47) y (GGGS)_n (SEQ ID NO: 48), donde n es un entero de al menos uno). En algunas modalidades, el dominio de bisagra comprende una secuencia de aminoácido que incluye, pero no se limita a, GGSG (SEQ ID NO: 29), GGSGG (SEQ ID NO: 30), GSGSG (SEQ ID NO: 31), GSGGG (SEQ ID NO: 32), GGGSG (SEQ ID NO: 33), GSSSG (SEQ ID NO: 34). En alguna modalidad, la región bisagra comprende polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, u otros enlazadores flexibles conocidos en la técnica.

[0176] En algunas modalidades, la región bisagra es una región bisagra de cadena pesada de inmunoglobulina. Se conocen en la técnica secuencias de aminoácido de región bisagra de inmunoglobulina. En algunas modalidades, un dominio de bisagra de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consiste de DKTHT (SEQ ID NO: 35); CPPC (SEQ ID NO: 36); CPEPKSCDTPPPCPR (SEQ ID NO: 37) (véase, por ejemplo, Glaser et al., J. Biol. Chem. (2005) 280:41494-41503); ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 38); KSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 39); KCCVDCP (SEQ ID NO: 40); KYGPPCP (SEQ ID NO: 41); EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 42) (bisagra IgG1 humana);

ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 43) (bisagra IgG2 humana);
ELKTPLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO: 44) (bisagra IgG3 humana);
SPNMVPHAHAHQ (SEQ ID NO: 45) (bisagra IgG4 humana); y
similares.

[0177] En algunas modalidades, la región bisagra es una región bisagra de cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas modalidades, la bisagra se selecciona a partir de dominios CH1 y CH3 de IgGs (tales como IgG4 humana). En algunas modalidades, el dominio de bisagra comprende una secuencia de aminoácido de un dominio de bisagra IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humana. En algunas modalidades, la región bisagra puede incluir una o más sustituciones y/o inserciones y/o supresiones de aminoácidos en comparación con una región bisagra de tipo silvestre (de origen natural). En alguna modalidad, la histidina en la posición 229 (His229) de la bisagra de IgG1 humana se sustituye por tirosina (Tyr). En algunas modalidades, el dominio bisagra comprende la secuencia de aminoácidos EPKSCDKTYTCPPCP (SEQ ID NO: 46).

4. Dominio Coestimulador

[0178] El CAR de la presente invención también comprende un dominio intracelular. El dominio intracelular o de otro modo el dominio citoplásmico del CAR es responsable de la activación de la célula en la que se expresa el CAR. El término "dominio intracelular" de este modo, significa que incluye cualquier porción del

dominio intracelular suficiente para transducir la señal de activación. En una modalidad, el dominio intracelular incluye un dominio responsable de una función efectora. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser una actividad citolítica o una actividad auxiliar que incluye la secreción de citocinas. En una modalidad, el dominio intracelular del CAR incluye un dominio responsable de la activación y/o transducción de la señal. El dominio intracelular puede transmitir la activación de señales a través de interacciones de proteína-proteína, cambios bioquímicos u otra respuesta para alterar el metabolismo, la forma, la expresión genética u otra respuesta celular de la célula a la activación de la molécula de señalización intracelular quimérica.

[0179] Ejemplos de un dominio intracelular para uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, la porción citoplásmica de un receptor de células T (TCR), y cualquier molécula co-estimuladora, o cualquier molécula que actúa en conjunto con el TCR para iniciar la señal de transducción en la célula T, después de la activación del receptor de antígeno, así como también cualquier derivado o variante de estos elementos y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

[0180] En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización

coestimulador y una señalización intracelular. En ciertas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador. En una modalidad, el dominio intracelular del CAR comprende un dominio de señalización coestimulador seleccionado a partir del grupo que consiste de una porción de un dominio de señalización de proteínas en la superfamilia del TNFR, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS (CD278), NKG2C, B7-H3 (CD276), y un dominio intracelular derivado a partir de un receptor similar a inmunoglobulina asesina (KIR, cualquier derivado o variante del mismo, cualquier secuencia sintética del mismo que tiene la misma capacidad funcional, y cualquier combinación de las mismas.

[0181] En algunas modalidades, el dominio coestimulador comprende uno o más de un dominio coestimulador de una proteína seleccionada a partir del grupo que consiste de proteínas en la superfamilia del TNFR, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS (CD278), NKG2C, B7-H3 (CD276), y un dominio intracelular derivado a partir de un receptor similar a inmunoglobulina asesina (KIR), o una variante de los mismos. En algunas modalidades, el dominio coestimulador comprende uno o más de un dominio coestimulador de una proteína seleccionada a partir del grupo que consiste de proteínas en

el CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD27, CD2, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, el dominio de señalización coestimuladora comprende el dominio coestimulador 4-1BB. En algunas modalidades, el dominio de señalización coestimuladora comprende el dominio coestimulador CD2. En algunas modalidades, el dominio de señalización coestimuladora comprende el dominio coestimulador CD28.

[0182] En una modalidad, el dominio coestimulador del CAR comprende un dominio coestimulador 4-1BB que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el dominio coestimulador 4-1BB es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 2 o 3. En alguna modalidad, el dominio coestimulador del CAR comprende un dominio coestimulador CD28 que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, el dominio coestimulador CD28 es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, el dominio coestimulador del CAR comprende un dominio coestimulador CD28(YMFM) que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el dominio coestimulador CD28(YMFM) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 7. En

una modalidad, el dominio intracelular del CAR comprende un dominio coestimulador ICOS que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el dominio coestimulador ICOS es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, el dominio intracelular del CAR comprende un dominio coestimulador ICOS(YMNM) que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 11. En algunas modalidades, el dominio coestimulador ICOS(YMNM) es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, el dominio intracelular de un CAR objetivo comprende un dominio coestimulador CD2 que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el dominio coestimulador CD2 es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 14. En una modalidad, el dominio intracelular del CAR comprende un dominio coestimulador CD27 que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 15. En algunas modalidades, el dominio coestimulador CD27 es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 16. En una modalidad, el dominio intracelular del CAR comprende un dominio coestimulador OX40 que comprende la secuencia de aminoácido

expuesta en la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, el dominio coestimulador OX40 es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 18.

5. Dominio Intracelular

[0183] En ciertas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización intracelular. Ejemplos del dominio intracelular incluyen un fragmento o dominio de una o más moléculas o receptores que incluyen, pero no se limitan a, TCR, CD3 zeta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD86, FcR gamma común, FcR beta (Fc Épsilon Rib), CD79a, CD79b, Fc gamma R11a, DAP10, DAP12, receptor de células T (TCR), CD2, CD8, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX9, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, una proteína de la familia KIR, antígeno-1 asociado a la función del linfocito (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83, CD5, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRP1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD 11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD 162), LTBR, LAT,

GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, receptor 1 similar a Toll (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, tirosinas cinasas de la familia syk (Syk, ZAP 70, etc.), tirosinas cinasas de la familia src (Lck, Fyn, Lyn, etc.), otras moléculas co-estimuladoras descritas en el presente documento, cualquier derivado, variante, o fragmento de las mismas, cualquier secuencia sintética de una molécula co-estimuladora que tiene la misma capacidad funcional, y cualquier combinación de las mismas.

[0184] En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio intracelular seleccionado a partir del grupo que consiste de dominios de señalización citoplásmica de una cadena zeta CD2, CD3 humana (CD3 ζ), Fc γ RIII, Fc ϵ RI, una cola citoplásmica de un receptor Fc, una porción de activación a base de tirosina del inmunorreceptor (ITAM) que lleva el receptor citoplásmico, TCR zeta, FcR gamma, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, y CD66d, o una variante de los mismos. En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular comprende el dominio de señalización intracelular CD3 zeta.

[0185] Ejemplos adicionales de dominios intracelulares incluyen, sin limitación, dominios de señalización intracelular de varios tipos de otros receptores de señalización inmunitaria, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas de señalización de células T de primera, segunda y tercera generación, incluyendo CD3, coestimuladoras de la

familia B7 y receptores de la superfamilia del Receptor del Factor Necrosis del Tumor (TNFR). Adicionalmente, los dominios de señalización intracelular pueden incluir dominios de señalización utilizados por las células NK y NKT, tal como los dominios de señalización de NKp30 (B7-H6), y DAP 12, NKG2D, NKp44, NKp46, DAP10, y CD3z.

[0186] Los dominios de señalización intracelular adecuados para uso en el CAR de la presente invención incluyen cualquier dominio de señalización deseado que transduce una señal en respuesta a la activación del CAR (es decir, activado por antígeno y agente dimerizante). En algunas modalidades, una señal distinta y detectable *por ejemplo*, comprende producción aumentada de una o más citosinas por la célula; cambio en la transcripción de un gen objetivo; cambio en la actividad de una proteína; cambio en el comportamiento celular (*por ejemplo*, muerte celular); proliferación celular; diferenciación celular; supervivencia celular; y/o modulación de las respuestas de señalización celular, *por ejemplo*. En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular incluye cadenas de señalización de tipo DAP10/CD28. En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular no está covalentemente unido al CAR unido a la membrana, sino es preferiblemente infundido en el citoplasma.

[0187] Los dominios de señalización intracelular adecuados para uso en el CAR de la presente

invención incluyen polipéptidos de señalización intracelular que contienen porción de activación basada en el inmunorreceptor de tirosina (ITAM). En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular incluye al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis porciones ITAM como se describe a continuación. En algunas modalidades, una porción ITAM se repite dos veces en un dominio de señalización intracelular, donde el primero y segundo casos de la porción ITAM se separan de entre sí por 6 a 8 aminoácidos. En una modalidad, el dominio de señalización intracelular de un CAR objetivo comprende 3 porciones ITAM. En algunas modalidades, los dominios de señalización intracelular incluyen los dominios de señalización de receptores de inmunoglobulina humana que contiene porciones de activación a base de inmunorreceptor (ITAMs) tal como, pero no limitado a, Fc gamma RI, Fc gamma RIIA, Fc gamma RIIC, Fc gamma RIIIA, FcRL5.

[0188] Un dominio de señalización intracelular adecuado puede ser una porción que contiene una porción ITAM que se deriva de un polipéptido que contiene una porción ITAM. Por ejemplo, un dominio de señalización intracelular adecuado puede ser un dominio que contiene una porción ITAM de cualquier proteína que contiene una porción ITAM. De este modo, no es necesario que un dominio de señalización intracelular adecuado contiene la secuencia completa de la proteína completa de la que se deriva.

Ejemplos de polipéptidos que contienen la porción ITAM adecuados incluyen, pero no se limitan a: DAP12, FCER1G (cadena gamma del receptor I de Fc épsilon), CD3D (CD3 delta), CD3E (CD3 épsilon), CD3G (CD3 gamma), CD3Z (CD3 zeta), y CD79A (cadena alfa de la proteína asociada al complejo del receptor de antígeno).

[0189] En una modalidad, el dominio de señalización intracelular se deriva de DAP12 (también conocido como TYROBP; proteína de unión a la tirosina cinasa de la proteína TYRO; KARAP; PLOSL; proteína 12 de activación DNAX; proteína asociada a KAR; proteína de unión a la tirosina cinasa de la proteína TYRO; proteína asociada al receptor de activación asesino; proteína asociada al receptor de activación asesino; etc.). En una modalidad, el dominio de señalización intracelular se deriva de FCER1G (también conocido como FCRG; cadena I gamma del receptor Fc épsilon; cadena gamma del receptor Fc; RI gamma de Fc épsilon; fcr gamma; fceR1 gamma; subunidad gamma del receptor épsilon de inmunoglobulina de alta afinidad; receptor E de inmunoglobulina, cadena gamma, de alta afinidad; etc.). En una modalidad, el dominio de señalización intracelular se deriva de la cadena delta CD3 de la glicoproteína de la superficie de células T (también conocido como CD3D; CD3-DELTA; T3D; antígeno CD3, subunidad delta; CD3 delta; antígeno CD3d; polipéptido delta (complejo TiT3); OKT3, cadena delta; cadena T3 delta del receptor de células T;

cadena CD3 delta de glicoproteína de la superficie de células T; etc.). En una modalidad, el dominio de señalización intracelular se deriva de la cadena CD3 épsilon de glicoproteína de la superficie de células T (también conocido como CD3e, cadena T3/Leu-4 épsilon de antígeno de la superficie de células T, cadena CD3 épsilon de glicoproteína de la superficie de células T, AI504783, CD3, CD3épsilon, T3e, etc.). En una modalidad, el dominio de señalización intracelular se deriva de la cadena gamma de CD3 de glicoproteína de la superficie de células T (también conocido como CD3G, cadena T3 gamma del receptor de células T, CD3-GAMMA, T3G, polipéptido gamma (complejo TiT3), etc.). En una modalidad, el dominio de señalización intracelular se deriva de la cadena CD3 zeta de la glicoproteína de la superficie de células T (también conocido como CD3Z, cadena T3 zeta del receptor de células T, CD247, CD3-zeta, CD3H, CD3Q, T3Z, TCRZ, etc.). En una modalidad, el dominio de señalización intracelular se deriva de CD79A (también conocido como cadena alfa de la proteína asociada al complejo del receptor de antígeno de células B; antígeno CD79a (alfa asociado a inmunoglobulina); glicoproteína de la membrana MB-1; Ig-alfa; proteína asociada a la inmunoglobulina unida a la membrana; proteína asociada a IgM de la superficie; etc.). En una modalidad, un dominio de señalización intracelular adecuado para uso en el CAR de la presente descripción incluye una cadena de señalización de tipo DAP10/CD28. En una modalidad,

un dominio de señalización intracelular adecuado para uso en un CAR objetivo CAR de la presente descripción incluye un polipéptido ZAP70. En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular incluye un dominio de señalización citoplásmico de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, o CD66d. En una modalidad, el dominio de señalización intracelular en el CAR incluye un dominio de señalización citoplásmico de CD3 zeta humano.

[0190] Aunque usualmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar la cadena completa. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización intracelular, tal porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de la función efectora. El dominio de señalización intracelular incluye cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

[0191] Los dominios de señalización intracelular descritos en el presente documento pueden ser combinados con cualquiera de los dominios de señalización coestimuladora descritos en el presente documento, cualquiera de los dominios de unión al antígeno descritos en el presente documento, cualquiera del dominio de la transmembrana como se describe en el presente documento, o cualquiera de los otros

dominios descritos en el presente documento que pueden ser incluidos en el CAR. En alguna modalidad, el dominio intracelular del CAR comprende dominios de señalización dual. Los dominios de señalización dual pueden incluir un fragmento o dominio de cualquiera de las moléculas descritas en el presente documento. En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende el dominio coestimulador 4-1BB y dominio de señalización CD3 zeta; dominio coestimulador CD28 y dominio de señalización CD3 zeta; dominio coestimulador CD2 y dominio de señalización CD3 zeta. En algunas modalidades, el dominio intracelular del CAR incluye cualquier porción de una molécula co-estimuladora, tal como al menos un dominio de señalización de CD3, CD27, CD28, ICOS, 4-1BB, PD-1, receptor de células T (TCR), cualquier derivado o variante del mismo, cualquier secuencia sintética del mismo que tiene la misma capacidad funcional, y cualquier combinación de las mismas.

[0192] Además, en la técnica se conocen variantes de dominios de señalización intracelular adecuados para su uso en un CAR objetivo. La porción YMFM se encuentra en ICOS y es una porción de unión a SH2 que recluta las subunidades p85 y p50alfa de PI3K, lo que da como resultado una señalización AKT mejorada. En una modalidad, se puede generar una variante del dominio intracelular CD28 para que comprenda una porción YMFM.

[0193] En una modalidad, el dominio intracelular de un CAR objetivo comprende un dominio de

señalización intracelular CD3 zeta que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21, la cual puede ser codificada por una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido expuesta en la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22, respectivamente.

[0194] Las variaciones tolerables del dominio intracelular se conocerán por aquellos expertos en la técnica, mientras se mantiene la actividad específica. En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácido expuestas en las SEQ ID NO: 19 o 21. En algunas modalidades, el dominio intracelular es codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que tiene al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de nucleótido expuestas en la SEQ ID NO: 20 o 22.

[0195] En una modalidad, el dominio

intracelular de un CAR objetivo comprende un dominio coestimulador ICOS y un dominio de señalización intracelular CD3 zeta. En una modalidad, el dominio intracelular de un CAR objetivo comprende un dominio coestimulador CD28 y un dominio de señalización intracelular CD3 zeta. En una modalidad, el dominio intracelular de un CAR objetivo comprende un dominio coestimulador variante CD28 YMFM y un dominio de señalización intracelular CD3 zeta. En una modalidad, el dominio intracelular de un CAR objetivo comprende un dominio coestimulador CD27 y un dominio de señalización intracelular CD3 zeta. En una modalidad, el dominio intracelular de un CAR objetivo comprende un dominio coestimulador OX40 y un dominio de señalización intracelular CD3 zeta. En una modalidad ejemplar, el dominio intracelular de un CAR objetivo comprende un dominio coestimulador 4-1BB y un dominio de señalización intracelular CD3 zeta. En una modalidad ejemplar, el dominio intracelular de un CAR objetivo comprende un dominio coestimulador CD2 y un dominio de señalización intracelular CD3 zeta.

[0196] La **Tabla 2** ilustra secuencias ejemplares de los dominios de un a CAR descritos en el presente documento.

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	Secuencia de aminoácido del dominio coestimulador 4-1BB	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL
2	Secuencia de ácido nucleico del dominio coestimulador 4-1BB #1	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACA ACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG ACGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAAGAAGAAGGA GGATGTGAACTG
3	Secuencia de ácido nucleico del dominio coestimulador 4-1BB #2	AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACA ACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAAGAAGAAGGA GGATGTGAACTG
4	Secuencia de aminoácido del dominio coestimulador	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	CD28	
5	Secuencia de ácido nucleico del dominio coestimulador CD28	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACAT GAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGC ATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCC TATCGCTCC
6	Secuencia de aminoácido del dominio coestimulador CD28 (YMFM)	RSKRSRLHSDYMFMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAA YRS
7	Secuencia de ácido nucleico del dominio coestimulador CD28 (YMFM)	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACAT GTTTCATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGC ATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCC TATCGCTCC
8	Secuencia de aminoácido del dominio coestimulador ICOS	TKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL
9	Secuencia de ácido nucleico del dominio	ACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAA CGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCA AAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	coestimulador ICOS #1	
10	Secuencia de ácido nucleico del dominio coestimulador ICOS #2	ACAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAA CGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCA AAAAATCTAGACTCACAGATGTGACCCTA
11	Secuencia de aminoácido del dominio coestimulador ICOS (YMNM)	TKKKYSSSVHDPNGEYMNMRVNTAKKSRLTDVTL
12	Secuencia de ácido nucleico del dominio coestimulador ICOS (YMNM)	ACAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAA CGGTGAATACATGAACATGAGAGCAGTGAACACAGCCA AAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA
13	Secuencia de aminoácido del dominio coestimulador CD2	TKRKKQRSRRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPAST PQNPATSQHPPPPPGHRSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQK RPPAPSGTQVHQQKGPPLPRPRVQPKPPHGAENSLSP SSN
14	Secuencia de ácido nucleico	ACAAAAGGAAAAACAGAGGAGTCGGAGAAATGATGA GGAGCTGGAGACAAGAGCCCACAGAGTAGCTACTGAAG

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	del dominio coestimulador CD2	AAAGGGGCCGGAAGCCCCACCAAATTCCAGCTTCAACC CCTCAGAATCCAGCAACTTCCCAACATCCTCCTCCACC ACCTGGTCATCGTTCCCAGGCACCTAGTCATCGTCCCC CGCCTCCTGGACACCGTGTTTCAGCACCAGCCTCAGAAG AGGCCTCCTGCTCCGTCGGGCACACAAGTTCACCAGCA GAAAGGCCCGCCCCTCCCCAGACCTCGAGTTCAGCCAA AACCTCCCCATGGGGCAGCAGAAAACCTCATTGTCCCCT TCCTCTAAT
15	Secuencia de aminoácido del dominio coestimulador CD27	QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQED YRKPEPACSP
16	Secuencia de ácido nucleico del dominio coestimulador CD27	CAACGAAGGAAATATAGATCAAACAAAGGAGAAAGTCC TGTGGAGCCTGCAGAGCCTTGTCGTTACAGCTGCCCCA GGGAGGAGGAGGGCAGCACCATCCCCATCCAGGAGGAT TACCGAAAACCGGAGCCTGCCTGCTCCCCC
17	Secuencia de aminoácido del dominio coestimulador OX40	ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHST LAKI
18	Secuencia de	GCCCTGTACCTGCTCCGCAGGGACCAGAGGCTGCCCCC

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	ácido nucleico del dominio coestimulador OX40	CGATGCCCCACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCAGGA CCCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCCACTCCACC CTGGCCAAGATC
19	Secuencia de aminoácido del dominio de señalización intracelular CD3 zeta	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
20	Secuencia de ácido nucleico del dominio de señalización intracelular CD3 zeta	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTA CCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATC TAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGA CGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAG GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCT TTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
21	Secuencia de aminoácido del dominio de señalización intracelular CD3	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	zeta (Q14K)	
22	Secuencia de ácido nucleico del dominio de señalización intracelular CD3 zeta (Q14K)	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTA CAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATC TAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGA CGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAG GAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATG AAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCT TTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
23	Secuencia de aminoácido del dominio de la transmembrana CD8 alfa (CD8 α)	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
24	Secuencia de ácido nucleico del dominio de la transmembrana CD8 alfa (CD8 α)	ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGT CCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGC
25	Secuencia de aminoácido del dominio bisagra CD8 alfa (CD8 α)	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACD

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
26	Secuencia de ácido nucleico del dominio bisagra CD8 alfa (CD8 α)	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCC CACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGG CGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGG GGGCTGGACTTCGCCTGTGAT
27	Secuencia de aminoácido del dominio de la transmembrana CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
28	Secuencia de ácido nucleico del dominio de la transmembrana CD28	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTG CTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCT GGGTG
29	Bisagra/enlazador	GGSG
30	Bisagra/enlazador	GGSGG
31	Bisagra/enlazador	GSGSG
32	Bisagra/enlazador	GSGGG
33	Bisagra/enlazador	GSSSG
34	Bisagra/enlazador	GGGSG
35	Región bisagra Ig	DKTHT
36	Región bisagra Ig	CPPC
37	Región bisagra Ig	CPEPKSCDTPPPCPR

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
38	Región bisagra Ig	ELKTPLGDTTHT
39	Región bisagra Ig	KSCDKTHTCP
40	Región bisagra Ig	KCCVDCP
41	Región bisagra Ig	KYGPPCP
42	bisagra IgG1 humana	EPKSCDKTHTCPPCP
43	bisagra IgG2 humana	ERKCCVECPPCP
44	bisagra IgG3 humana	ELKTPLGDTTHTCPRCP
45	bisagra IgG4 humana	SPNMVPHAHHAQ
46	bisagra IgG1 ^{H229Y} humana	EPKSCDKT <u>Y</u> TCPPCP
47	Bisagra/enlazador	(GSGGS)n
48	Bisagra/enlazador	(GGGS)n
49	Bisagra/enlazador	(GGGGS)n
50	Bisagra/enlazador	GGGSGGGSGGGGS
51	Bisagra/enlazador	GGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGG CGGATCT
52	CD3épsilon	AGATCCAGGATACTGAGGGCA
53	CD3delta	TCTCTGGCCTGGTACTGGCTA
54	CD3gamma	GCTTCTGCATCACAAGTCAGA
55	B2M	TATCTCTTGTACTACACTGA

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
56	TAP1	GCTCTTGGAGCCAACCGTTG
57	TAP2	CTTCCTCAAGGGCTGCCAGGA
58	TAPBP_ARNg1	CCTACATGCCCCCACCTCC
59	TAPBP_ARNg2	CGCTCGCATCCTCCACGAAC
60	NLRC5	GTGAGCAGCCTCACAAGACAG
61	C2TA	CCTTGGGGCTCTGACAGGTA
62	HLA-DMA	CCAGAACACTCGGGTGCCTCG
63	RFX5_ARNg1	CAAGGCCGTGCAGAACAAAGT
64	RFX5_ARNg2	TTCTGCACGGCCTTGGAATG
65	RFXANK	CCTGCACCCCTGAGCCTGTGA
66	RFXAP	GAGGATCTAGAGGACGAGGAG
67	Cadena Ii_ARNg1	CATCCTGGTGACTCTGCTCCT
68	Cadena Ii_ARNg2	TCCAGCCGGCCCTGCTGCTGG
69	Secuencia de ácido nucleico Tn-MUC1 CAR	ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGC CTTGCTGCTCCACGCCGAGGCCGGGATCCCAGGTGC AGCTGCAGCAGTCTGATGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGC AGCAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAC CTTCACCGACCACGCCATCCACTGGGTCAAGCAGAAGC CTGAGCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCCACTTCAGCCCC GGCAACACCGACATCAAGTACAACGACAAGTTCAAGGG CAAGGCCACCCTGACCGTGGACAGAAGCAGCAGCACCG CCTACATGCAGCTGAACAGCCTGACCAGCGAGGACAGC GCCGTGTACTTCTGCAAGACCAGCACCTTCTTTTTCGA CTACTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTGTCTAGCG

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGAAGTGGCGGAGGG GGATCTGAACTCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCTCTCT GACAGTGACAGCCGGCGAGAAAGTGACCATGATCTGCA AGTCCTCCCAGAGCCTGCTGAACTCCGGCGACCAGAAG AACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAACCCGGCCAGCC CCCCAAGCTGCTGATCTTTTGGGCCAGCACCCGGGAAA GCGGCGTGCCCGATAGATTCACAGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCGTGCAGGCCGA GGACCTGGCCGTGTATTACTGCCAGAACGACTACAGCT ACCCCCTGACCTTCGGAGCCGGCACCAAGCTGGAAGT AAGTCCGGAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAAC ACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCGTGCCCTGC GCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGGCGCAGTG CACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACAT CTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCC TGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGCACCAAAGGAAA AAACAGAGGAGTCGGAGAAATGATGAGGAGCTGGAGAC AAGAGCCCACAGAGTAGCTACTGAAGAAAGGGCCGGA AGCCCCACCAAATTCCAGCTTCAACCCCTCAGAATCCA GCAACTTCCCAACATCCTCCTCCACCACCTGGTCATCG TTCCCAGGCACCTAGTCATCGTCCCCCGCCTCCTGGAC ACCGTGTTTCAGCACCAGCCTCAGAAGAGGCCTCCTGCT CCGTGCGGCACACAAGTTCACCAGCAGAAAGGCCCGCC CCTCCCCAGACCTCGAGTTCAGCCAAAACCTCCCCATG

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGGCAGCAGAAAACATCATTGTCCCCTTCCTCTAATATC GATAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGC GTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAG AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGC AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGG ATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGG CCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT ACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
70	Secuencia de aminoácido Tn- MUC1 CAR	MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLQQSDAELVKPG SSVKISKASGYTFTDHAHWWKQKPEQGLEWIGHFSP GNTDIKYNDKFKGKATLTVDRSSSTAYMQLNSLTSEDS AVYFCKTSTFFFDYWGGQTTLTVSSGGGSGGGGSGGG GSELVMTOSPSSLTVTAGEKVTMICKSSQSLLNSGDQK NYLTWYOQKPGQPPKLLIFWASTRESGVPDRFTGSGSG TDFTLTISSVQAEDLAVYYCONDYSYPLTFGAGTKLEL KSGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCTKRK KQSRNRNDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPONP ATSQHPPPPGHRSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPPA PSGTQVHQKGPPLPRPRVQPKPPHGAAENSLSPSSNI DRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		MKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
71	Secuencia de aminoácido Mesotelina CAR (M5)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVEKPGAS VKVSCKASGYTFTDYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS GGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAV YYCASGWDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQSIRYYLS WYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRS ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
72	Secuencia de aminoácido de CAR Mesotelina (M11)	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNS GGTNYAQNFQGRVTMTRDTSISTAYMELRRLRSDDTAV YYCASGWDFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSDIRMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQSIRYYLS WYQQKPGKAPKLLIYTASILQNGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCLQTYTTPDFGPGTKVEIKTTTP APRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIF KQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRS

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		ADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
73	Secuencia de aminoácido del dominio de unión específico de PSMA humanizado	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTEYTIHWVR QAPGKGLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDRVITITVDKST STAYMELSSLRSEDTAVYYCAAGWNFDYWGQGTITVTVS SGGGSGGGGSSGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CKASQDVGTAVDWYQQKPGQAPKLLIYWASTRHTGVPD RFSGSGSGTDFTLTISRLLQPEDFAVYYCQQYNSYPLTF GQGTKVDIK
74	Secuencia de ácido nucleico del dominio de unión específico de PSMA humanizado	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTG GATACACATTCAGTGAATACACCATCCACTGGGTGAGG CAGGCCCTTGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAACAT TAATCCTAACAAATGGTGGTACTACCTACAACCAGAAGT TCGAGGACAGAGTCACAATCACTGTAGACAAGTCCACC AGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGA GGATACTGCAGTCTATTACTGTGCAGCTGGTTGGAAC TTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCC TCAGGAGGCGGAGGATCTGGCGGCGGAGGAAGTTCTGG CGGAGGCAGCGACATTCAGATGACCCAGTCTCCCAGCA CCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACT TGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTGCTGTAGACTG GTATCAACAGAAACCAGGGCAAGCTCCTAAACTACTGA

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGAT CGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT CACCATCAGCAGACTGCAGCCTGAAGACTTTGCAGTTT ATTACTGTCAGCAATATAACAGCTATCCTCTCACGTTC GGCCAGGGGACCAAGGTGGATATCAAA
75	Secuencia de aminoácido del dominio de unión específico de Mesotelina	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVVR Q APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQNFQGRVTMTRDTSIS TAYMELRRLRSDDTAVYYCASGWDFDYWGQGLTVTVSS GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIRMTQSPSSLASVGR VTITCRASQSIYYLSWYQQKPGKAPKLLIYTASILQN GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQTYTT PDFGPGTKVEIK
76	Secuencia de aminoácido del receptor negativo dominante STGFPRII (TGFbRII-DN)	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVOKSVNNDMIV TDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI CEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILE DAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFVÉA SEYNTSNPDLLLVIQVTGISLLPPLGVAISVIIIFYC YRVNRQQKLSSSG
77	Secuencia de ácido nucleico del receptor negativo dominante	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCA CATCGTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCAC CGCACGTTCAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTC ACTGACAACAACGGTGCAGTCAAGTTTCCACAACCTGTG TAAATTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACC

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	TGFPRII (TGFbRII-DN)	AGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATC TGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAG AAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCC ATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAA GATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGGAAAAAAA AAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCT CTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAA TATAACACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATT TCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAG TTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACTGCTACCGC GTTAACCGGCAGCAGAAGCTGAGTTCATCCGGA
78	Secuencia de aminoácido del receptor PD1-CTM-CD28	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVP TAHPSPSPRPAGQFQTLVFWVLVVVGGVLACYSLLVTV AFIIFWVRSKRSRLHSDYMN TPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
79	Secuencia de ácido nucleico del receptor PD1-CTM-CD28	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGC GGTGCTACAACCTGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAG ACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCTTCTCC CCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCAC CTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCG TGCTAAACTGGTACCG

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CATGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCT TCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCGGCCAGGACTGCCGC TTCCGTGTCACACAACTGCCCAACGGGCGTGACTTCCA CATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGGCGCAATGACAGCGGCA CCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCCCCAAGGCG CAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTGAC AGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCCACCCAGCC CCTCACCCAGGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTG TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTG CTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCT GGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAC TACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCG CAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCG CAGCCTATCGCTCC
80	Secuencia de aminoácido del receptor PD1-PTM-CD28	MQIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR RNDSGTVLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVP TAHPSPPSPRAGQFQTLVVGVGGLLGSLVLLVWVLAV IRSKRSRL LHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AVRS
81	Secuencia de ácido nucleico del receptor	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGC GGTGCTACAAC TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAG ACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCTTCTCC

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	PD1-PTM-CD28	CCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCAC CTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCG TGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCCAGCAACCAGACG GACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCC CGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCA ACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGG CGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTC CCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCC ACAGCCCACCCCAGCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCA GTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGGGCGGCCTGC TGGGCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCCTGGCCGTC ATCAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTA CATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCA AGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCA GCCTATCGCTCC
82	Secuencia de aminoácido del receptor PD1A ^{132L} -PTM-CD28	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR RNDSGTVLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVP TAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVGGLLGSLVLLVWVLAV IRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFA AVRS
83	Secuencia de	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGC

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	ácido nucleico del receptor PD1 ^{A132L} _PTM-CD28	GGTGCTACAAC TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAG ACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCTTCTCC CCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCAC CTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCG TGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCCAGCAACCAGACG GACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCC CGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACTGCCCA ACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGG CGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTC CCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCC ACAGCCCACCCCAGCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCA GTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTCTGTGGGCGGCCTGC TGGGCAGCCTGGTGCTGCTAGTCTGGGTCCTGGCCGTC ATCAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTA CATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCA AGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCA GCCTATCGC
84	Secuencia de aminoácido del receptor PD-1-4-1BB (PD1- BB)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWF LDSPDRPWNPTFS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVP TAHPSPSPRPAGQFQTLVIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLYCKKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		EEEEGGCEL
85	Secuencia de ácido nucleico del receptor PD-1-4-1BB (PD1- BB)	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGC GGTGCTACAAC TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAG ACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCTTCTCC CCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCAC CTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCG TGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCCAGCAACCAGACG GACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCC CGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAAC TGCCCA ACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGG CGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTC CCTGGCCCCCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCC ACAGCCCACCCCAGCCCCCACCAGGCCAGCCGGCCA GTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGGGCGCCCTTGG CCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATC ACCTTTTACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAGAACTCCT GTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAA CTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
86	Secuencia de aminoácido del receptor PD1 ^{A132L} _4-1BB	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQT DKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR RNDSGTVLCGAISLAPKLQIKESLRAELRVTERRAEVP

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	(PD1*BB)	TAHPSPSPRPAGQFQTLVIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI TLVCKKRGRKKLLYIFKQPFMRPV QTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
87	Secuencia de ácido nucleico del receptor PD1 ^{A132L} _4-1BB (PD1*BB)	ATGCAGATCCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGC GGTGCTACAAC TGGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAG ACTCCCCAGACAGGCCCTGGAACCCCCCACCTTCTCC CCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACGCCAC CTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCG TGCTAAACTGGTACCGCATGAGCCCCAGCAACCAGACG GACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCC CGGCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAAC TGCCCA ACGGGCGTGACTTCCACATGAGCGTGGTCAGGGCCCCGG CGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTC CCTGGCCCCCAAGCTGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGG CAGAGCTCAGGGTGACAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCC ACAGCCCACCCAGCCCCCTACCCAGGCCAGCCGGCCA GTTCCAAACCCTGGTTATCTACATCTGGGCGCCCTTGG CCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATC ACCCTTTACTGCAAAAAACGGGGCAGAAAGAACTCCT GTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAA CTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCA GAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
88	Secuencia de aminoácido del	MEAAVAAPRPRLLLVLAAAAAAAAAALLPGATALQCFC HLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEID

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	receptor TGFβR-IL12Rβ1	LIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTTYCCNQDHCNKIELPTT VKSSPGLGPFVELAAVIAGPVCFVCISLMLMVYIRAARH LCPPLPTPCASSAIEFPGGKETWOWINPVDFQEEASLQ EALVVEMSWDKGERTEPLEKTELPEGAPELALDTELSL EDGDRCKAKM
89	Secuencia de ácido nucleico del receptor TGFβR-IL12Rβ1	ATGGAGGCGGCGGTGCTGCTCCGCGTCCCCGGCTGCT CCTCCTCGTGCTGGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG CGCTGCTCCCGGGGGCGACGGCGTTACAGTGTTCCTGC CACCTCTGTACAAAAGACAATTTTACTTGTGTGACAGA TGGGCTCTGCTTTGTCTCTGTACAGAGACCACAGACA AAGTTATACACAACAGCATGTGTATAGCTGAAATTGAC TTAATTCCCTCGAGATAGGCCGTTTGTATGTGCACCCTC TTCAAAAACCTGGGTCTGTGACTACAACATATTGCTGCA ATCAGGACCATTGCAATAAAATAGAACTTCCAACACT GTAAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCCTGTGGAAGTGGC AGCTGTCATTGCTGGACCAGTGTGCTTCGTCTGCATCT CACTCATGTTGATGGTCTATATCAGGGCCGCACGGCAC CTGTGCCCCGCGCTGCCCACACCCTGTGCCAGCTCCGC CATTGAGTTCCCTGGAGGGAAGGAGACTTGGCAGTGGA TCAACCCAGTGGACTTCCAGGAAGAGGCATCCCTGCAG GAGGCCCTGGTGGTAGAGATGTCCTGGGACAAAGGCGA GAGGACTGAGCCTCTCGAGAAGACAGAGCTACCTGAGG GTGCCCCCTGAGCTGGCCCTGGATACAGAGTTGTCCTTG GAGGATGGAGACAGGTGCAAGGCCAAGATG

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
90	Secuencia de aminoácido del receptor TGFβR-IL12Rβ2	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVOKSVNNDMIV TDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI CEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILE DAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFVÉA SEYNTSNPDLLLVIQVGTGISLLPPLGVAISVIIIFYQ QKVFVLLAALRPOWCSREIPDPANSTCAKKYPIAEKKT OLPLDRLLIDWPTPEDPEPLVISEVLHQVTPVFRHPPC SNWPQREKGIQGHQASEKDMMSASSPPPPRALQAESR QLVDLYKVLESRGSDPKPENPACPWTVLPA GDLP THDG YLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSL HPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML
91	Secuencia de ácido nucleico del receptor TGFβR-IL12Rβ2	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAGGGGCCTGTGGCCGCTGCA CATCGTCCTGTGGACGCGTATCGCCAGCACGATCCCAC CGCACGTT CAGAAGTCGGTTAATAACGACATGATAGTC ACTGACAACAACGGTGCA GTCAAGTTTCCACA ACTGTG TAAATTTTGTGATGTGAGATTTTCCACCTGTGACAACC AGAAATCCTGCATGAGCAACTGCAGCATCACCTCCATC TGTGAGAAGCCACAGGAAGTCTGTGTGGCTGTATGGAG AAAGAATGACGAGAACATAACACTAGAGACAGTTTGCC ATGACCCCAAGCTCCCCTACCATGACTTTATTCTGGAA GATGCTGCTTCTCCAAAGTGCATTATGAAGGAAAAAAA AAAGCCTGGTGAGACTTTCTTCATGTGTTCTGTAGCT CTGATGAGTGCAATGACAACATCATCTTCTCAGAAGAA TATAACACCAGCAATCCTGACTTGTTGCTAGTCATATT

Tabla 2		
SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TCAAGTGACAGGCATCAGCCTCCTGCCACCACTGGGAG TTGCCATATCTGTCATCATCATCTTCTACCAGCAAAAG GTGTTTGTTCCTAGCAGCCCTCAGACCTCAGTGGTG TAGCAGAGAAATTCCAGATCCAGCAAATAGCACTTGCG CTAAGAAATATCCCATTGCAGAGGAGAAGACACAGCTG CCCTTGACAGGCTCCTGATAGACTGGCCCACGCCTGA AGATCCTGAACCGCTGGTCATCAGTGAAGTCCTTCATC AAGTGACCCCAAGTTTTCAGACATCCCCCTGCTCCAAC TGGCCACAAAGGGAAAAAGGAATCCAAGGTCATCAGGC CTCTGAGAAAGACATGATGCACAGTGCCTCAAGCCCAC CACCTCCAAGAGCTCTCCAAGCTGAGAGCAGACAACTG GTGGATCTGTACAAGGTGCTGGAGAGCAGGGGCTCCGA CCCAAAGCCAGAAAACCCAGCCTGTCCCTGGACGGTGC TCCCAGCAGGTGACCTTCCCACCCATGATGGCTACTTA CCCTCCAACATAGATGACCTCCCCTCACATGAGGCACC TCTCGCTGACTCTCTGGAAGAACTGGAGCCTCAGCACA TCTCCCTTTCTGTTTTCCCTCAAGTTCTCTTCACCCA CTCACCTTCTCCTGTGGTGATAAGCTGACTCTGGATCA GTTAAAGATGAGGTGTGACTCCCTCATGCTC

B. Polipéptidos de unión al antígeno adicionales

[0197] En algunas modalidades, la célula T modificada expresa un polipéptido de unión al antígeno, un ligando del receptor de la superficie celular, o un polipéptido que se

une a un antígeno tumoral. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo que reconoce una proteína de la superficie celular o un receptor expresado en una célula tumoral. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo que reconoce un antígeno tumoral. En algunos casos, el dominio de unión al antígeno comprende un anticuerpo de longitud completa o un fragmento del mismo de unión al antígeno, un Fab, a $F(ab)_2$, un Fab_2 monoespecífico, un Fab_2 biespecífico, un Fab_2 triespecífico, un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), un diacuerpo, un triacuerpo, un minicuerpo, un V-NAR, o un VhH.

C. Ligandos del receptor de la superficie celular

[0198] En algunas modalidades, la célula T modificada expresa un ligando del receptor de la superficie celular. En algunos casos, el ligando se une a un receptor de la superficie celular expresado en una célula tumoral. En algunos casos, el ligando comprende una proteína de tipo silvestre o una variante de los mismos que se une al receptor de la superficie celular. En algunos casos, el ligando comprende una proteína de longitud completa o un fragmento funcional de la misma que se une al receptor de la superficie celular. En algunos casos, el fragmento funcional comprende aproximadamente 90%, aproximadamente 80%, aproximadamente 70%, aproximadamente 60%, aproximadamente 50%, o aproximadamente 40% de longitud comparado con la versión de longitud completa de la proteína pero retiene su unión al receptor de la

superficie celular. En algunos casos, el ligando es una proteína diseñada por ingeniería genética *de novo* que se une al receptor de la superficie celular. Ligandos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), o Wnt3A.

D. Antígenos Tumorales

[0199] En algunas modalidades, la célula T modificada expresa un polipéptido que se une a un antígeno tumoral. En algunos casos, el antígeno tumoral está asociado con una neoplasia maligna hematológica. Antígenos tumorales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, CD19, CD20, CD22, CD33/IL3Ra, ROR1, mesotelina, c-Met, PSMA, PSCA, receptor de Folato alfa, receptor de Folato beta, EGFRvIII, GPC2, Tn-MUC1, receptor alfa-4 de la familia GDNF (GFRa4), proteína de activación del fibroblasto (FAP), y IL13Ra2. En algunos casos, el antígeno tumoral comprende CD19, CD20, CD22, BCMA, CD37, Mesotelina, PSMA, PSCA, Tn-MUC1, EGFR, EGFRvIII, c-Met, HER1, HER2, CD33, CD133, GD2, GPC2, GPC3, NKG2D, KRAS, o WT1. En algunos casos, el polipéptido es un ligando del antígeno tumoral, *por ejemplo*, una proteína de longitud completa que se une al antígeno tumoral, un fragmento funcional de la misma, o un ligando diseñado por ingeniería genética *de novo* que se une al antígeno tumoral. En algunos casos, el polipéptido es un anticuerpo que se une al antígeno tumoral.

E. Receptores de Cambio y Receptores Negativos Dominantes

[0200] En un aspecto, la presente descripción también incluye una célula inmunitaria modificada con expresión del gen regulada negativamente como se describe en el presente documento además que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica un receptor negativo dominante, un receptor de cambio, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada con expresión del gen regulada negativamente como se describe en el presente documento comprende además un receptor de antígeno quimérico (CAR), y/o un receptor negativo dominante. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada con expresión del gen regulada negativamente como se describe en el presente documento comprende además a CAR, y un receptor de cambio. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada con expresión del gen regulada negativamente como se describe en el presente documento comprende además un TCR diseñado por ingeniería genética, y un receptor de cambio. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada con expresión del gen regulada negativamente como se describe en el presente documento comprende además un TCR diseñado por ingeniería genética, y un receptor negativo dominante. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada con expresión del gen regulada negativamente como se describe en el presente documento comprende además un KIR, y un receptor de cambio. En algunas modalidades, la célula inmunitaria

modificada con expresión del gen regulada negativamente como se describe en el presente documento comprende además un KIR, y un receptor negativo dominante.

1. Receptor de Cambio

[0201] La presente invención proporciona composiciones y métodos para células inmunitarias modificadas o precursores de las mismas con expresión del gen regulada negativamente que comprenden un CAR y un receptor de cambio. Las células tumorales generan un microambiente inmunosupresor que sirve para protegerlas del reconocimiento y eliminación inmune. Este microambiente inmunosupresor puede limitar la eficacia de las terapias inmunosupresoras tal como la terapia con células CAR-T o TCR-T. Por ejemplo, la citosina secretada, el Factor de Crecimiento de Transformación β (TGF β), inhibe directamente la función de las células T citotóxicas y adicionalmente induce la formación de células T reguladoras para suprimir además las respuestas inmunes. La inmunosupresión de células T debido a TGF β en el contexto de cánceres de próstata se ha demostrado previamente por Donkor et al (2011), y Shalapour et al (2015). Para reducir los efectos inmunosupresores del TGF en las células inmunitarias, se puede modificar para expresar un TGF β R diseñado por ingeniería genética que comprende el dominio de unión al ligando extracelular del TGF β R fusionado al dominio de señalización intracelular de, por ejemplo, el receptor de interleucina-12 (IL12R; TGF β R-IL12R). Por lo tanto, una

célula inmunitaria modificada que comprende un receptor de cambio puede unirse a una molécula de transducción de señales negativas en el microambiente de la célula inmunitaria modificada, y convertir la señal de transducción de señales negativas que una molécula inhibidora puede tener en la célula inmunitaria modificada en una señal positiva que estimula la célula inmunitaria modificada. Se puede diseñar un receptor de cambio de la presente invención para reducir los efectos de una molécula de transducción de señales negativas, o para convertir la señal negativa en una señal positiva, en virtud de que comprende un dominio intracelular asociado con la señal positiva.

[0202] De este modo, en algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada que comprende una inserción y/o supresión en uno o más loci del gen que codifica una proteína inmune endógena ha sido además genéticamente modificada para expresar un receptor de cambio. Como se usa en el presente documento, el término "receptor de cambio" se refiere a una molécula diseñada para reducir el efecto de una molécula de transducción de señal negativa en una célula inmunitaria modificada de la presente invención. El receptor de cambio comprende: un primer dominio que se deriva de un primer polipéptido que está asociado con una señal negativa (una transducción de señal que suprime o inhibe una célula o activación de célula T); y un segundo dominio que se deriva de un segundo polipéptido que está asociado con una señal

positiva (una señal de transducción de señal que estimula una célula o una célula T). En algunas modalidades, la proteína asociada con la señal negativa se selecciona a partir del grupo que consiste de CTLA4, PD-1, TGF β RII, BTLA, VSIG3, VSIG8, y TIM-3. En algunas modalidades, la proteína asociada con la señal positiva se selecciona a partir del grupo que consiste de CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS, y CD27.

[0203] En una modalidad, el primer dominio comprende al menos una porción del dominio extracelular del primer polipéptido que está asociado con una señal negativa, y el segundo dominio comprende al menos una porción del dominio intracelular del segundo polipéptido que está asociado con una señal positiva. Como tal, un receptor de cambio comprende un dominio extracelular asociado con una señal negativa fusionada a un dominio intracelular asociado con una señal positiva. En algunas modalidades, el receptor de cambio comprende un dominio extracelular de una proteína de señalización asociada con una señal negativa, un dominio de la transmembrana, y un dominio intracelular de una proteína de señalización asociada con una señal positiva. En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana del receptor de cambio se selecciona a partir de la transmembrana de la proteína asociada con una señal negativa o el dominio de la transmembrana de la proteína asociada con la señal negativa. En algunas modalidades, el dominio de la transmembrana del receptor de cambio se selecciona a partir de un dominio de la

transmembrana de una proteína seleccionada a partir del grupo que consiste de CTLA4, PD-1, VSIG3, VSIG8, TGF β RII, BTLA, TIM-3, CD28, 4-1BB, IL12R β 1, IL12R β 2, CD2, ICOS, y CD27.

[0204] En algunas modalidades, el receptor de cambio se selecciona a partir del grupo que consiste de PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β RII-CD27, TGF β RII-CD28, TGF β RII-4-1BB, TGF β RII-ICOS, TGF β RII-IL12R β 1, y TGF β RII-IL12R β 2.

[0205] En algunas modalidades, el receptor de cambio es PD-1-CD28 y comprende una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 78. En unas modalidades, el receptor de cambio es PD-1^{A132L}-CD28 y comprende una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 82. En unas modalidades, el receptor de cambio es PD-1-4-1BB y comprende una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 84. En unas modalidades, el receptor de cambio es PD-1^{A132L}-4-1BB y comprende una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 86. En unas modalidades, el receptor de cambio es TGF β RII-IL12R β 1 y comprende una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 88. En unas modalidades, el receptor de cambio es TGF β RII-IL12R β 2 y comprende una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 90. En unas modalidades, el

receptor de cambio es codificado en una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 79, 81, 83, 85, 87, 89, o 91.

[0206] Variaciones tolerables del receptor de cambio serán conocidas por aquellos expertos en la técnica, mientras mantiene su actividad biológica propuesta (*por ejemplo*, convertir una señal negativa en una señal positiva cuando se expresa en una célula). Por consiguiente, en algunas modalidades, el receptor de cambio de la presente invención puede ser codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 79, 81, 83, 85, 87, 89, o 91. En algunas modalidades, el receptor de cambio de la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 78, 80, 82, 84, 86, 88, o 90.

[0207] En algunas modalidades, la célula inmunitaria

modificada comprende una inserción y/o supresión que es capaz de regular negativamente CD3, B2M, y CIITA, un CAR, y receptor de cambio seleccionado a partir del grupo que consiste de PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β RII-CD27, TGF β RII-CD28, TGF β RII-4-1BB, TGF β RII-ICOS, TGF β RII-IL12R β 1, y TGF β RII-IL12R β 2. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada comprende una inserción y/o supresión en uno o más loci del gen que codifica cada uno una proteína inmune endógena seleccionada a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos, un CAR, y un receptor de cambio seleccionado a partir del grupo que consiste de PD-1-CD28, PD-1^{A132L}-CD28, PD-1-CD27, PD-1^{A132L}-CD27, PD-1-4-1BB, PD-1^{A132L}-4-1BB, PD-1-ICOS, PD-1^{A132L}-ICOS, PD-1-IL12R β 1, PD-1^{A132L}-IL12R β 1, PD-1-IL12R β 2, PD-1^{A132L}-IL12R β 2, VSIG3-CD28, VSIG8-CD28, VSIG3-CD27, VSIG8-CD27, VSIG3-4-1BB, VSIG8-4-1BB, VSIG3-ICOS, VSIG8-ICOS, VSIG3-IL12R β 1, VSIG8-IL12R β 1, VSIG3-IL12R β 2, VSIG8-IL12R β 2, TGF β RII-CD27, TGF β RII-CD28, TGF β RII-4-1BB, TGF β RII-ICOS, TGF β RII-IL12R β 1, y TGF β RII-IL12R β 2.

2. Receptor Negativo Dominante

[0208] La presente invención proporciona composiciones y métodos para células inmunitarias modificadas o precursores de las mismas con expresión del gen regulada negativamente que comprende un CAR y un receptor negativo dominante. De este modo, en algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada que comprende una inserción y/o supresión en uno o más loci del gen que codifica una proteína inmune endógena ha sido además modificada genéticamente para expresar un receptor negativo dominante. Como se usa en el presente documento, el término "receptor negativo dominante" se refiere a una molécula diseñada para reducir el efecto de una molécula de transducción de señal negativa (*por ejemplo*, el efecto de una molécula de transducción de señal negativa en una célula inmunitaria modificada de la presente invención). Un receptor negativo dominante es una variante truncada de una proteína de tipo silvestre asociada con una señal negativa. En algunas modalidades, la proteína asociada con una señal negativa la proteína asociada con la señal negativa se selecciona a partir del grupo que consiste de CTLA4, PD-1, BTLA, TGF β RII, VSIG3, VSIG8, y TIM-3.

[0209] Un receptor negativo dominante de la presente invención puede unirse a una molécula de transducción de señal negativa (*por ejemplo*, CTLA4, PD-1, BTLA, TGF β RII, VSIG3, VSIG8, y TIM-3) en virtud de un dominio extracelular asociado con la señal negativa, puede reducir el efecto de la molécula de transducción de señal negativa. Por ejemplo, una

célula inmunitaria modificada que comprende un receptor negativo dominante puede unirse una molécula de transducción de señal negativa en el entorno de la célula inmunitaria modificada, pero esta unión no transducirá esta señal dentro de la célula para modificar la actividad de la célula T modificada. Preferiblemente, la unión secuestra la molécula de transducción de señal negativa y previene su unión al receptor/ligando endógeno, de este modo reduciendo el efecto que la molécula de transducción de señal negativa puede tener en la célula inmunitaria modificada. Como tal, para reducir los efectos inmunosupresores de cierta molécula, las células inmunitarias pueden ser modificadas para expresar un receptor negativo dominante que es un receptor negativo dominante.

[0210] En algunas modalidades, el receptor negativo dominante comprende una variante truncada de una proteína de tipo silvestre asociada con una señal negativa. En algunas modalidades, el receptor negativo dominante comprende una variante de una proteína de tipo silvestre asociada con una señal negativa que comprende un dominio extracelular, un dominio de la transmembrana, y que carece sustancialmente de un dominio de señalización intracelular. En algunas modalidades, el receptor negativo dominante comprende un dominio extracelular de una proteína de señalización asociada con una señal negativa, y un dominio de la transmembrana. En algunas modalidades, el receptor negativo dominante es PD-1, CTLA4, BTLA, TGF β R11, VSIG3, VSIG8, o TIM-3 receptor negativo

dominante. En algunas modalidades, el receptor negativo dominante es PD-1, o TGF β RII. En algunas modalidades, el TGF β RII comprende una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 76. En algunas modalidades, el TGF β RII es codificado por una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 77.

[0211] Variaciones tolerables del receptor negativo dominante ser conocerán por aquellos de habilidad en la técnica, mientras mantiene su actividad biológica propuesta (*por ejemplo*, bloqueando una señal negativa y/o secuestrando una molécula que tiene una señal negativa cuando se expresa en una célula). Por consiguiente, en algunas modalidades, el receptor negativo dominante de la presente invención puede ser codificado por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 77. En algunas modalidades, el receptor negativo dominante de la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácido que tiene al menos al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al

menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 76.

F. Quimiocina y Citocina como Factores de Mejoramiento Inmune para la Aptitud Mejorada

[0212] La presente invención proporciona composiciones y métodos para células inmunitarias modificadas con expresión del gen inmune regulado negativamente que comprende un CAR, y además que comprende un receptor negativo dominante, un receptor de cambio, una quimiocina, un receptor de quimiocina, una citocina, un receptor de citocina, Interleucina-7 (IL-7), receptor de Interleucina-7 (IL-7R), Interleucina-15 (IL-15), receptor de Interleucina-15 (IL-15R), Interleucina-21 (IL-21), Interleucina-18 (IL-18), CCL21, CCL19, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, una quimiocina, un receptor de quimiocina, una citocina, un receptor de citocina, IL-7, IL-7R, IL-15, IL-15R, IL-21, IL-18, Ligando 21 de Quimiocina de la Porción C-C (CCL21), o Ligando 19 de Quimiocina de la Porción C-C (CCL19) es un factor de mejoramiento de la función inmune que mejora el estado físico de la célula inmunitaria modificada reivindicada. Sin desear ser ligado por teoría, la adición de una quimiocina, un receptor de quimiocina, una citocina, un receptor de citocina, IL-7, IL-7R, IL-15, IL-15R, IL-21, IL-18, CCL21, o CCL19 a la célula inmunitaria modificada mejora el efecto que

induce inmunidad y actividad antitumoral de la célula inmunitaria modificada.

[0213] Sin desear ser ligado por teoría, las interleucinas y quimiocinas, pueden promover un aumento del cebado de células T y/o la infiltración de células T en un tumor sólido. Por ejemplo, en los cánceres colorrectales estables de microsatélites (CCR) con baja infiltración de células T, la IL-15 promueve la cebación de células T. En algunas modalidades, la combinación de un CAR y un complejo de quimiocina/receptor de interleucina promueve la cebación de células T. Más aún, la IL-15 puede inducir infiltración de células NK. En algunas modalidades, la respuesta a un complejo IL-15/IL-15RA puede resultar en la infiltración de células NK. En ciertas modalidades, la célula inmunitaria modificada descrita en el presente documento comprende además un complejo de IL-15/IL-15Ra. En algunas modalidades, el complejo IL-15/IL-15Ra se elige a partir de NIZ985 (Novartis), ATL-803 (Altor) o CYP0150 (Cytune). En algunas modalidades, el complejo IL-15/IL-15RA es NIZ985. En algunas modalidades, la IL-15 estimula las células Asesinas Naturales para eliminar (*por ejemplo, asesinar*) las células de cáncer pancreático. En algunas modalidades, la respuesta terapéutica a una célula inmunitaria modificada descrita en el presente documento que comprende además IL-15/IL15Ra está asociada con la infiltración de células Asesinas Naturales en un modelo animal de cáncer colorrectal. En algunas

modalidades, el complejo de IL-15/IL-15Ra comprende IL-15 humana formada en complejo con una forma soluble de IL-15a humana. El complejo puede comprender IL-15 unido covalentemente o no covalentemente a una forma soluble de IL-15Ra. En una modalidad particular, la IL-15 humana no está covalentemente unida a una forma soluble de IL-15Ra.

[0214]

La ineficacia de la terapia con células T con CAR contra tumores sólidos se debe en parte al reclutamiento y acumulación limitados de células inmunitarias y células T con CAR en tumores sólidos. Un procedimiento para resolver este problema es diseñar por ingeniería genética células T con CAR que imiten la función de las células reticulares fibroblásticas (FRC) de la zona T. El ganglio linfático es responsable de detectar patógenos e inmunógenos. La zona T contiene tres tipos de células: (1) células de inmunidad innata tales como células dendríticas, monocitos, macrófagos y granulocitos; (2) células de inmunidad adaptativa, tales como los linfocitos CD4 y CD8, y (3) células estromales (FRC). Estas células cooperan para generar una respuesta inmune efectiva contra un patógeno al facilitar la activación, diferenciación y maduración de las células T CD4. Las FRC son particularmente importantes porque forman una red que permite que las células dendríticas y las células T viajen por todo el ganglio linfático y atraen a las células B. En particular, las FRC proporcionan una red para: (i) el reclutamiento de células T, células B, y células

dendríticas sin tratamiento previo en el ganglio linfático mediante la liberación de dos quimiocinas (CCL21 y CCL19); (ii) supervivencia de células T mediante la secreción de IL-7, que es un factor de supervivencia particularmente para células T sin tratamiento previo; y (iii) tráfico de células T CD4 hacia el centro germinal (GC; una parte diferente del ganglio linfático). Por consiguiente, el CAR blindado con CCL21 exógeno, o CCL19 e IL-7, mejorará el reclutamiento de células T, células B, y células dendríticas en tumores sólidos. En algunas modalidades, la célula T modificada comprende un ácido nucleico que codifica un factor potenciador de la función inmune, en donde el ácido nucleico que codifica un factor potenciador de la función inmune es un ácido nucleico que codifica interleucina-7 y un ácido nucleico que codifica CCL19 o CCL21.

[0215] En algunas modalidades, el ácido nucleico del factor de mejoramiento de la función inmune (es decir, quimiocina, el receptor de quimiocina, la citosina, el receptor de citocina, IL-7, IL-7R, IL-15, IL-15R, IL-21, IL-18, CCL21, o CCL19) es fusionado a un CAR. En algunas modalidades, la quimiocina, el receptor de quimiocina, la citocina, el receptor de citocina, IL-7, IL-7R, IL-15, IL-15R, IL-21, IL-18, CCL21, o CCL19 es fusionado a un CAR mediante un péptido de auto-escisión, tal como un P2A, un T2A, un E2A, o un F2A.

VI. MÉTODOS PARA GENERAR UNA CÉLULA T MODIFICADA

[0216]

Un aspecto de la presente invención proporciona un método para generar una célula inmunitaria modificada (*por ejemplo*, una célula T alogeneica, célula NK, o célula NKT). La célula inmunitaria modificada de la presente invención es en general diseñada por ingeniería genética mediante (1) introducir en la célula inmunitaria uno o más ácidos nucleicos capaces de regular negativamente la expresión del gen de uno o más genes inmunes endógenos que codifican una proteína inmune endógena; (2) introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico exógeno que codifica un receptor diseñado por ingeniería genética; y (3) expandir la célula inmunitaria modificada para generar células T inmunitarias modificadas. Tal célula inmunitaria modificada puede ser incluida en una composición terapéutica y administrada a un paciente en necesidad de la misma.

[0217]

En algunas modalidades, un método para generar una célula inmunitaria modificada de la presente invención comprende introducir en la célula inmunitaria uno o más ácidos nucleicos capaces de regular negativamente la expresión del gen de uno o más genes inmunes endógenos. Uno o más genes inmunes codifican una proteína inmune endógena seleccionada a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). Además, introduciendo en la célula inmunitaria un ácido nucleico exógeno que codifica un receptor de antígeno

quimérico (CAR), un receptor de células T diseñado por ingeniería genética (TCR), un receptor similar a inmunoglobulina de células Asesinas (KIR), un polipéptido de unión al antígeno, un ligando del receptor de la superficie celular, o un antígeno tumoral es también introducido en la célula inmunitaria. En algunas modalidades, el método comprende además introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico exógeno que codifica un receptor negativo dominante, un receptor de cambio, o una combinación de los mismos.

A. Método para Introducir Ácido Nucleico en una Célula

[0218] Los métodos para introducir ácidos nucleicos en una célula incluyen métodos físicos, biológicos y químicos. Los métodos físicos para introducir un polinucleótido, tal como ARN, en una célula hospedera incluyen precipitación con fosfato cálcico, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. El ARN se puede introducir en células objetivo usando métodos disponibles comercialmente que incluyen electroporación (Amaza Nucleofector-II (Amaza Biosystems, Colonia, Alemania)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, MA) o Gene Pulser II (BioRad, Denver, CO), Multiporator (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El ARN también se puede introducir en células usando transfección mediada por liposomas catiónicos usando lipofección, usando encapsulación de polímero, usando transfección mediada por péptidos o usando sistemas de administración de partículas

biolísticas tales como "pistolas genéticas".

1. Métodos Biológicos

[0219] Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedera (*por ejemplo*, una célula inmunitaria) incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más utilizado para insertar genes en mamíferos (*por ejemplo*, células humanas). Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados, y similares. Véase *por ejemplo*, Patentes Estadounidenses Nos. 5,350,674 y 5,585,362.

[0220] En algunas modalidades, un ácido nucleico que codifica un CAR objetivo, un TCR objetivo diseñado por ingeniería genética, un KIR objetivo, un polipéptido objetivo de unión al antígeno, un receptor objetivo del ligando de la superficie celular, un antígeno tumoral objetivo, un receptor objetivo de cambio, y/o un receptor objetivo negativo dominante de la invención es introducido en una célula por un vector de expresión. Vectores de expresión que comprenden un ácido nucleico que codifica un CAR objetivo, un TCR objetivo diseñado por ingeniería genética, un KIR objetivo, un polipéptido objetivo de unión al antígeno, un receptor objetivo del ligando de la superficie celular, un antígeno tumoral objetivo, un receptor objetivo de cambio, y/o un receptor objetivo negativo

dominante se proporcionan en el presente documento. Vectores de expresión adecuados incluyen vectores de lentivirus, vectores de retrovirus gamma, vectores de virus espumosos, vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores de adenovirus, virus híbridos modificados genéticamente, ADN desnudo, incluidos, pero no limitados a, vectores mediados por transposones, tales como Sleeping Beauty, Piggyback e Integrinas tales como Phi31. Algunos otros vectores de expresión adecuados incluyen vectores de expresión del virus del herpes simple (HSV) y retrovirus.

[0221] Los vectores de expresión de adenovirus se basan en adenovirus, que tienen una baja capacidad de integración en el ADN genómico pero una alta eficiencia para transfectar células hospedera. Los vectores de expresión de adenovirus contienen secuencias de adenovirus suficientes para: (a) soportar el empaquetado del vector de expresión y (b) expresar finalmente el CAR objetivo, el TCR diseñado por ingeniería genética, el KIR objetivo, el polipéptido objetivo de unión al antígeno, el receptor del ligando de la superficie celular objetivo, el antígeno tumoral objetivo, el receptor de cambio objetivo, y/o el receptor negativo dominante objetivo en la célula hospedera. En algunas modalidades, el genoma de adenovirus es un ADN de doble hebra, lineal de 36 kb, donde una secuencia de ADN extraña, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un CAR objetivo, un TCR objetivo diseñado por ingeniería genética,

un KIR objetivo, un polipéptido objetivo de unión al antígeno, un receptor objetivo del ligando de la superficie celular, un antígeno tumoral objetivo, un receptor objetivo de cambio, y/o un receptor objetivo negativo dominante puede ser insertada para sustituir grandes piezas de ADN adenoviral con el fin de hacer el vector de expresión de la presente invención.

[0222] Otro vector de expresión se basa en un virus adenoasociado, que aprovecha los sistemas acoplados a adenovirus. Este vector de expresión de AAV tiene una alta frecuencia de integración en el genoma del hospedero. Puede infectar células que no se dividen, lo que lo hace útil para la administración de genes a células de mamíferos, por ejemplo, en cultivos de tejidos o *in vivo*. El vector AAV tiene una amplia gama de hospederos para su infectividad. Los detalles relativos a la generación y uso de vectores AAV se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,139,941 y 4,797,368.

[0223] Los vectores de expresión de retrovirus son capaces de integrarse en el genoma del hospedero, suministrar una gran cantidad de material genético extraño, infectar un amplio espectro de especies y tipos de células y empaquetarse en líneas celulares especiales. El vector de retrovirus es construido insertando un ácido nucleico (*por ejemplo*, un ácido nucleico que codifica un CAR objetivo, un TCR objetivo diseñado por ingeniería genética,

un KIR objetivo, un polipéptido objetivo de unión al antígeno, un receptor objetivo del ligando de la superficie celular, un antígeno tumoral objetivo, un receptor objetivo de cambio, y/o un receptor objetivo negativo dominante) en el genoma viral en ciertas ubicaciones para producir un virus que es defectivo de replicación. Aunque los vectores de retrovirus son capaces de infectar una amplia variedad de tipos celulares, integración y expresión estable del CAR objetivo, el TCR diseñado por ingeniería genética objetivo, el KIR objetivo, el polipéptido objetivo de unión al antígeno, el receptor del ligando de la superficie celular objetivo, el antígeno tumoral objetivo, el receptor de cambio objetivo, y/o el receptor negativo dominante objetivo, requiere la división de células hospederas.

[0224] Los vectores de lentivirus se derivan de lentivirus, que son retrovirus complejos que, además de los genes retrovirales comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Véase, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 6,013,516 y 5,994, 136. Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de la inmunodeficiencia humana (HTV-1, HTV-2) y el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV). Los vectores de lentivirus se han generado mediante la atenuación múltiple de los genes de virulencia del HIV; por ejemplo, los genes env, vif, vpr, vpu y nef se suprimen, lo que hace que el vector sea biológicamente seguro. Los vectores de lentivirus son

capaces de infectar células sin división y pueden ser usados para tanto transferencia como expresión del gen *in vivo* y *ex vivo* de un ácido nucleico que codifica un CAR objetivo, un TCR objetivo diseñado por ingeniería genética, un KIR objetivo, un polipéptido objetivo de unión al antígeno, un receptor objetivo del ligando de la superficie celular, un antígeno tumoral objetivo, un receptor objetivo de cambio, y/o un receptor objetivo negativo dominante. Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,994,136.

[0225] Los vectores de expresión que incluyen un ácido nucleico de la presente descripción se pueden introducir en una célula hospedera mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias virales para transfección, si se desea. Alternativamente, los vectores de expresión pueden introducirse mediante fusión, electroporación, biolística, transfección, lipofección o similares. La célula hospedera (*por ejemplo*, célula inmunitaria) puede crecer y expandirse en cultivo antes de la introducción de los vectores de expresión, seguido del tratamiento apropiado para la introducción e integración de los vectores. Las células hospederas (*por ejemplo*, células inmunitarias) se expanden después y pueden examinarse en virtud de un marcador presente en los vectores. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos, que codifican un CAR objetivo, un TCR objetivo diseñado por ingeniería genética,

un KIR objetivo, un polipéptido objetivo de unión al antígeno, un receptor objetivo del ligando de la superficie celular, un antígeno tumoral objetivo, un receptor objetivo de cambio, y/o un receptor objetivo negativo dominante, se introducen en la célula inmunitaria mediante transducción viral. En algunas modalidades, la transducción viral comprende poner en contacto la célula inmunitaria con un vector viral que comprende uno o más ácidos nucleicos. En algunas modalidades, el vector viral se selecciona a partir del grupo que consiste de un vector retroviral, vectores virales sendai, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, y vectores lentivirales. Se conocen en la técnica varios marcadores que pueden usarse y pueden incluir hp^rt, resistencia a neomicina, timidina cinasa, resistencia a higromicina, etc. Como se usan en el presente documento, los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" pueden ser usados indistintamente. En algunas modalidades, la célula hospedera es una célula inmunitaria o un precursor de la misma. En algunas modalidades, las células genéticamente modificadas son linfocitos T genéticamente modificados (células T), células T sin tratamiento previo (TN), células T de memoria (por ejemplo, células T de memoria central (TCM), células de memoria efectoras (TEM)), células naturales células asesinas (células NK) y macrófagos capaces de dar lugar a una progenie terapéuticamente relevante, En algunas modalidades, la célula hospedera es una célula T, una célula NK, o una célula NKT.

En algunas modalidades, la célula inmunitaria se selecciona a partir del grupo que consiste de una célula T, una célula asesina natural (célula NK), una célula T asesina natural, una célula progenitora linfoide, una célula troncal hematopoyética, una célula troncal, un macrófago, y una célula dendrítica. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula T CD4+ o célula T CD8+. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula T alogeneica o célula T autóloga. En algunas modalidades, la célula T alogeneica o célula T autóloga es humana.

[0226] Las células inmunitarias modificadas de la presente invención (*por ejemplo*, que comprenden un ácido nucleico capaz de regular negativamente un gen, CAR, un KIR, un TCR, un receptor negativo dominante, y/o receptor de cambio) puede ser producido transfectando establemente células hospederas (*por ejemplo*, células inmunitarias) con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico de la presente descripción. Los métodos adicionales para generar una célula modificada de la presente descripción incluyen, sin limitación, métodos de transformación química (*por ejemplo*, usando fosfato cálcico, dendrímeros, liposomas y/o polímeros catiónicos), métodos de transformación no química (*por ejemplo*, electroporación, transformación óptica, genes electrotransferencia y/o suministro hidrodinámico) y/o métodos basados en partículas (*por ejemplo*, impalefección, uso de una pistola genética y/o magnetofección). Las células

transfectadas (es decir, células inmunitarias) que expresan un ácido nucleico capaz de regular negativamente un gen, CAR, un KIR, un TCR, un receptor negativo dominante, y/o receptor de cambio de la presente descripción pueden ser expandidas *ex vivo*.

2. Métodos Físicos

[0227] Los métodos físicos para introducir un vector de expresión en células hospederas incluyen precipitación con fosfato cálcico, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que incluyen vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001).

3. Métodos Químicos

[0228] Los métodos químicos para introducir un vector de expresión en una célula hospedera incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedera incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos que

incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para uso como vehículo de suministro *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (*por ejemplo*, una vesícula de membrana artificial).

[0229] Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedera o exponer de otro modo una célula al inhibidor de la presente invención, para confirmar la presencia de los ácidos nucleicos en la célula hospedera se pueden realizar varios ensayos. Tales ensayos incluyen, *por ejemplo*, ensayos de biología molecular bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como transferencias Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos bioquímicos, tales como detectar la presencia o ausencia de un péptido particular (*por ejemplo*, medios inmunológicos (ELISA y transferencias Western) o mediante ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que caen dentro del alcance de la invención.

[0230] Sin embargo, los ácidos nucleicos pueden introducirse por cualquier medio, tal como transducir las células hospederas expandidas (*por ejemplo*, células inmunitarias), transfectar las células hospederas expandidas (*por ejemplo*, células inmunitarias) y electroporar las células hospederas expandidas (*por ejemplo*, células inmunitarias). Se puede introducir un ácido nucleico mediante un método y se puede introducir otro ácido nucleico en la

célula hospedera (*por ejemplo*, células inmunitarias) mediante un método diferente.

4. ARN

[0231] En una modalidad, los ácidos nucleicos introducidos en la célula hospedera (*por ejemplo*, célula inmunitaria) son ARN. En otra modalidad, el ARN es ARNm que comprende ARN transcrito *in vitro* o ARN sintético. El ARN se produce mediante transcripción *in vitro* utilizando una plantilla generada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de interés de cualquier fuente se puede convertir directamente mediante PCR en una plantilla para la síntesis de ARNm *in vitro* utilizando cebadores y ARN polimerasa adecuados. La fuente del ADN puede ser ADN genómico, ADN plasmídico, ADN de fago, ADNc, secuencia de ADN sintético o cualquier otra fuente apropiada de ADN.

[0232] La PCR se puede utilizar para generar una plantilla para la transcripción *in vitro* de ARNm que luego se introduce en las células. Los métodos para realizar la PCR son bien conocidos en la técnica. Los cebadores para uso en PCR están diseñados para tener regiones que son sustancialmente complementarias a regiones del ADN que se usarán como plantilla para la PCR. Como se utiliza en el presente documento, "sustancialmente complementaria" se refiere a secuencias de nucleótidos en las que la mayoría o todas las bases en la secuencia del cebador son complementarias, o una o más bases no son complementarias o

no apareadas. Las secuencias sustancialmente complementarias son capaces de templarse o hibridarse con el objetivo de ADN deseado bajo las condiciones de apareamiento utilizadas para la PCR. Los cebadores pueden diseñarse para que sean sustancialmente complementarios a cualquier porción de la plantilla de ADN. Por ejemplo, los cebadores pueden diseñarse para amplificar la porción de un gen que normalmente se transcribe en las células (el marco de lectura abierto), incluidas las UTR 5' y 3'. Los cebadores también pueden diseñarse para amplificar una porción de un gen que codifica un dominio de interés particular. En una modalidad, los cebadores están diseñados para amplificar la región codificante de un ADNc humano, incluyendo todas o partes de las UTR 5' y 3'. Los cebadores útiles para la PCR se generan mediante métodos sintéticos que son bien conocidos en la técnica. Los "cebadores delanteros" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a los nucleótidos en la plantilla de ADN que están corriente arriba de la secuencia de ADN que se va a amplificar. "Corriente arriba" se utiliza en el presente documento para referirse a una ubicación 5', a la secuencia de ADN que se va a amplificar con respecto a la cadena codificante. Los "cebadores inversos" son cebadores que contienen una región de nucleótidos que son sustancialmente complementarios a una plantilla de ADN de cadena doble que se encuentran corriente abajo de la secuencia de ADN que se va a

amplificar. "Corriente abajo" se utiliza en el presente documento para referirse a una ubicación 3' de la secuencia de ADN que se va a amplificar con respecto a la cadena codificante.

[0233] También se pueden usar estructuras químicas que tienen la capacidad de promover la estabilidad y/o la eficiencia de la traducción del ARN. El ARN tiene preferiblemente UTR 5' y 3'. En una modalidad, la UTR 5' tiene una longitud de entre cero y 3000 nucleótidos. La longitud de las secuencias UTR 5' y 3' que se agregarán a la región codificante se puede alterar mediante diferentes métodos, incluido, pero no limitado a, el diseño de cebadores para PCR que se hibridan con diferentes regiones de las UTR. Usando este procedimiento, un experto en la técnica puede modificar las longitudes de UTR 5' y 3' requeridas para lograr una eficiencia de traducción óptima después de la transfección del ARN transcrito.

[0234] Las UTR 5' y 3' pueden ser las UTR 5' y 3' endógenas y de origen natural para el gen de interés. Alternativamente, se pueden agregar secuencias UTR que no son endógenas al gen de interés incorporando las secuencias UTR en los cebadores directos e inversos o mediante cualquier otra modificación de la plantilla. El uso de secuencias UTR que no son endógenas del gen de interés puede ser útil para modificar la estabilidad y/o la eficiencia de la traducción del ARN. Por ejemplo, se sabe que

los elementos ricos en AU en secuencias 3'UTR pueden disminuir la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, las UTR 3' pueden seleccionarse o diseñarse para aumentar la estabilidad del ARN transcrito basándose en propiedades de las UTR que son bien conocidas en la técnica.

[0235] En una modalidad, la 5' UTR puede contener la secuencia Kozak del gen endógeno. Alternativamente, cuando se añade mediante PCR una UTR 5' que no es endógena al gen de interés como se describe anteriormente, se puede rediseñar una secuencia Kozak consenso añadiendo la secuencia UTR 5'. Las secuencias de Kozak pueden aumentar la eficiencia de la traducción de algunas transcripciones de ARN, pero no parecen ser necesarias para que todos los ARN permitan una traducción eficiente. El requisito de secuencias Kozak para muchos ARNm se conoce en la técnica. En otras modalidades, la 5' UTR puede derivarse de un virus de ARN cuyo genoma de ARN es estable en las células. En otras modalidades, se pueden usar varios análogos de nucleótidos en la UTR 3' o 5' para impedir la degradación por exonucleasa del ARNm.

[0236] Para permitir la síntesis de ARN a partir de una plantilla de ADN sin necesidad de clonación genética, se debe unir un promotor de transcripción a la plantilla de ADN corriente arriba de la secuencia que se va a transcribir. Cuando se añade una secuencia que funciona como promotor de una ARN polimerasa al extremo 5' del cebador

directo, el promotor de la ARN polimerasa se incorpora al producto de la PCR corriente arriba del marco de lectura abierto que se va a transcribir. En una modalidad, el promotor es un promotor de la polimerasa T7, como se describe en otra parte del presente documento. Otros promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, promotores de ARN polimerasa T3 y SP6. Se conocen en la técnica secuencias de nucleótidos consensuadas para los promotores T7, T3 y SP6.

[0237] En una modalidad, tiene un casquete en el extremo 5' y una cola poli(A) en 3' que determinan la unión al ribosoma, el inicio de la traducción y la estabilidad del ARNm en la célula. En una plantilla de ADN circular, por ejemplo, ADN plasmídico, la ARN polimerasa produce un producto de cadena sencilla largo que no es adecuado para la expresión en células eucariotas. La transcripción del ADN plasmídico linealizado al final de la UTR 3' da como resultado un ARNm de tamaño normal que no es eficiente en la transfección eucariota incluso si está poliadenilado después de la transcripción. En una plantilla de ADN lineal, la ARN polimerasa del fago T7 puede extender el extremo 3' del transcrito más allá de la última base de la plantilla (Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem, 270: 1485-65 (2003)).

[0238] El método convencional de integración de tramos poliA/T en una plantilla de ADN es la

clonación molecular. Sin embargo, la secuencia poliA/T integrada en el ADN plasmídico puede provocar inestabilidad del plásmido, razón por la cual las plantillas de ADN plasmídico obtenidas de células bacterianas típicamente están muy contaminadas con supresiones y otras aberraciones. Esto hace que los procedimientos de clonación no sólo sean laboriosos y consuman mucho tiempo, sino que a menudo no sean confiables. Es por eso que es muy deseable un método que permita el constructo de plantillas de ADN con estiramiento 3' poliA/T sin clonación. El segmento poliA/T de la plantilla de ADN transcripcional se puede producir durante la PCR usando un cebador inverso que contiene una cola poliT, tal como una cola 100T (el tamaño puede ser 50-5000 T), o después de la PCR mediante cualquier otro método, incluyendo, pero sin limitarse a, ligadura de ADN o recombinación *in vitro*. Las colas de poli(A) también proporcionan estabilidad a los ARN y reducen su degradación. En general, la longitud de una cola poli(A) se correlaciona positivamente con la estabilidad del ARN transcrito. En una modalidad, la cola de poli(A) tiene entre 100 y 5000 adenosinas.

[0239]

Las colas poli(A) de los ARN se pueden extender aún más después de la transcripción *in vitro* con el uso de una poli(A) polimerasa, como la poliA polimerasa de *E. coli* (E-PAP). En una modalidad, aumentar la longitud de una cola de poli (A) de 100 nucleótidos a entre 300 y 400 nucleótidos da como resultado un aumento de

aproximadamente el doble en la eficiencia de traducción del ARN. Además, la unión de diferentes grupos químicos al extremo 3' puede aumentar la estabilidad del ARNm. Tal unión puede contener nucleótidos, aptámeros y otros compuestos modificados/artificiales. Por ejemplo, se pueden incorporar análogos de ATP en la cola de poli(A) usando poli(A) polimerasa. Los análogos de ATP pueden aumentar aún más la estabilidad del ARN. Los casquetes al 5' también proporcionan estabilidad a las moléculas de ARN. En una modalidad preferida, los ARN producidos mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen un casquete al 5'. El casquete al 5' se proporciona usando técnicas conocidas en la técnica y descritas en el presente documento. Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.* 29:436-444 (2001); Stepinski, et al, *RNA* 7: 1468-95 (2001); Elango, et al, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 330:958-966 (2005).

[0240] Los ARN producidos mediante los métodos descritos en el presente documento también pueden contener una secuencia del sitio de entrada al ribosoma interno (IRES). La secuencia IRES puede ser cualquier secuencia viral, cromosómica o diseñada artificialmente que inicie la unión del ribosoma independiente del casquete al ARNm y facilite el inicio de la traducción. Puede incluirse cualquier soluto adecuado para la electroporación celular, que pueda contener factores que faciliten la permeabilidad y viabilidad celular, tal como azúcares, péptidos, lípidos,

proteínas, antioxidantes y tensioactivos. En algunas modalidades, el ARN se electropora en las células, tal como el ARN transcrito *in vitro*.

[0241] Los métodos descritos se pueden aplicar a la modulación de la actividad de la célula hospedera en investigación y terapia básica, en los campos del cáncer, células troncales, infecciones agudas y crónicas y enfermedades autoinmunes, incluida la evaluación de la capacidad de la célula hospedera genéticamente modificada para eliminar una célula cancerosa objetivo.

[0242] Los métodos también proporcionan la capacidad de controlar el nivel de expresión en un amplio rango cambiando, por ejemplo, el promotor o la cantidad de ARN de entrada, lo que hace posible regular individualmente el nivel de expresión. Además, la técnica de producción de ARNm basada en PCR facilita enormemente el diseño de ARNm con diferentes estructuras y combinación de sus dominios. Una ventaja de los métodos de transfección de ARN de la invención es que la transfección de ARN es esencialmente transitoria y está libre de vectores. Se puede administrar un transgen de ARN a un linfocito y expresarlo allí después de una breve activación celular *in vitro*, como un casete de expresión mínima sin necesidad de secuencias virales adicionales. En estas condiciones, la integración del transgen en el genoma de la célula hospedera es poco probable. La clonación de células no es necesaria debido a la eficacia

de la transfección del ARN y su capacidad para modificar uniformemente toda la población de linfocitos.

[0243] Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para generar una célula inmunitaria modificada o célula precursora de la misma que comprende introducir en la célula inmunitaria uno o más ácidos nucleicos capaces de regular negativamente la expresión del gen de uno o más genes inmunes endógenos como se describe en el presente documento, usando cualquiera de las técnicas de edición de gen descritas en el presente documento o conocidas por aquellos expertos en la técnica. La expresión de regulación negativa de un gen endógeno que está involucrada en producir una respuesta inmune a una célula, tal como cadena TCR α , cadena TCR β , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , una molécula HLA-I (*por ejemplo*, beta-2 microglobulina, TAP1, TAP2, TAPBP, o NLRC5) o una molécula HLA-II (*por ejemplo*, CIITA, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena invariante), reduce el rechazo de la célula T modificada mediada inmune. Por ejemplo, regulando negativamente la expresión de los componentes del receptor de TCR endógeno, MHC-I o MHC-II, beta-2 microglobulina, los genes CIITA remueven la presentación de superficie de aloantígenos en la célula T que podrían causar rechazo por el sistema inmunitario del hospedero. En algunas modalidades, se introduce un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen endógeno, tal como por electroporación, transfección, o

transducción lenti-viral u otras, en la célula T. En algunas modalidades, la invención incluye una célula T modificada que comprende un ácido nucleico electroporado capaz de regular negativamente la expresión del gen endógeno. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos se introducen en la célula inmunitaria mediante transducción viral. En algunas modalidades, la transducción viral comprende poner en contacto la célula inmunitaria con un vector viral que comprende uno o más ácidos nucleicos. En unas modalidades, el vector viral se selecciona a partir del grupo que consiste de un vector retroviral, vectores virales sendai, vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, y vectores lentivirales.

B. Método para Editar Genéticamente una Célula Inmunitaria

[0244] En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para editar genéticamente una célula inmunitaria que comprende introducir en la célula inmunitaria uno o más ácidos nucleicos capaces de regular negativamente la expresión del gen de uno o más genes inmunes endógenos que codifican una proteína inmune endógena seleccionada a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). En una modalidad, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria modificada comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente

la expresión del gen de una subunidad del receptor de células T seleccionada a partir de CD3 δ , CD3 ϵ , o CD3 γ . En una modalidad, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria modificada comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen de una molécula HLA clase I seleccionada a partir de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, o NLRC5. En una modalidad, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria modificada comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen de una molécula HLA clase II seleccionada a partir de HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, o cadena invariante (Cadena Ii).

[0245]

En algunas modalidades, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen de CD3 δ , y la expresión del gen de una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos. En algunas modalidades, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen de CD3 ϵ , y la expresión del gen de una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP,

cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos. En algunas modalidades, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen de CD3 γ , y la expresión del gen de una molécula de HLA seleccionada a partir del grupo que consiste de B2M, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, cadena invariante (Cadena Ii), y una combinación de los mismos. En algunas modalidades, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen de CD3 γ , y la expresión del gen de CD3 ϵ , B2M, y CIITA.

[0246]

En algunas modalidades, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen de: (1) CD3 ϵ , B2M, y RFX5; (2) CD3 ϵ , B2M, y RFXAP; (3) CD3 ϵ , B2M, y RFXANK; (4) CD3 ϵ , B2M, y HLA-DM; (5) CD3 ϵ , B2M, y cadena Ii; (6) CD3 ϵ , TAP1, y CIITA; (7) CD3 ϵ , TAP1, y RFX5; (8) CD3 ϵ , TAP1, y RFXAP; (9) CD3 ϵ , TAP1, y RFXANK; (10) CD3 ϵ , TAP1, y HLA-DM; (11) CD3 ϵ , TAP1, y cadena Ii; (12) CD3 ϵ , TAP2, y CIITA; (13) CD3 ϵ , TAP2, y RFX5; (14) CD3 ϵ , TAP2, y RFXAP; (15) CD3 ϵ , TAP2, y RFXANK; (16) CD3 ϵ , TAP2, y HLA-DM; (17) CD3 ϵ , TAP2, y cadena Ii; (18) CD3 ϵ , NLRC5, y CIITA; (19) CD3 ϵ , NLRC5, y RFX5; (20) CD3 ϵ , NLRC5, y RFXAP; (21) CD3 ϵ , NLRC5, y

RFXANK; (22) CD3 ϵ , NLRC5, y HLA-DM; (23) CD3 ϵ , NLRC5, y cadena Ii; (24) CD3 ϵ , TAPBP, y CIITA; (25) CD3 ϵ , TAPBP, y RFX5; (26) CD3 ϵ , TAPBP, y RFXAP; (27) CD3 ϵ , TAPBP, y RFXANK; (28) CD3 ϵ , TAPBP, y HLA-DM; o (29) CD3 ϵ , TAPBP, y cadena Ii.

[0247] En algunas modalidades, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen de: (1) CD3 δ , B2M, y RFX5; (2) CD3 δ , B2M, y RFXAP; (3) CD3 δ , B2M, y RFXANK; (4) CD3 δ , B2M, y HLA-DM; (5) CD3 δ , B2M, y cadena Ii; (6) CD3 δ , TAP1, y CIITA; (7) CD3 δ , TAP1, y RFX5; (8) CD3 δ , TAP1, y RFXAP; (9) CD3 δ , TAP1, y RFXANK; (10) CD3 δ , TAP1, y HLA-DM; (11) CD3 δ , TAP1, y cadena Ii; (12) CD3 δ , TAP2, y CIITA; (13) CD3 δ , TAP2, y RFX5; (14) CD3 δ , TAP2, y RFXAP; (15) CD3 δ , TAP2, y RFXANK; (16) CD3 δ , TAP2, y HLA-DM; (17) CD3 δ , TAP2, y cadena Ii; (18) CD3 δ , NLRC5, y CIITA; (19) CD3 δ , NLRC5, y RFX5; (20) CD3 δ , NLRC5, y RFXAP; (21) CD3 δ , NLRC5, y RFXANK; (22) CD3 δ , NLRC5, y HLA-DM; (23) CD3 δ , NLRC5, y cadena Ii; (24) CD3 δ , TAPBP, y CIITA; (25) CD3 δ , TAPBP, y RFX5; (26) CD3 δ , TAPBP, y RFXAP; (27) CD3 δ , TAPBP, y RFXANK; (28) CD3 δ , TAPBP, y HLA-DM; o (29) CD3 δ , TAPBP, y cadena Ii.

[0248] En algunas modalidades, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen de: (1) CD3 γ , B2M, y RFX5; (2) CD3 γ , B2M, y RFXAP; (3) CD3 γ ,

B2M, y RFXANK; (4) CD3 γ , B2M, y HLA-DM; (5) CD3 γ , B2M, y cadena Ii; (6) CD3 γ , TAP1, y CIITA; (7) CD3 γ , TAP1, y RFX5; (8) CD3 γ , TAP1, y RFXAP; (9) CD3 γ , TAP1, y RFXANK; (10) CD3 γ , TAP1, y HLA-DM; (11) CD3 γ , TAP1, y cadena Ii; (12) CD3 γ , TAP2, y CIITA; (13) CD3 γ , TAP2, y RFX5; (14) CD3 γ , TAP2, y RFXAP; (15) CD3 γ , TAP2, y RFXANK; (16) CD3 γ , TAP2, y HLA-DM; (17) CD3 γ , TAP2, y cadena Ii; (18) CD3 γ , NLRC5, y CIITA; (19) CD3 γ , NLRC5, y RFX5; (20) CD3 γ , NLRC5, y RFXAP; (21) CD3 γ , NLRC5, y RFXANK; (22) CD3 γ , NLRC5, y HLA-DM; (23) CD3 γ , NLRC5, y cadena Ii; (24) CD3 γ , TAPBP, y CIITA; (25) CD3 γ , TAPBP, y RFX5; (26) CD3 γ , TAPBP, y RFXAP; (27) CD3 γ , TAPBP, y RFXANK; (28) CD3 γ , TAPBP, y HLA-DM o (29) CD3 γ , TAPBP, y cadena Ii.

[0249]

En algunas modalidades, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria que comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen que comprende un sistema de edición de gen seleccionado a partir del grupo que consiste de un ARN antisentido, ARN antigómero, ARNsi, ARNsh, y un sistema CRISPR. La expresión del gen inmune endógeno puede ser regulada negativamente, inactivada, reducida, y/o inhibida mediante, por ejemplo, un ARN antisentido, ARN antigómero, ARNsi, ARNsh, un sistema CRISPR, etc. En una modalidad, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen que comprende un sistema

de endonucleasa asociado a CRISPR (Cas) (CRISPR-Cas) y un ARN de guía. En algunas modalidades, el ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen comprende una endonucleasa Cas seleccionada a partir del grupo que consiste de Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13, Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, *S. pyogenes* Cas9 (spCas9), *Staphylococcus aureus* Cas9 (saCas9), nucleasa MAD7 (una nucleasa CRISPR tipo V), y cualquier combinación de las mismas. Los métodos para editar genéticamente una célula son bien conocidos en la técnica y se describen en el presente documento.

[0250] En algunas modalidades, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un CRISPR/Cas para alterar uno o más genes inmunes endógenos en una célula modificada (*por ejemplo*, una célula T modificada). En algunas modalidades, CRISPR/Cas9 es usado para interrumpir una o más de una proteína inmune endógena seleccionada a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). En ciertas modalidades ejemplares, CRISPR/Cas9 es usado para interrumpir una o más de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP endógenas, y cadena invariante (Cadena Ii), de este modo resultando en la regulación negativa de CD3 δ , CD3 ϵ ,

CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). Los ARNgs adecuados para uso para interrumpir una o más TRAC, TRBC, B2M, CIITA, y/o PD1 endógenas se expone en las Figuras 26 y 27. En algunas modalidades, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un CRISPR/Cas y un ARN de guía para interrumpir uno o más genes inmunes endógenos en una célula modificada (*por ejemplo*, una célula T modificada). En una modalidad, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria comprende introducir en la célula inmunitaria un CRISPR/Cas y un ARN de guía, y el ARN de guía comprende una secuencia guía que es complementaria con una secuencia dentro de uno o más loci de gen seleccionado a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii). Los ARNs guía (ARNgs) adecuados para uso en la interrupción de una o más CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP endógenas, y cadena invariante (Cadena Ii) se expone en la Tabla 4.

[0251] En una modalidad, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria que comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen que comprende un sistema de edición de gen TALEN. En una modalidad, un método para editar genéticamente una célula

inmunitaria que comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen que comprende un sistema de edición de gen de nucleasa dedo de zinc (ZFN). En una modalidad, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria que comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen que comprende un sistema de edición de gen de meganucleasa. En una modalidad, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria que comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen que comprende un sistema de edición de gen mega-TALEN. En una modalidad, un método para editar genéticamente una célula inmunitaria modificada que comprende introducir en la célula inmunitaria un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen que comprende un sistema de silenciamiento de gen seleccionado a partir de ARN antisentido, ARN antigómero, ARNi, ARNsi, o ARNsh.

C. Expansión de las Células Inmunitarias Modificadas

[0252] En aún otras modalidades, el método para generar la célula T modificada como se describe en el presente documento comprende además expandir la célula inmunitaria modificada para generar una población de células T modificadas. Ya sea antes o después de la modificación de células inmunitarias para expresar un CAR, TCR, un receptor negativo dominante y/o un receptor de cambio, las células

modificadas pueden activarse y expandirse en número usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células inmunitarias de la invención pueden expandirse por contacto con una superficie que tiene unido a la misma un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de las células inmunitarias modificadas. En particular, las poblaciones de células inmunitarias modificadas pueden estimularse mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado sobre una superficie, o mediante contacto con un activador de proteína cinasa C (*por ejemplo*, biostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células inmunitarias modificadas, se utiliza un ligando que se une a la molécula accesoria. Por ejemplo, las células inmunitarias modificadas se pueden poner en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de las células inmunitarias. Los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besancon, Francia) y estos pueden usarse en la invención, al igual que otros métodos y reactivos conocidos en la técnica.

[0253]

La expansión de las células inmunitarias modificadas por los métodos descritos en el presente documento puede ser multiplicada por aproximadamente

10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 2000 veces, 3000 veces, 4000 veces, 5000 veces, 6000 veces, 7000 veces, 8000 veces, 9000 veces, 10,000 veces, 100,000 veces, 1,000,000 veces, 10,000,000 veces, o más, y cualquiera o todos los enteros completos o parciales entre estos. En una modalidad, las células inmunitarias modificadas se expanden en el rango de aproximadamente 20 veces hasta aproximadamente 50 veces.

[0254] Después del cultivo, las células inmunitarias modificadas se pueden incubar en medio celular en un aparato de cultivo durante un período de tiempo o hasta que las células alcancen confluencia o una alta densidad celular para un paso óptimo antes de pasar las células a otro aparato de cultivo. El aparato de cultivo puede ser cualquier aparato de cultivo comúnmente utilizado para cultivar células *in vitro*. Preferiblemente, el nivel de confluencia es del 70% o mayor antes de pasar las células a otro aparato de cultivo. Más preferiblemente, el nivel de confluencia es del 90% o mayor. Un período de tiempo puede ser cualquier momento adecuado para el cultivo de células *in vitro*. El medio de células inmunitarias puede sustituirse durante el cultivo de las células inmunitarias en cualquier momento. Preferiblemente, el medio de células inmunitarias se reemplaza aproximadamente cada 2 a 3 días. Luego, las células

inmunitarias se recolectan del aparato de cultivo, después de lo cual las células inmunitarias modificadas pueden usarse inmediatamente o criopreservarse para almacenarse para su uso posterior. En una modalidad, la invención incluye la criopreservación de las células inmunitarias modificadas expandidas. Las células inmunitarias criopreservadas se descongelan antes de introducir ácidos nucleicos en la célula inmunitaria.

[0255] En otra modalidad, el método comprende aislar células inmunitarias y expandir las células inmunitarias. En otra modalidad, la invención comprende además criopreservar las células inmunitarias antes de la expansión. En otra modalidad más, las células inmunitarias criopreservadas se descongelan para electroporación con el ARN que codifica la proteína de membrana quimérica.

[0256] En aún otras modalidades, el método para generar la célula T modificada como se describe en el presente documento comprende además expandir la célula inmunitaria modificada *ex vivo*. En algunas modalidades, el cultivo y expansión *ex vivo* de células inmunitarias modificadas comprende la adición de factores de crecimiento celular. Sin embargo, otros factores, tales como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit también pueden ser agregados. En algunas modalidades, expandir la célula T modificada comprende cultivar la célula T modificada con un factor seleccionado a partir del grupo que consiste de flt3-L, IL- 1, IL-3, IL-2,

IL-7, IL-15, IL-18, IL-21, TGFbeta, IL-10, y ligando c-kit. El paso de cultivo como se describe en el presente documento (contacto con agentes como se describe en el presente documento o después de electroporación) puede ser muy corto, por ejemplo menos de 24 horas tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 horas. El paso de cultivo puede ser más largo, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o más días.

[0257] Se utilizan varios términos para describir las células en cultivo. El cultivo celular se refiere en general a células extraídas de un organismo vivo y cultivadas en condiciones controladas. Un cultivo celular primario es un cultivo de células, tejidos u órganos extraídos directamente de un organismo y antes del primer subcultivo. Las células se expanden en cultivo cuando se colocan en un medio de crecimiento en condiciones que facilitan el crecimiento y/o la división celular, lo que da como resultado una mayor población de células. Cuando las células se expanden en cultivo, la tasa de proliferación celular en general se mide por la cantidad de tiempo necesario para que las células dupliquen su número, también conocido como tiempo de duplicación.

[0258] Las condiciones apropiadas para el cultivo de células inmunitarias incluyen un medio apropiado (por ejemplo, Medio Esencial Mínimo o Medio RPMI 1640 o X-vivo 15, (Lonza)) que puede contener factores

necesarios para la proliferación y viabilidad, que incluye el suero (por ejemplo, suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-gamma, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF-beta y TNF-a, o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos, plasmanato y agentes de reducción tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol.

[0259] Los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20, Optimizer, con aminoácidos agregados, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero. o suplementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de las células inmunitarias. Los antibióticos, *por ejemplo*, penicilina y estreptomicina, se incluyen sólo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células objetivo se mantienen en las condiciones necesarias para soportar el crecimiento, *por ejemplo*, una temperatura apropiada (*por ejemplo*, 37°C) y una atmósfera (*por ejemplo*, aire más 5% de CO₂).

[0260] El medio usado para cultivar las células inmunitarias puede incluir un agente que puede co-estimular las células inmunitarias. Por ejemplo, un agente

que puede estimular CD3 en un anticuerpo a CD3, y un agente que puede estimular CD28 es un anticuerpo a CD28. Esto es debido a que, como se demuestra por los datos descritos en el presente documento, una célula aislada por los métodos descritos en el presente documento puede ser expandida aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces, 2000 veces, 3000 veces, 4000 veces, 5000 veces, 6000 veces, 7000 veces, 8000 veces, 9000 veces, 10,000 veces, 100,000 veces, 1,000,000 veces, 10,000,000 veces, o más. En una modalidad, las células inmunitarias se expanden en el intervalo de aproximadamente 20 veces hasta aproximadamente 50 veces, o más, cultivando la población sometida a electroporación. En una modalidad, las células T reguladoras humanas se expanden mediante células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) KT64.86 recubiertas con anticuerpo anti-CD3. Los métodos para expandir y activar células inmunitarias se pueden encontrar en las Patentes Estadounidenses Números: 7,754,482, 8,722,400, y 9,555, 105, los contenidos de las cuales se incorporan en el presente documento en su totalidad.

D. Fuentes de Células Inmunitarias

[0261] Antes de la expansión, se obtiene una fuente de células inmunitarias de un sujeto para manipulación ex vivo. Las fuentes de células objetivo para la

manipulación *ex vivo* también pueden incluir, *por ejemplo*, sangre de donante autólogo o heterólogo, sangre del cordón umbilical o médula ósea. Por ejemplo, la fuente de células inmunitarias puede ser del sujeto que se va a tratar con las células inmunitarias modificadas de la invención, *por ejemplo*, la sangre del sujeto, la sangre del cordón umbilical del sujeto o la médula ósea del sujeto. Ejemplos no limitantes de sujetos incluyen humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

[0262] Las células inmunitarias se pueden obtener de varias fuentes, que incluyen sangre, células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, tejido del bazo, cordón umbilical, linfa u órganos linfoides. Las células inmunitarias son células del sistema inmunitario, tales como células de la inmunidad innata o adaptativa, *por ejemplo*, células mieloides o linfoides, que incluyen linfocitos, típicamente células T y/o células NK. Otras células ejemplares incluyen células troncales, tales como células troncales multipotentes y pluripotentes, incluidas células troncales pluripotentes inducidas (iPSC). En algunos aspectos, las células son células humanas. Con referencia al sujeto que será tratado, las células pueden ser alogeneicas y/o autólogas. Las células normalmente son células primarias, tales como las aisladas directamente de un sujeto y/o

aisladas de un sujeto y congeladas.

[0263] En ciertas modalidades, la célula inmunitaria es una célula T, *por ejemplo*, una célula T CD8+ (*por ejemplo*, una célula T CD8+ sin tratamiento previo, una célula T de memoria central o una célula T de memoria efectora), una célula T CD4+, una célula T asesina natural (células NKT), una célula T reguladora (Treg), una célula T de memoria de célula troncal, una célula progenitora linfoide, una célula troncal hematopoyética, una célula asesina natural (célula NK) o una célula dendrítica. En algunas modalidades, las células son monocitos o granulocitos, *por ejemplo*, células mieloides, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, mastocitos, eosinófilos y/o basófilos. En una modalidad, la célula objetivo es una célula troncal pluripotente inducida (iPS) o una célula derivada de una célula iPS, *por ejemplo*, una célula iPS generada a partir de un sujeto, manipulada para alterar (*por ejemplo*, inducir una mutación) o manipular la expresión de uno o más genes objetivo, y diferenciada en, *por ejemplo*, una célula T, *por ejemplo*, una célula T CD8+ (*por ejemplo*, una célula T CD8+ sin tratamiento previo, una célula T de memoria central o una célula T de memoria efectora), una célula T CD4+, una Célula T de memoria de célula troncal, una célula progenitora linfoide o una célula troncal hematopoyética.

[0264] En algunas modalidades, las células incluyen uno o más subconjuntos de células T u otros

tipos de células, tales como poblaciones de células T completas, células CD4+, células CD8+ y subpoblaciones de las mismas, tales como las definidas por función, estado de activación, madurez, potencial de capacidades de diferenciación, expansión, recirculación, localización y/o persistencia, especificidad del antígeno, tipo de receptor de antígeno, presencia en un órgano o compartimento particular, marcador o perfil de secreción de citocinas y/o grado de diferenciación.

[0265] Entre los subtipos y subpoblaciones de células T y/o de células T CD4+ y/o de CD8+ se encuentran las células T sin tratamiento previo (TN), las células T efectoras (TEFF), las células T de memoria y sus subtipos, tales como las células T de memoria troncales (TSCM), T de memoria central (TCM), T de memoria efectora (TEM) o células T efectoras de memoria terminalmente diferenciadas, linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células T inmaduras, células T maduras, células T auxiliares, células T citotóxicas células T invariantes asociadas a mucosas (MAIT), células T reguladoras (Treg) naturales y adaptativas, células T auxiliares, tales como células TH1, células TH2, células TH3, células TH17, células TH9, células TH22, células T auxiliares foliculares células T alfa/beta y células T delta/gamma. En ciertas modalidades, se puede utilizar cualquier número de líneas de células T disponibles en la técnica.

[0266]

En algunas modalidades, los métodos incluyen aislar células inmunitarias del sujeto, prepararlas, procesarlas, cultivarlas y/o diseñarlas por ingeniería genética. En algunas modalidades, la preparación de las células diseñadas incluye uno o más pasos de cultivo y/o preparación. Las células para diseñarse por ingeniería genética tal como se describe pueden aislarse de una muestra, tal como una muestra biológica, *por ejemplo*, una obtenida de o derivada de un sujeto. En algunas modalidades, el sujeto del que se aísla la célula es uno que tiene la enfermedad o condición o necesita una terapia celular o al que se le administrará la terapia celular. El sujeto en algunas modalidades es un ser humano que necesita una intervención terapéutica particular, tal como la terapia celular adoptiva para la cual se aíslan, procesan y/o diseñan células. Por consiguiente, las células en algunas modalidades son células primarias, *por ejemplo*, células humanas primarias. Las muestras incluyen tejido, fluido y otras muestras tomadas directamente del sujeto, así como también muestras resultantes de uno o más pasos de procesamiento, tales como separación, centrifugación, ingeniería genética (*por ejemplo*, transducción con vector viral), lavado y/o incubación. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida directamente de una fuente biológica o una muestra que se procesa. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, fluidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, líquido

cefalorraquídeo, líquido sinovial, orina y sudor, muestras de tejidos y órganos, incluidas muestras procesadas derivadas de los mismos.

[0267] En ciertos aspectos, la muestra de la que se derivan o aíslan las células inmunitarias es sangre o una muestra derivada de sangre, o se deriva de un producto de aféresis o leucoféresis. Las muestras ejemplares incluyen sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), leucocitos, médula ósea, timo, biopsia de tejido, tumor, leucemia, linfoma, ganglios linfáticos, tejido linfoide asociado al intestino, tejido linfoide asociado a la mucosa, bazo, otros tejidos linfoides, hígado, pulmón, estómago, intestino, colon, riñón, páncreas, mama, hueso, próstata, cuello uterino, testículos, ovarios, amígdalas u otros órganos, y/o células derivadas de los mismos. Las muestras incluyen, en el contexto de la terapia celular, *por ejemplo*, terapia celular adoptiva, muestras de fuentes autólogas y alogeneicas.

[0268] En algunas modalidades, las células derivan de líneas celulares, *por ejemplo*, líneas de células T. Las células en algunas modalidades se obtienen de una fuente xenogénica, *por ejemplo*, de ratón, rata, primate no humano y cerdo. En algunas modalidades, el aislamiento de las células incluye uno o más pasos de preparación y/o separación celular sin afinidad. En algunos ejemplos, las células se lavan, centrifugan y/o incuban en presencia de uno

o más reactivos, por ejemplo, para eliminar componentes no deseados, enriquecer los componentes deseados, lisar o eliminar células sensibles a reactivos particulares. En algunos ejemplos, las células se separan basándose en una o más propiedades, tales como densidad, propiedades adherentes, tamaño, sensibilidad y/o resistencia a componentes particulares.

[0269] En algunos ejemplos, las células de la sangre circulante de un sujeto se obtienen, *por ejemplo*, mediante aféresis o leucoféresis. Las muestras, en ciertos aspectos, contienen linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y/o plaquetas, y en ciertos aspectos contienen células distintas de los glóbulos rojos y las plaquetas. En algunas modalidades, las células sanguíneas extraídas del sujeto se lavan, *por ejemplo*, para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un amortiguador o medio apropiado para pasos de procesamiento posteriores. En algunas modalidades, las células se lavan con solución salina amortiguada con fosfato (PBS). En algunos casos, un paso de lavado se realiza mediante filtración de flujo tangencial (TFF) de conformidad con las instrucciones del fabricante. En ciertas modalidades, las células se resuspenden en una variedad de amortiguadores biocompatibles después del lavado. En ciertas modalidades, se eliminan los componentes de una muestra de células sanguíneas y las células se resuspenden

directamente en medios de cultivo. En algunas modalidades, los métodos incluyen métodos de separación celular basados en la densidad, tales como la preparación de glóbulos blancos a partir de sangre periférica mediante la lisis de los glóbulos rojos y la centrifugación a través de un gradiente de Percoll o Ficoll.

[0270] En una modalidad, las células inmunitarias se obtienen a partir de la sangre circulante de un individuo mediante aféresis o leucoféresis. El producto de aféresis normalmente contiene linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. Las células recolectadas por aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un amortiguador o medio apropiado, como solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o una solución de lavado que carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no todos, de cationes divalentes, para los pasos de procesamiento posteriores. Como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica, un paso de lavado se puede realizar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como mediante el uso de una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991, Baxter CytoMate o Haemonetics Cell Saver 5) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una

variedad de amortiguadores biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS sin Ca^{2+} , sin Mg^{2+} , PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin amortiguador. En algunas modalidades, los componentes indeseables de la muestra de aféresis pueden eliminarse y las células resuspenderse directamente en medios de cultivo.

[0271] En algunas modalidades, los métodos de aislamiento incluyen la separación de diferentes tipos de células basándose en la expresión o presencia en la célula de una o más moléculas específicas, tales como marcadores de superficie, por ejemplo, *proteínas* de superficie, marcadores intracelulares o ácido nucleico. En algunas modalidades, se puede utilizar cualquier método conocido para la separación basado en tales marcadores. En algunas modalidades, la separación es una separación basada en afinidad o inmunofinidad. Por ejemplo, el aislamiento en ciertos aspectos incluye la separación de células y poblaciones celulares basándose en la expresión de las células o el nivel de expresión de uno o más marcadores, típicamente marcadores de la superficie celular, por ejemplo, mediante incubación con un anticuerpo o asociado de unión que se une específicamente a tales marcadores, seguidos en general de paso de lavado y separación de las células que se han unido al anticuerpo o al asociado de unión, de aquellas células que no se han unido al anticuerpo o al asociado de unión. Tales pasos de separación pueden basarse en una

selección positiva, en la que las células que se han unido a los reactivos se retienen para su uso posterior, y/o en una selección negativa, en la que se retienen las células que no se han unido al anticuerpo o al asociado de unión. En algunos ejemplos, ambas fracciones se conservan para su uso posterior. En ciertos aspectos, la selección negativa puede ser particularmente útil cuando no hay ningún anticuerpo disponible que identifique específicamente un tipo de célula en una población heterogénea, de modo que la separación se lleva a cabo mejor basándose en marcadores expresados por células distintas a la población deseada. No es necesario que la separación dé como resultado un enriquecimiento o eliminación del 100% de una población celular particular o de células que expresan un marcador particular. Por ejemplo, la selección positiva o el enriquecimiento de células de un tipo particular, tales como aquellas que expresan un marcador, se refiere a aumentar el número o porcentaje de tales células, pero no necesariamente resulta en una ausencia completa de células que no expresan el marcador. Del mismo modo, la selección negativa, la eliminación o el agotamiento de células de un tipo particular, como las que expresan un marcador, se refiere a la disminución del número o porcentaje de tales células, pero no tiene por qué dar como resultado una eliminación completa de todas esas células. En ciertas modalidades ejemplares, se llevan a cabo múltiples rondas de pasos de separación, donde la fracción seleccionada positiva

o negativamente de un paso se somete a otro paso de separación, tal como una selección positiva o negativa posterior. En ciertas modalidades ejemplares, un único paso de separación puede agotar las células que expresan múltiples marcadores simultáneamente, tal como incubando células con una pluralidad de anticuerpos o parejas de unión, cada uno específico para un marcador objetivo para la selección negativa. Del mismo modo, se pueden seleccionar positivamente múltiples tipos de células simultáneamente incubando células con una pluralidad de anticuerpos o asociados de unión expresados en los varios tipos de células.

[0272] En algunas modalidades, una o más de las poblaciones de células T están enriquecidas o agotadas en células que son positivas para (marcadores) o expresan altos niveles (marcadores^{altos}) de uno o más marcadores particulares, tales como marcadores de superficie, o que son negativo para (marcador-) o expresan niveles relativamente bajos (marcador^{bajo}) de uno o más marcadores. Por ejemplo, en ciertos aspectos, subpoblaciones específicas de células T, tales como células positivas o que expresan altos niveles de uno o más marcadores de superficie, por ejemplo, células T CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ y/o CD45RO+, se aíslan mediante técnicas de selección positiva o negativa. En algunos casos, tales marcadores son aquellos que están ausentes o se expresan en niveles relativamente bajos en ciertas poblaciones de células

T (tales como las células sin memoria) pero están presentes o se expresan en niveles relativamente más altos en otras ciertas poblaciones de células T (tales como células de memoria). En una modalidad, las células (tales como las células CD8+ o células T, *por ejemplo*, células CD3+) están enriquecidas (es decir, seleccionadas positivamente) por células que son positivas o que expresan altos niveles de superficie de CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD127 y/o CD62L y/o agotadas (*por ejemplo*, seleccionadas negativamente) de células que son positivas o expresan altos niveles de superficie de CD45RA. En algunas modalidades, las células están enriquecidas o agotadas en células positivas o que expresan altos niveles de superficie de CD122, CD95, CD25, CD27 y/o IL7-Ra (CD 127). En ciertas modalidades ejemplares, las células T CD8+ se enriquecen con células positivas para CD45RO (o negativas para CD45RA) y para CD62L. Por ejemplo, las células T CD3+, CD28+ se pueden seleccionar positivamente usando perlas magnéticas conjugadas con CD3/CD28 (*por ejemplo*, Expansor de Células T CD3/CD28 DYNABEADS® M-450).

[0273] En algunas modalidades, las células T se separan de una muestra de PBMC mediante selección negativa de marcadores expresados en células no T, tales como células B, monocitos u otros glóbulos blancos, tales como CD14. En ciertos aspectos, se usa un paso de selección CD4+ o CD8+ para separar las células auxiliares T CD4+ y las citotóxicas CD8+. Tales poblaciones CD4+ y CD8+

pueden clasificarse además en subpoblaciones mediante selección positiva o negativa de marcadores expresados o expresados en un grado relativamente mayor en una o más subpoblaciones de células T sin tratamiento previo, de memoria y/o efectoras. En algunas modalidades, las células CD8+ se enriquecen adicionalmente o se agotan en células troncales de memoria central, de memoria efectora y/o de memoria central sin tratamiento previo, tal como mediante selección positiva o negativa basada en antígenos de superficie asociados con la subpoblación respectiva. En algunas modalidades, el enriquecimiento de células T de memoria central (MTC) se lleva a cabo para aumentar la eficacia, tal como por ejemplo para mejorar la supervivencia, la expansión y/o el injerto a largo plazo después de la administración, que en ciertos aspectos es particularmente sólido en tales subpoblaciones.

[0274] En algunas modalidades, la combinación de células T CD8+ enriquecidas con TCM y células T CD4+ mejora aún más la eficacia. En algunas modalidades, las células T de memoria están presentes en los subconjuntos CD62L+ y CD62L- de linfocitos de sangre periférica CD8+. Las PBMC se pueden enriquecer o agotar en fracciones CD62L-CD8+ y/o CD62L+CD8+, tal como usando anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L. En algunas modalidades, una población de células T CD4+ y/o una población de células T CD8+ está enriquecida en células de memoria central (MTC). En algunas modalidades, el

enriquecimiento para células T de memoria central (TCM) se basa en una expresión de superficie alta o positiva de CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CDS y/o CD 127; en ciertos aspectos, se basa en la selección negativa de células que expresan o expresan altamente CD45RA y/o granzima B. En ciertos aspectos, el aislamiento de una población CD8+ enriquecida en células TCM se lleva a cabo mediante el agotamiento de las células que expresan CD4, CD14, CD45RA. y selección positiva o enriquecimiento para células que expresan CD62L. En un aspecto, el enriquecimiento para células T de memoria central (TCM) se lleva a cabo comenzando con una fracción negativa de células seleccionadas en base a la expresión de CD4, que se somete a una selección negativa basada en la expresión de CD 14 y CD45RA, y una selección positiva basada en CD62L. Tales selecciones en ciertos aspectos se llevan a cabo simultáneamente y en otros aspectos se llevan a cabo secuencialmente, en cualquier orden. En algunos casos, el mismo paso de selección basado en la expresión de CD4 usado en la preparación de la población o subpoblación de células CD8+, también se usa para generar la población o subpoblación de células CD4+, de modo que tanto las fracciones positivas como las negativas de la separación basada en CD4 se retienen y utilizan en pasos posteriores de los métodos, opcionalmente después de uno o más pasos de selección positivos o negativos adicionales.

CD4+ se clasifican en células sin tratamiento previo, de memoria central y efectoras mediante la identificación de poblaciones celulares que tienen antígenos de superficie celular. Los linfocitos CD4+ se pueden obtener mediante métodos estándares. En algunas modalidades, los linfocitos T CD4+ sin tratamiento previo son células T CD45RO-, CD45RA+, CD62L+, CD4+. En algunas modalidades, las células CD4+ de memoria central son CD62L+ y CD45RO+. En algunas modalidades, las células CD4+ efectoras son CD62L- y CD45RO. En un ejemplo, para enriquecer células CD4+ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CDS. En algunas modalidades, el anticuerpo o asociado de unión está unido a un soporte o matriz sólido, tal como una perla magnética o una perla paramagnética, para permitir la separación de células para una selección positiva y/o negativa.

[0276] En algunas modalidades, las células se incuban y/o cultivan antes o en conjunto con la ingeniería genética. Los pasos de incubación pueden incluir cultivo, cultivación, estimulación, activación y/o propagación. En algunas modalidades, las composiciones o células se incuban en presencia de condiciones estimulantes o un agente estimulante. Tales condiciones incluyen aquellas diseñadas para inducir proliferación, expansión, activación y/o supervivencia de células en la población, para imitar la

exposición al antígeno y/o preparar las células para la ingeniería genética, tal como para la introducción de un receptor de antígeno recombinante. Las condiciones pueden incluir uno o más de medios particulares, temperatura, contenido de oxígeno, contenido de dióxido de carbono, tiempo, agentes, *por ejemplo*, nutrientes, aminoácidos, antibióticos, iones y/o factores estimuladores, tales como citocinas, quimiocinas, antígenos, asociados de unión, proteínas de fusión, receptores solubles recombinantes y cualquier otro agente diseñado para activar las células. En algunas modalidades, las condiciones o agentes estimulantes incluyen uno o más agentes, *por ejemplo*, ligando, que es capaz de activar un dominio de señalización intracelular de un complejo de TCR. En ciertos aspectos, el agente activa o inicia la cascada de señalización intracelular de TCR/CD3 en una célula T. Tales agentes pueden incluir anticuerpos, tales como los específicos para un componente de TCR y/o receptor coestimulador, *por ejemplo*, anti-CD3, anti-CD28, *por ejemplo*, unidos a un soporte sólido tal como una perla, y/o una o más citocinas. Opcionalmente, el método de expansión puede comprender además el paso de añadir anticuerpo anti-CD3 y/o anti-CD28 al medio de cultivo (*por ejemplo*, a una concentración de al menos aproximadamente 0.5 ng/ml). En algunas modalidades, los agentes estimulantes incluyen IL-2 y/o IL-15, *por ejemplo*, una concentración de IL-2 de al menos aproximadamente 10 unidades/ml.

[0277] En otra modalidad, las células T se aíslan de sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™. Alternativamente, las células T se pueden aislar de un cordón umbilical. En cualquier caso, se puede aislar aún más una subpoblación específica de células T mediante técnicas de selección positiva o negativa.

[0278] Las células mononucleares de la sangre del cordón umbilical de este modo aisladas pueden carecer de células que expresan ciertos antígenos, incluidos, pero no limitados a, CD34, CDS, CD14, CD19 y CD56. El agotamiento de estas células se puede lograr usando un anticuerpo aislado, una muestra biológica que comprende un anticuerpo, tal como ascitis, un anticuerpo unido a un soporte físico y un anticuerpo unido a una célula.

[0279] El enriquecimiento de una población de células T mediante selección negativa se puede lograr usando una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie exclusivos de las células seleccionadas negativamente. Un método ejemplar es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de la superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer

células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CDS.

[0280] Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y la superficie (*por ejemplo*, partículas tales como perlas). En ciertas modalidades, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en donde se mezclan las perlas y las células (es decir, aumentar la concentración de células), para asegurar el máximo contacto de las células y las perlas. Por ejemplo, en una modalidad, se usa una concentración de 2 mil millones de células/ml. En una modalidad, se usa una concentración de mil millones de células/ml. En una modalidad adicional, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En una modalidad adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otra modalidad más, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En modalidades adicionales, se pueden usar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento del rendimiento celular, la activación celular y la expansión celular.

[0281] Las células T también se pueden congelar después del paso de lavado, lo que no

requiere el paso de eliminación de monocitos. Si bien no se desea limitar a ninguna teoría, el paso de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, hasta cierto punto, los monocitos de la población celular. Después del paso de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución congelada. Si bien en la técnica se conocen muchas soluciones y parámetros de congelación y serán útiles en este contexto, en un ejemplo no limitante, un método implica el uso de PBS que contiene 20% de DMSO y 8% de albúmina de suero humana, u otros medios de congelación de células adecuados. Luego, las células se congelan a -80°C a una velocidad de 1°C por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos de congelación controlada, así como la congelación incontrolada inmediatamente a -20°C o en nitrógeno líquido.

[0282] En una modalidad, la población de células T está comprendida dentro de células tales como células mononucleares de sangre periférica, células de sangre del cordón umbilical, una población purificada de células T y una línea de células T. En otra modalidad, las células mononucleares de sangre periférica comprenden la población de células T. En otra modalidad más, las células T purificadas comprenden la población de células T.

[0283]

En algunas modalidades, la célula inmunitaria se obtiene a partir de una muestra de sangre, una muestra de sangre completa, una muestra de célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), o una muestra de anféresis. En algunos ejemplos, las células de la sangre circulante de un sujeto se obtienen, *por ejemplo*, mediante aféresis o leucoféresis. En una modalidad, las células inmunitarias se obtienen a partir de la sangre circulante de un individuo mediante aféresis o leucoféresis. El producto de aféresis normalmente contiene linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En algunas modalidades, la muestra de anféresis es una muestra criopreservada. En algunas modalidades, la muestra de anféresis es una muestra fresca. En algunas modalidades, la célula inmunitaria se obtiene a partir de un sujeto humano.

VII. COMPOSICIONES

[0284]

En un aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende la célula inmunitaria modificada descrita en el presente documento, o una población de células inmunitarias modificadas obtenidas a partir de cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En alguna modalidad, las composiciones de la presente invención pueden comprender una célula T no estimulada modificada o una célula T estimulada modificada como se describe en el presente documento. En algunas

modalidades, la composición puede incluir una composición farmacéutica. En algunas modalidades, la composición puede incluir una composición farmacéutica y comprende además uno o más portadores, diluyentes, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender amortiguadores tales como solución salina amortiguada neutra, solución salina amortiguada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (*por ejemplo*, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente invención se formulan preferiblemente para administración parenteral (*por ejemplo*, administración intravenosa). En algunas modalidades, se puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica que comprende las células T modificadas a un sujeto en necesidad del mismo.

VIII. MÉTODOS DE TRATAMIENTO

[0285] En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para terapia de transferencia de células adoptivas que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una célula inmunitaria modificada de la presente invención. En algunas modalidades, se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad o una condición en un sujeto, el cual

comprende administrar al sujeto una población de células T modificadas descritas en el presente documento, *por ejemplo*, una población de células T no estimuladas modificadas o una población de células T estimuladas modificadas descritas en el presente documento. En algunas modalidades, la invención incluye un método para tratar una enfermedad o condición en un sujeto que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una composición que comprende la célula inmunitaria modificada como se describe en el presente documento. En algunas modalidades, el método para tratar una enfermedad o condición en un sujeto comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una célula inmunitaria modificada (*por ejemplo*, células T) que comprende una inserción y/o supresión en uno o más loci del gen que codifica cada uno una proteína inmune endógena seleccionada a partir del grupo que consiste de CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , B2M, CIITA, TAP1, TAP2, TAPBP, NLRC5, HLA-DM, RFX5, RFXANK, RFXAP, y cadena invariante (Cadena Ii) y un ácido nucleico exógeno que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor de células T diseñado por ingeniería genética (TCR), un receptor similar a inmunoglobulina de células Asesinas (KIR), un polipéptido de unión al antígeno, un ligando del receptor de la superficie celular, o un antígeno tumoral. En algunas modalidades, la inserción y/o supresión es capaz de regular negativamente la expresión del gen de uno o más genes inmunes endógenos.

[0286]

En algunas modalidades, la

célula inmunitaria modificada comprende además un receptor negativo dominante, un receptor de cambio, una quimiocina, un receptor de quimiocina, una citocina, un receptor de citocina, IL-7, IL-7R, IL-15, IL-15R, IL-21, IL-18, CCL21, CCL19, o una combinación de los mismos. En algunos casos, la enfermedad es un cáncer, opcionalmente un tumor sólido o una neoplasia maligna hematológica. En algunos casos, las células T no estimuladas modificadas o las células T estimuladas modificadas expresa cada una, un dominio de unión al antígeno que es específico para un antígeno expresado por el cáncer. En algunas modalidades, el método comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo una célula inmunitaria modificada (*por ejemplo*, célula T) que comprende un ácido nucleico capaz de regular negativamente la expresión del gen, un TCR, un KIR, un CAR, un receptor negativo dominante, y/o un receptor de cambio como se describe en otra parte en el presente documento. En algunas modalidades, la célula inmunitaria modificada es una célula T redirigida de TCR universal (*por ejemplo*, célula T alogeneica).

[0287] En algunas modalidades, el cáncer es un tumor sólido. Tumores ejemplares sólidos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro (*por ejemplo*, glioma, glioblastoma, neuroblastoma), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de ojos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, melanoma, mesotelioma, cáncer de

ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata o cáncer de estómago. En algunos casos, el tumor sólido es cáncer cerebral (*por ejemplo*, glioma, glioblastoma, neuroblastoma), cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas o cáncer de próstata. En algunos casos, el tumor sólido es un cáncer metastásico. En algunos casos, el tumor sólido es un tumor sólido recidivante o refractario.

[0288] En algunas modalidades, el cáncer es una neoplasia maligna hematológica. En algunas modalidades, la neoplasia maligna hematológica es una neoplasia maligna de células B o una neoplasia maligna de células T. En algunas modalidades, la neoplasia maligna hematológica es un linfoma, una leucemia o un mieloma. En algunas modalidades, la neoplasia maligna hematológica es un linfoma de Hodgkin o un linfoma no Hodgkin. Los ejemplos de neoplasias malignas hematológicas incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma folicular (FL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma de células del manto (MCL), macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma múltiple, linfoma extraganglionar de células B de la zona marginal, linfoma ganglionar de células B de la zona marginal, linfoma de Burkitt, linfoma de células B de alto grado no Burkitt, linfoma mediastínico primario de células B (PMBL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma

linfoblástico B precursor, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de la zona marginal esplénica, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de derrame primario o granulomatosis linfomatoide. En algunos casos, la neoplasia maligna hematológica es una neoplasia maligna hematológica metastásica. En algunos casos, la neoplasia maligna hematológica es una neoplasia maligna hematológica recidivante o refractaria.

[0289] En algunas modalidades, el método para tratar una enfermedad comprende además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional o una terapia adicional. En algunos casos, un agente terapéutico adicional descrito en el presente documento comprende un agente quimioterapéutico, un agente inmunoterapéutico, una terapia dirigida, radioterapia o una combinación de los mismos. Agentes terapéuticos adicionales ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como altretamina, busulfán, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, lomustina, melfalán, oxalapatino, temozolomida o tiotepa; antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato o pemetrexed; antraciclinas tales como daunorrubicina,

doxorubicina, epirubicina o idarrubicina; inhibidores de la topoisomerasa I tales como topotecán o irinotecán (CPT-11); inhibidores de la topoisomerasa II tales como etopósido (VP-16), tenipósido o mitoxantrona; inhibidores mitóticos tales como docetaxel, estramustina, ixabepilona, paclitaxel, vinblastina, vincristina o vinorelbina; o corticosteroides tales como prednisona, metilprednisolona o dexametasona. En algunos casos, el agente terapéutico adicional comprende una terapia de primera línea. Como se utiliza en el presente documento, "terapia de primera línea" comprende un tratamiento primario para un sujeto con cáncer. En algunos casos, el cáncer es un cáncer primario. En otros casos, el cáncer es metastásico o recurrente. En algunos casos, la terapia de primera línea comprende quimioterapia. En otros casos, el tratamiento de primera línea comprende la radioterapia. Un experto comprendería fácilmente que pueden ser aplicables diferentes tratamientos de primera línea a diferentes tipos de cánceres. En algunos casos, el agente terapéutico adicional comprende un inhibidor de puntos de control inmunológico. En algunos casos, el inhibidor del punto de control inmunológico comprende inhibidores tales como un anticuerpo o fragmentos (*por ejemplo*, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, humanizado o quimérico) del mismo, moléculas de ARNi o moléculas pequeñas para PD-1, PD-L1, CTLA4, PD-L2, LAG3, B7-H3, KIR, CD137, PS, TFM3, CD52, CD30, CD20, CD33, CD27, OX40, GITR, ICOS, BTLA (CD272), CD160,

2B4, LAIR1, TIGHT, LIGHT, DR3, CD226, CD2, o SLAM. Inhibidores de punto de control ejemplares incluyen pembrolizumab, nivolumab, tremelimumab, o ipilimumab. En algunas modalidades, la terapia adicional comprende terapia por radiación.

[0290] En algunas modalidades, la terapia adicional comprende cirugía

IX. KITS Y ARTÍCULOS DE MANUFACTURA

[0291] En algunas modalidades, un kit o artículo de manufactura descrito en el presente documento incluye una o más poblaciones de células T modificadas (*por ejemplo*, células T no estimuladas modificadas o células T estimuladas modificadas). En algunos casos, el kit o artículo de manufactura descrito en el presente documento incluye además un portador, paquete o recipiente que está compartimentado para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, que comprende cada uno de los recipientes uno de los elementos separados que se utilizarán en un método descrito en el presente documento. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. En una modalidad, los contenedores están formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico.

[0292] Los artículos de fabricación proporcionados en el presente documento contienen materiales de embalaje. Los ejemplos de materiales de envasado

farmacéutico incluyen, pero no se limitan a, paquetes en ampolla, botellas, tubos, bolsas, recipientes, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y modo de administración y tratamiento previsto.

[0293] Un kit típicamente incluye etiquetas que listan el contenido y/o instrucciones de uso, y prospectos con instrucciones de uso. Por lo general, también se incluirá un conjunto de instrucciones.

IX. DEFINICIONES

[0294] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Aunque en la práctica o prueba de la presente descripción se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en el presente documento se describen métodos y materiales adecuados.

[0295] También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente y no pretende ser limitante.

[0296] La práctica de la presente descripción empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de cultivo de tejidos, inmunología, biología molecular, microbiología, biología celular y ADN

recombinante, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Véase por ejemplo, Green and Sambrook eds. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4ta. edición; las series Ausubel et al. eds. (2015) *Current Protocols in Molecular Biology*; las series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al. (2015) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*; McPherson et al. (2006) *PCR: The Basics* (Garland Science); Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Greenfield ed. (2014) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 6ta. edición; Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*; Herdewijn ed. (2005) *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*; Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation*; Buzdin and Lukyanov ed. (2007) *Nucleic Acids Hybridization: Modern Applications*; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Grandi ed. (2007) *In Vitro Transcription and Translation Protocols*, 2da. edición; Guisan ed. (2006) *Immobilization of Enzymes and Cells*; Perbal (1988) *A Practical Guide to Molecular Cloning*, 2da. edición; Miller and Calos eds, (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*; Mayer and

Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); Lundblad and Macdonald eds. (2010) *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 4ta. edición; y Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, 5ta. edición.

[0297] Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluidas mezclas de las mismas, y significa una célula o más de una célula.

[0298] Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor. El término "aproximadamente" cuando se usa antes de una designación numérica, *por ejemplo*, temperatura, tiempo, cantidad y concentración, incluido el rango, indica aproximaciones que pueden variar en (+) o (-) ($\pm$) 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, 2% o 1%. Preferiblemente $\pm 5\%$, más preferiblemente $\pm 1\%$ y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos descritos.

[0299] Como se usa en el presente documento, el término "Activación" se refiere al estado de una célula T que ha sido suficientemente estimulada para

inducir una proliferación celular detectable. La activación también puede estar asociada con la producción inducida de citocinas y funciones efectoras detectables. El término "células T activadas" se refiere, entre otras cosas, a células T que están experimentando división celular.

[0300] "Alogeneico" se refiere a cualquier material derivado de un animal diferente de la misma especie que el individuo al que se le introduce el material. Se dice que dos o más individuos son alogeneicos entre sí cuando los genes en uno o más loci no son idénticos. En algunos aspectos, el material alogeneico de individuos de la misma especie puede ser lo suficientemente diferente genéticamente como para interactuar antigénicamente.

[0301] Como se usa en el presente documento, el término "objetivo de células T alogeneicas" o "células T alogeneicas" se refiere a una proteína que media o contribuye a una respuesta del hospedero contra injerto, media o contribuye a una respuesta del injerto contra hospedero, o es un objetivo para un inmunosupresor; y el gen que codifica tal molécula y sus elementos reguladores asociados (*por ejemplo*, promotores). Se entenderá que el término objetivo de células T alogeneicas se refiere al gen (y sus elementos reguladores asociados) que codifica una proteína objetivo de células T alogeneicas cuando se usa en conjunto con una secuencia objetivo o molécula de ARNg. Sin estar ligado a ninguna teoría, la inhibición o eliminación de

uno o más objetivos de células T alogeneicas (por ejemplo, mediante los métodos y composiciones descritos en el presente documento) puede mejorar la eficacia, supervivencia, función y/o viabilidad de una célula alogeneica. En algunas modalidades, la eficacia, supervivencia, función y/o viabilidad de una célula alogeneica se mejora reduciendo o eliminando la inmunogenicidad indeseable (tal como una respuesta del hospedero contra injerto o una respuesta del injerto contra hospedero). En algunas modalidades, la proteína que media o contribuye a una respuesta de injerto contra hospedero o respuesta del hospedero contra injerto es uno o más componentes del complejo receptor de células T. En algunas modalidades, el componente del complejo receptor de células T es el receptor alfa de células T, el dominio constante del TCR alfa (TRAC; TCR α). En algunas modalidades, el componente del receptor de células T es la cadena beta del receptor de células T (TRBC; TCR- β), por ejemplo el dominio constante 1 (TRBC1) o el dominio constante 2 (TRBC2) del TCR beta. En algunas modalidades, el componente del receptor de células T es la cadena delta del receptor de células T (CD3 δ), la cadena épsilon del receptor de células T (CD3 ϵ), la cadena zeta del receptor de células T (CD3 ζ ; CD247), y/o la cadena gamma del receptor de células T (CD3 γ). En algunas modalidades, donde la proteína codificada por el objetivo de células T alogeneica es un componente del complejo de señalización de TCR, el gen que codifica el objetivo de

células T alogeneica puede ser, por ejemplo, TRAC, TRBC1, TRBC2, CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 γ , o CD3 ζ (CD247), o cualquier combinación de los mismos.

[0302] Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina, que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos típicamente son tetrámeros de moléculas de inmunoglobulina. Los anticuerpos en la presente invención pueden existir en una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, Fv, Fab y F(ab)₂, así como anticuerpos de cadena sencilla (scFv) y anticuerpos humanizados. En algunas modalidades, anticuerpo se refiere a tales conjuntos (*por ejemplo*, moléculas de anticuerpo intactas, inmunoadhesinas o variantes de las mismas) que tienen una actividad inmunorreactiva específica conocida significativa para un antígeno de interés (*por ejemplo*, un antígeno asociado a un tumor). Los anticuerpos y las inmunoglobulinas comprenden cadenas ligeras y pesadas, con o sin un enlace covalente entre cadenas entre ellas. Las estructuras básicas de las inmunoglobulinas en los sistemas de vertebrados se conocen relativamente muy bien.

[0303] El término "fragmento de

anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos scFv y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0304] Como se usa en el presente documento, el término "cadena pesada de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere al mayor de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales.

[0305] Como se usa en el presente documento, una "cadena ligera de anticuerpo" se refiere a la más pequeña de los dos tipos de cadenas polipeptídicas presentes en todas las moléculas de anticuerpo en sus conformaciones naturales. Las cadenas ligeras α y β se refieren a los dos isotipos principales de cadenas ligeras de anticuerpos.

[0306] Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo sintético" significa un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante, tal como, por ejemplo, un anticuerpo expresado por un bacteriófago como se describe en el presente documento. El término también debe interpretarse en el sentido de un anticuerpo que se ha generado mediante la síntesis de una

molécula de ADN que codifica el anticuerpo y cuya molécula de ADN expresa una proteína del anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que especifica el anticuerpo, en donde el ADN o la secuencia de aminoácidos se ha obtenido usando ADN sintético o tecnología de secuencia de aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica.

[0307] El dominio de unión al antígeno de (*por ejemplo*, un receptor de antígeno quimérico) incluye variantes de anticuerpo. Como se utiliza en el presente documento, el término "variante de anticuerpo" incluye formas sintéticas y modificadas de anticuerpos que están alteradas de manera que no se produzcan de forma natural, *por ejemplo*, anticuerpos que comprenden al menos dos porciones de cadena pesada pero no dos cadenas pesadas completas (tales como dominio anticuerpos o minicuerpos eliminados); formas multiespecíficas de anticuerpos (*por ejemplo*, biespecíficos, triespecíficos, etc.) alterados para unirse a dos o más antígenos diferentes o a diferentes epítomos en un único antígeno); moléculas de cadena pesada unidas a moléculas scFv y similares. Además, el término "variante de anticuerpo" incluye formas multivalentes de anticuerpos (*por ejemplo*, trivalentes, tetravalentes, etc., anticuerpos que se unen a tres, cuatro o más copias del mismo antígeno.

[0308] Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" o "Ag" se define como una

molécula que provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune puede implicar la producción de anticuerpos, la activación de células inmunológicamente competentes específicas, o ambas. El experto entenderá que cualquier macromolécula, incluidas prácticamente todas las proteínas o péptidos, puede servir como antígeno. Además, los antígenos pueden derivarse de ADN recombinante o genómico. Un experto en la técnica entenderá que cualquier ADN que comprenda una secuencia de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos parcial que codifique una proteína que provoque una respuesta inmune, por lo tanto, codifica un "antígeno", tal como se usa ese término en el presente documento. Además, un experto en la técnica comprenderá que no es necesario que un antígeno esté codificado únicamente por una secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen. Es fácilmente evidente que la presente invención incluye, pero no se limita a, el uso de secuencias de nucleótidos parciales de más de un gen y que estas secuencias de nucleótidos están dispuestas en diversas combinaciones para provocar una respuesta inmune deseada. Además, el experto entenderá que no es necesario que un antígeno esté codificado por un "gen" en absoluto. Es fácilmente evidente que un antígeno puede generarse sintetizado o puede derivarse de una muestra biológica. Tal muestra biológica puede incluir, pero no se limita a, una muestra de tejido, una muestra de tumor, una célula o un fluido biológico.

[0309]

Como se usa en el presente documento, el término "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por una disminución en el volumen del tumor, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento en la esperanza de vida, o mejoramiento de diversos síntomas fisiológicos asociados con la condición cancerosa. En algunas modalidades, un "efecto antitumoral" también puede manifestarse por la capacidad de los péptidos, polinucleótidos, células y anticuerpos de la invención para prevenir la aparición de tumores en primer lugar.

[0310]

Como se usa en el presente documento, el término "auto-antígeno" significa, de conformidad con la presente invención, cualquier auto-antígeno que el sistema inmunológico reconoce como extraño. En algunas modalidades, los auto-antígenos comprenden, pero no se limitan a, proteínas celulares, fosfoproteínas, proteínas de la superficie celular, lípidos celulares, ácidos nucleicos, glicoproteínas, incluidos receptores de la superficie celular.

[0311]

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad autoinmune" como se utiliza en el presente documento se define como un trastorno que resulta de una respuesta autoinmune. Una enfermedad autoinmune es el resultado de una respuesta excesiva e inapropiada a un auto-antígeno. Ejemplos de enfermedades

autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmune, parotiditis autoinmune, cáncer, enfermedad de Crohn, diabetes (Tipo I), epidermólisis ampollosa distrófica, epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjögren, espondiloartropatías, tiroiditis, vasculitis, vitíligo, mixedema, anemia perniciosa., colitis ulcerosa, entre otros.

[0312] Como se usa en el presente documento, el término "autólogo" pretende referirse a cualquier material derivado del mismo individuo en quien posteriormente se puede re-introducir el material.

[0313] Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una enfermedad caracterizada por el crecimiento rápido e incontrolado de células aberrantes. Las células cancerosas pueden diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo. Ejemplos de diversos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de

cerebro, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón, cáncer de próstata metastásico resistente a castración, melanoma, sarcoma sinovial, tumores sólidos avanzados positivos para TnMuc1, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos y similares. En ciertas modalidades, el cáncer es carcinoma medular de tiroides. En ciertas modalidades, el cáncer es cáncer de próstata. En ciertas modalidades, el cáncer es mesotelioma o un cáncer que expresa mesotelina. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de próstata metastásico resistente a castración. Los términos "cáncer" y "tumor" se usan indistintamente en el presente documento, y ambos términos abarcan tumores sólidos y líquidos, tumores difusos o circulantes. En algunas modalidades, el cáncer o tumor incluye cánceres y tumores premalignos, así como también malignos.

[0314] Como se usa en el presente documento, el término "antígeno asociado al cáncer" o "antígeno tumoral" se refiere indistintamente a una molécula (típicamente una proteína, carbohidrato o lípido) que se expresa en la superficie de una célula cancerosa, ya sea en su totalidad o como un fragmento (*por ejemplo*, MHC/péptido), y que es útil para dirigir preferentemente un agente farmacológico a la célula cancerosa. En algunas modalidades, un antígeno tumoral es un marcador expresado tanto por células normales como por células cancerosas (*por ejemplo*, un marcador de linaje tal como CD19 en células B). En algunas

modalidades, un antígeno tumoral es una molécula de superficie celular que se sobreexpresa en una célula cancerosa en comparación con una célula normal, por ejemplo, sobreexpresión 1 veces, sobreexpresión 2 veces, sobreexpresión 3 veces o más en comparación con una célula normal. En algunas modalidades, un antígeno tumoral es una molécula de la superficie celular que se sintetiza de manera inapropiada en la célula cancerosa, por ejemplo, una molécula que contiene supresiones, adiciones o mutaciones en comparación con la molécula expresada en una célula normal. En algunas modalidades, un antígeno tumoral se expresará exclusivamente en la superficie celular de una célula cancerosa, en su totalidad o como un fragmento (*por ejemplo*, MHC/péptido), y no se sintetizará ni expresará en la superficie de una célula normal. En algunas modalidades, los CAR de la presente invención incluyen CAR que comprenden un dominio de unión al antígeno (*por ejemplo*, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un péptido presentado por MHC. Normalmente, los péptidos derivados de proteínas endógenas llenan las bolsas de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y son reconocidos por los receptores de células T (TCR) en los linfocitos T CD8+. Los complejos MHC de clase I se expresan constitutivamente en todas las células nucleadas. En el cáncer, los complejos de péptido/MHC específicos de virus y/o de tumores representan una clase única de objetivos de

superficie celular para la inmunoterapia. Se han descrito anticuerpos similares a TCR que se dirigen a péptidos derivados de antígenos virales o tumorales en el contexto del antígeno leucocitario humano (HLA)-A1 o HLA-A2. Por ejemplo, un anticuerpo similar a TCR puede identificarse mediante la selección de una biblioteca, tal como una biblioteca presentada en fagos scFv humanos.

[0315] Como se usa en el presente documento, el término "antígeno que soporta el cáncer" o "antígeno que soporta el tumor" se refiere indistintamente a una molécula (típicamente una proteína, carbohidrato o lípido) que se expresa en la superficie de una célula que, en sí misma, no es cancerosa, pero soporta a las células cancerosas promoviendo su crecimiento o supervivencia (*por ejemplo, resistencia a las células inmunitarias*). Las células ejemplares de este tipo incluyen células estromales y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). El antígeno de soporte del tumor en sí no necesita desempeñar un papel en el soporte de las células tumorales siempre que el antígeno esté presente en una célula que soporta las células cancerosas.

[0316] Como se usa en el presente documento, el término "Cas", "molécula de Cas" o "molécula de Cas" se refiere a una enzima del sistema bacteriano CRISPR/Cas de tipo II responsable de la escisión del ADN. Cas incluye proteína de tipo silvestre, así como también mutantes funcionales y no funcionales de la misma.

documento, el término "receptor de antígeno quimérico" o "CAR" se refiere a un receptor de células T artificial que está diseñado para expresarse en una célula efectora inmune o en una célula precursora de la misma y unirse específicamente a un antígeno. Los CAR se pueden utilizar en terapia celular adoptiva con transferencia de células adoptivas. En algunas modalidades, la transferencia (o terapia) de células adoptivas comprende la eliminación de células T de un paciente y la modificación de las células T para expresar los receptores específicos de un antígeno particular. En algunas modalidades, el CAR tiene especificidad para un objetivo seleccionado, por ejemplo, ROR1, mesotelina, c-Met, PSMA, PSCA, receptor de folato alfa, receptor de folato beta, EGFR, EGFRvIII, GPC2, GPC2, mucina 1 (MUC1), Antígeno Tn ((Tn Ag) o (GalNAca-Ser/Thr)), TnMUC1, receptor alfa-4 de la familia GDNF (GFRA4), proteína de activación de fibroblastos (FAP) o subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13 (IL-13Ra2 o CD213A2). En algunas modalidades, los CAR también pueden comprender un dominio de activación intracelular, un dominio de la transmembrana y un dominio extracelular que comprende una región de unión al antígeno asociada a un tumor. En algunos aspectos, los CAR comprenden fusiones de anticuerpos monoclonales derivados de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), fusionados a la transmembrana CD3-zeta y al dominio intracelular. La especificidad de los diseños de CAR

puede derivarse de ligandos de receptores (*por ejemplo*, péptidos). En algunas modalidades, un CAR puede atacar cánceres redirigiendo la especificidad de una célula T que expresa el CAR específico para antígenos asociados a tumores.

[0318] Como se usa en el presente documento, el término "escisión" se refiere a la rotura de enlaces covalentes, tales como en el esqueleto de una molécula de ácido nucleico. La escisión puede iniciarse mediante una variedad de métodos, que incluyen, pero no se limitan a, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Son posibles tanto la escisión de cadena sencilla como la escisión de cadena doble. La escisión de una sola cadena puede ocurrir como resultado de dos eventos distintos de escisión de una sola cadena. La escisión del ADN puede dar lugar a la producción de extremos romos o escalonados. En ciertas modalidades, se pueden usar polipéptidos de fusión para dirigirse al ADN de cadena doble escindido.

[0319] Como se usa en el presente documento, el término "complementario" como se usa en relación con el ácido nucleico, se refiere al emparejamiento de bases, A con T o U, y G con C. El término complementario se refiere a moléculas de ácido nucleico que son completamente complementarias, es decir, forman pares A a T o U y pares G a C en toda la secuencia de referencia, así como también moléculas que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 99%

complementarias.

[0320] Como se usa en el presente documento, el término modificaciones de secuencias conservadoras" pretende referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándares conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*por ejemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina), cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (*por ejemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas

(por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo se pueden reemplazar con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y se puede probar la capacidad del anticuerpo alterado para unirse a antígenos usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

[0321] Como se usa en el presente documento, el término "ligando co-estimulador" incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una aAPC, una célula dendrítica, una célula B y similares) que se une específicamente a una molécula co-estimuladora similar en una célula T, proporcionando así una señal que, además de la señal primaria proporcionada, por ejemplo, por la unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula MHC cargada con péptido, media una respuesta de células T, que incluye, pero no se limita a, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando co-estimulador puede incluir, pero no se limita a, CD2, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando co-estimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor beta de linfotoxina, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, un agonista o anticuerpo que se une al Receptor de Ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando co-estimulador también abarca, entre otros, un anticuerpo que se

une específicamente con una molécula co-estimuladora presente en una célula T, tal como, pero no limitado a, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente a CD83.

[00322] Como se usa en el presente documento, una "molécula co-estimuladora" se refiere al asociado de unión cognato en una célula T que se une específicamente con un ligando co-estimulador, mediando así una respuesta co-estimuladora por parte de la célula T, tal como, pero no limitado a, proliferación. Las moléculas co-estimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que contribuyen a una respuesta inmune eficiente. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, una molécula de MHC de clase I, BTLA, un receptor de ligando Toll, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), PD-1, CD7, LIGHT, CD83L, DAP10, DAP12, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40, ICOS (CD278), NKG2C, B7-H3 (CD276), y un dominio intracelular derivado a partir de un receptor similar a inmunoglobulina asesina (KIR). En algunas modalidades, una molécula co-estimuladora incluye OX40, CD27, CD2, CD28, ICOS (CD278), y 4-1BB (CD137). Ejemplos adicionales de tales moléculas coestimuladoras incluyen CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD160, CD19, CD4, CD8alfa, CD8beta, IL2R beta, IL2R gamma,

IL7R alfa, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, y un ligando que se une específicamente con CD83.

[00323] Como se usa en el presente documento, el término "señal co-estimuladora" se refiere a una señal que, en combinación con una señal primaria, tal como la ligadura de TCR/CD3, conduce a la proliferación de células T y/o a la regulación positiva o negativa de moléculas clave. Un dominio de señalización intracelular co-estimulador puede ser la porción intracelular de una molécula co-estimuladora. Una molécula co-estimuladora puede estar representada en las siguientes familias de proteínas: proteínas receptoras de TNF, proteínas similares a inmunoglobulinas, receptores de citocinas, integrinas, moléculas de activación linfocítica de señalización (proteínas SLAM) y receptores activadores de células NK. Ejemplos de tales moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, ICAM-1, antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), CD2, CDS., CD7, CD287, LIGHT, NKG2C, NKG2D, SLAMF7, NKp80,

NKp30, NKp44, NKp46, CD160, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83, y similares.

[00324] Como se utiliza en el presente documento, el término "CRISPR" se refiere a un sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas. El término "sistema CRISPR", "CRISPR/Cas", "sistema CRISPR/Cas" o "CRISPR" se refiere a loci de ADN que contienen repeticiones cortas de secuencias de bases. Cada repetición va seguida de segmentos cortos de ADN espaciador de exposiciones previas a un virus. Las bacterias y las arqueas han desarrollado defensas inmunes adaptativas denominadas sistemas CRISPR-Asociados a CRISPR (Cas) que utilizan ARN corto para dirigir la degradación de ácidos nucleicos extraños. En las bacterias, el sistema CRISPR proporciona inmunidad adquirida contra la invasión de ADN extraño mediante la escisión del ADN guiada por ARN. En el sistema CRISPR/Cas de tipo II, segmentos cortos de ADN extraño, denominados "espaciadores", se integran dentro de los loci genómicos CRISPR y se transcriben y procesan en ARN CRISPR corto (ARNcr). Estos ARNcr se hibridan con ARNcr transactivadores (traARNcr) y dirigen la escisión específica de secuencia y el silenciamiento del ADN patógeno por parte de las proteínas Cas. Trabajos recientes han demostrado que el reconocimiento del objetivo por parte de la proteína Cas9 requiere una secuencia "semilla" dentro del ARNcr y una secuencia de motivo adyacente protoespaciador (PAM) que

contiene dinucleótidos conservada corriente arriba de la región de unión al ARNcr.

[00325] En algunas modalidades, el término "sistema CRISPR", "CRISPR/Cas", "sistema CRISPR/Cas" o "CRISPR" se refiere a un conjunto de moléculas que comprenden una nucleasa guiada por ARN u otra molécula efectora y una molécula de ARNg que juntas son necesarias y suficientes para dirigir y efectuar la modificación del ácido nucleico en una secuencia objetivo mediante la nucleasa guiada por ARN u otra molécula efectora. En algunas modalidades, un sistema CRISPR comprende un ARNg y una proteína Cas, por ejemplo, Cas3, Cas4, Cas8a, Cas8b, Cas9, Cas10, Cas10d, Cas12a, Cas12b, Cas12d, Cas12e, Cas12f, Cas12g, Cas12h, Cas12i, Cas13. Proteína Cas14, CasX, Cse1, Csy1, Csn2, Cpf1, C2c1, Csm2, Cmr5, Fok1, *S. pyogenes* Cas9 (spCas9) o *Staphylococcus aureus* Cas9 (saCas9). Tales sistemas que comprenden una molécula Cas o Cas modificada se denominan en el presente documento "sistemas Cas" o "sistemas CRISPR/Cas". En algunas modalidades, la molécula de ARNg y la molécula de Cas pueden formar complejos para formar un complejo de proteína ribonuclear (RNP).

[00326] Para dirigir a Cas9 para que escinda secuencias de interés, se pueden diseñar transcritos de fusión de ARNcr-ARNtracr, en lo sucesivo denominados "ARN guía" o "ARNg", a partir del promotor de la polimerasa III U6 humana. La edición y regulación del genoma mediada por

CRISPR/CAS destacó su potencial transformador para la ciencia básica, la ingeniería celular y la terapéutica.

[00327] Como se utiliza en el presente documento, el término "ARNcr", tal como se usa en relación con una molécula de ARNg, es una porción de la molécula de ARNg que comprende un dominio objetivo y una región que interactúa con un tracr para formar una región de mástil.

[00328] Como se utiliza en el presente documento, el término "CRISPRi" se refiere a un sistema CRISPR para la represión o inhibición de la expresión génica de secuencia específica, tal como a nivel transcripcional.

[00329] Como se utiliza en el presente documento, el término "Derivado de" se refiere a una relación entre una primera y una segunda molécula. Define una similitud estructural entre la primera molécula y una segunda molécula y no connota ni incluye una limitación de proceso o fuente en una primera molécula que se deriva de una segunda molécula. Por ejemplo, en el caso de un dominio de señalización intracelular que se deriva de una molécula de CD3zeta, el dominio de señalización intracelular conserva suficiente estructura de CD3zeta para que tenga la función requerida, es decir, la capacidad de generar una señal en las condiciones apropiadas. No connota ni incluye una limitación a un proceso particular de producción del dominio de

señalización intracelular. No significa que, para proporcionar el dominio de señalización intracelular, uno deba comenzar con una secuencia CD3zeta y eliminar la secuencia no deseada, o imponer mutaciones, para llegar en el dominio de señalización intracelular.

[00330] Como se utiliza en el presente documento, el término "enfermedad" se refiere a un estado de salud de un animal en donde el animal no puede mantener la homeostasis y en donde, si la enfermedad no mejora, la salud del animal continúa deteriorándose. Por el contrario, el término "trastorno" en un animal se refiere a un estado de salud en donde el animal es capaz de mantener la homeostasis, pero en donde el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si no se trata, un trastorno no provoca necesariamente una mayor disminución del estado de salud del animal.

[00331] Como se utiliza en el presente documento, "enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral" incluye, pero no se limita a, una enfermedad asociada con la expresión de un antígeno tumoral o una condición asociada con células que expresan un antígeno tumoral que incluye, pero no se limita a, enfermedades proliferativas tales como como un cáncer o una neoplasia maligna o una condición precancerosa tal como una mielodisplasia, un síndrome mielodisplásico o una preleucemia; o una indicación no relacionada con el cáncer asociada con

células que expresan un antígeno tumoral. En algunas modalidades, un cáncer asociado con la expresión de un antígeno tumoral es un cáncer hematológico. En algunas modalidades, un cáncer asociado con la expresión de un antígeno tumoral es un cáncer sólido. Otras enfermedades asociadas con la expresión de un antígeno tumoral incluyen, pero no se limitan a, cánceres, neoplasias malignas, afecciones precancerosas o enfermedades proliferativas atípicas y/o no clásicas asociadas con la expresión de un antígeno tumoral. Las indicaciones no relacionadas con el cáncer asociadas con la expresión de un antígeno tumoral incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunes (*por ejemplo*, lupus), trastornos inflamatorios (alergia y asma) y trasplantes. En algunas modalidades, las células que expresan el antígeno tumoral expresan, o expresan en cualquier momento, ARNm que codifica el antígeno tumoral. En algunas modalidades, las células que expresan el antígeno tumoral producen la proteína del antígeno tumoral (*por ejemplo*, de tipo silvestre o mutante), y la proteína del antígeno tumoral puede estar presente en niveles normales o en niveles reducidos. En alguna modalidad, las células que expresan el antígeno tumoral produjeron niveles detectables de una proteína del antígeno tumoral en un punto, y posteriormente no produjeron sustancialmente ninguna proteína del antígeno tumoral detectable.

[00332]

Como se utiliza en el

presente documento, el término "regulación negativa" se refiere a la disminución o eliminación de la expresión genética de uno o más genes.

[00333] Como se utiliza en el presente documento, el término "codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido (tal como un gen, un ADNc o un ARNm), para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (*por ejemplo*, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de la misma. Por tanto, un gen, ADNc o ARN codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y normalmente se proporciona en listas de secuencias, tal como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, puede denominarse codificante de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir

intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener en alguna versión uno o más intrones.

[00334] "Cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a una cantidad de un compuesto, formulación, material, agente farmacéutico o composición, como se describe en el presente documento, efectiva para lograr un resultado fisiológico, terapéutico o profiláctico deseado en un sujeto que lo necesita. Tales resultados pueden incluir, pero no se limitan a, una cantidad que, cuando se administra a un mamífero, provoca un nivel detectable de respuesta inmune en comparación con la respuesta inmune detectada en ausencia de la composición de la invención. La respuesta inmune puede evaluarse fácilmente mediante una gran cantidad de métodos reconocidos en la técnica. El experto entenderá que la cantidad de la composición administrada en el presente documento varía y puede determinarse fácilmente basándose en una serie de factores tales como la enfermedad o condición que se está tratando, la edad y la salud y la condición física del mamífero que se está tratando, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular que se administra, y similares. La cantidad efectiva puede variar entre sujetos dependiendo de la salud y condición física del sujeto que será tratado, el grupo taxonómico de los sujetos que serán

tratados, la formulación de la composición, la evaluación de la condición médica del sujeto y otros factores relevantes.

[00335] Como se utiliza en el presente documento, el término "endógeno" se refiere a cualquier material procedente de un organismo, célula, tejido o sistema o producido dentro de él.

[00336] Como se utiliza en el presente documento, el término "expandir" como se utiliza en el presente documento se refiere a un aumento en el número, como en un aumento en el número de células inmunitarias (*por ejemplo*, células T). En algunas modalidades, las células inmunitarias (*por ejemplo*, células T) que se expanden *ex vivo* aumentan en número con respecto al número originalmente presente en el cultivo. En otra modalidad, las células inmunitarias (*por ejemplo*, células T) que se expanden *ex vivo* aumentan en número en relación con otros tipos de células en el cultivo.

[00337] Como se utiliza en el presente documento, el término "expresión" se refiere a la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular impulsada por un promotor.

[00338] Como se utiliza en el presente documento, el término "exógeno" se refiere a cualquier material introducido o producido fuera de un organismo, célula, tejido o sistema.

[00339] Como se utiliza en el

presente documento, el término "vector de expresión" se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión unidas operablemente a una secuencia de nucleótidos que se va a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula hospedera o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (*por ejemplo*, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (*por ejemplo*, virus Sendai, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

[00340] Como se utiliza en el presente documento, el término "ex vivo" se refiere a células que se han extraído de un organismo vivo (*por ejemplo*, un ser humano) y se han propagado fuera del organismo (*por ejemplo*, en una placa de cultivo, tubo de ensayo o biorreactor).

[00341] Como se utiliza en el presente documento, el término "mástil" usado en relación con una molécula de ARNg, se refiere a una porción de un ARNg donde el ARNcr y el tracr se unen o se hibridan entre sí.

[00342] Como se utiliza en el presente documento, los términos "ARN guía", "molécula de ARN guía", "molécula de ARNg" o "ARNg" se usan indistintamente y se refieren a un conjunto de moléculas de ácido nucleico que

promueven la dirección específica de una nucleasa guiada por ARN u otra molécula efectora (típicamente en complejo con la molécula de ARNg) a una secuencia objetivo. En algunas modalidades, tal dirección se logra mediante la hibridación de una porción del ARNg con ADN (*por ejemplo*, a través del dominio de direccionamiento de ARNg) y mediante la unión de una porción de la molécula de ARNg a la nucleasa guiada por ARN u otra molécula efectora (*por ejemplo*, a través de al menos el tracr de ARNg). En algunas modalidades, una molécula de ARNg consiste en una única molécula de polinucleótido contigua, denominada en el presente documento una "ARN guía único" o "ARNg" y similares. En algunas modalidades, una molécula de ARNg consiste de una pluralidad, en general dos, moléculas de polinucleótidos, que son en sí mismas capaces de asociación, en general a través de hibridación, denominada en el presente documento "ARN guía dual" o "ARNdg" y similares. Las moléculas de ARNg se describen con más detalle a continuación, pero en general incluyen un dominio objetivo y un tracr. En algunas modalidades, el dominio de direccionamiento y el tracr están dispuestos en un único polinucleótido. En otras modalidades, el dominio de direccionamiento y el tracr están dispuestos en polinucleótidos separados.

[00343]

Como se utiliza en el presente documento, el término "homólogo" se refiere a la identidad de secuencia de subunidades entre dos moléculas

poliméricas (por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN), o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, entonces son homólogas en esa posición. Por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las dos moléculas de ADN son homólogas. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas. Por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50% homólogas; si el 90% de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10) son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son 90% homólogas.

[00344] Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpos humanizados" se refiere a formas humanas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) y son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión al antígeno), que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se

reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, rata o conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o en las secuencias estructurales. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar aún más el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. De manera óptima, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); Presta, Curr. op. Estructura. Biol. 2: 593-596 (1992).

[00345] Como se utiliza en el presente documento, el término "completamente humano" se refiere a una inmunoglobulina, tal como un anticuerpo, donde la molécula completa es de origen humano o consiste de una

secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo.

[00346] Como se utiliza en el presente documento, el término "identidad" se refiere a la identidad de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, particularmente entre dos moléculas de aminoácidos, tales como, entre dos moléculas de polipéptido. Cuando dos secuencias de aminoácidos tienen los mismos residuos en las mismas posiciones, entonces son idénticas en esa posición. Por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas polipeptídicas está ocupada por una arginina, entonces los dos polipéptidos son idénticos. La identidad o el grado en que dos secuencias de aminoácidos tienen los mismos residuos en las mismas posiciones en una alineación a menudo se expresa como porcentaje. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos es una función directa del número de posiciones coincidentes o idénticas. Por ejemplo, si la mitad (por *ejemplo*, cinco posiciones en un polímero de diez aminoácidos de longitud) de las posiciones en dos secuencias son idénticas, las dos secuencias son idénticas en un 50%; si el 90% de las posiciones (por *ejemplo*, 9 de 10) coinciden o son idénticas, las dos secuencias de aminoácidos son idénticas en un 90%.

[00347] Como se utiliza en el presente documento, el término "inmunoglobulina" o "Ig" define una clase de proteínas que funcionan como anticuerpos.

Los anticuerpos expresados por las células B a veces se denominan BCR (receptor de células B) o receptor de antígeno. Los cinco miembros incluidos en esta clase de proteínas son IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. La IgA es el anticuerpo primario que está presente en las secreciones corporales, tales como la saliva, las lágrimas, la leche materna, las secreciones gastrointestinales y las secreciones mucosas de los tractos respiratorio y genitourinario. La IgG es el anticuerpo circulante más común. La IgM es la principal inmunoglobulina producida en la respuesta inmune primaria en la mayoría de los sujetos. Es la inmunoglobulina más efectiva en la aglutinación, la fijación del complemento y otras respuestas de anticuerpos, y es importante en la defensa contra bacterias y virus. La IgD es la inmunoglobulina que no tiene función de anticuerpo conocida, pero que puede servir como receptor de antígeno. La IgE es la inmunoglobulina que media la hipersensibilidad inmediata al provocar la liberación de mediadores de los mastocitos y basófilos después de la exposición al alérgeno.

[00348] Como se utiliza en el presente documento, el término "respuesta inmune" como se utiliza en el presente documento se define como una respuesta celular a un antígeno que ocurre cuando los linfocitos identifican moléculas antigénicas como extrañas e inducen la formación de anticuerpos y/o activan los linfocitos para eliminar el antígeno.

[00349] Como se utiliza en el presente documento, el término "célula efectora inmune" se refiere a una célula que está involucrada en una respuesta inmune, *por ejemplo*, en la promoción de una respuesta efectora inmune. Ejemplos de células efectoras inmunes incluyen células T (por ejemplo, células T alfa/eta y células T gamma/delta), células B, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT), mastocitos y fagocitos derivados de mieloide.

[0350] Como se utiliza en el presente documento, el término "función efectora inmune o respuesta efectora inmune" se refiere a una función o respuesta que mejora o promueve un ataque inmune de una célula objetivo. En alguna modalidad, una función o respuesta efectora inmune se refiere a una propiedad de una célula T o NK que promueve la destrucción o la inhibición del crecimiento o la proliferación de una célula objetivo. En el caso de una célula T, la estimulación primaria y la coestimulación son ejemplos de función o respuesta efectora inmune.

[0351] Como se usa en el presente documento, el término "molécula inhibidora" se refiere a una molécula que, cuando se activa, causa o contribuye a una inhibición de la supervivencia, activación, proliferación y/o función celular; y el gen que codifica tal molécula y sus elementos reguladores asociados (*por ejemplo*, promotores). En

algunas modalidades, una molécula inhibidora es una molécula expresada en una célula efectora inmune (*por ejemplo*, en una célula T). Ejemplos no limitantes de moléculas inhibidoras son PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, CEACAM (*por ejemplo*, CEACAM-1, CEACAM-3 y/o CEACAM-5), VISTA, TGFβIIR, VSIG3, VSIG 8, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3 (CD276), B7- H4 (VTCN1), HVEM (TNFRSF14 o CD107), KIR, A2aR, MHC clase I, MHC clase II, GAL9, adenosina, y TGF beta. Se entenderá que el término molécula inhibidora se refiere al gen (y sus elementos reguladores asociados) que codifica una molécula proteica inhibidora cuando se usa en conjunto con una secuencia objetivo o una molécula de ARNg. En algunas modalidades, el gen que codifica la molécula inhibidora es BTLA, PD-1, TIM-3, VSIG3, VSIG8, CTLA4, o TGFβIIR. En algunas modalidades, el gen que codifica a la molécula inhibidora es VSIG3. En algunas modalidades, el gen que codifica a la molécula inhibidora es PD-1. En algunas modalidades, el gen que codifica a la molécula inhibidora es TGFβIIR.

[00352] Como se utiliza en el presente documento, el término el término "célula troncal pluripotente inducida" o "célula iPS" se refiere a una célula troncal pluripotente que se genera a partir de células adultas, tales como células inmunitarias (es decir, células T). La expresión de factores de reprogramación, tales como Klf4, Oct3/4 y Sox2, en células adultas convierte a las células en células pluripotentes capaces de propagarse y

diferenciarse en múltiples tipos de células.

[00353] Como se utiliza en el presente documento, el término "material de instrucción" incluye una publicación, una grabación, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de las composiciones y métodos de la invención. El material instructivo del kit de la invención puede, por ejemplo, fijarse a un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención o enviarse junto con un recipiente que contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición de la invención, o sea transportado junto con un contenedor el cual contiene el ácido nucleico, péptido y/o composición. Alternativamente, el material de instrucción puede enviarse por separado del contenedor con la intención de que el destinatario utilice de manera cooperativa el material de instrucción y el compuesto.

[00354] Como se utiliza en el presente documento, el término "aislado" significa alterado o eliminado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente naturalmente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcial o completamente de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico o una proteína aislados pueden existir en forma sustancialmente purificada o pueden existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedera.

[00355] Como se utiliza en el presente documento, el término "inactivado" se refiere a la ablación de la expresión genética de uno o más genes.

[00356] Como se utiliza en el presente documento, el término "lentivirus" se refiere a un género de la familia Retroviridae. Los lentivirus son únicos entre los retrovirus porque pueden infectar células que no se dividen; pueden suministrar una cantidad significativa de información genética al ADN de la célula hospedera, por lo que son uno de los métodos más eficientes de un vector de suministro de genes. Los HIV, SIV y FIV son todos ejemplos de lentivirus. Los vectores derivados de lentivirus ofrecen los medios para lograr niveles significativos de transferencia de genes *in vivo*.

[00357] Como se utiliza en el presente documento, el término "enlazador polipeptídico flexible" o "enlazador" como se usa en el contexto de un scFv se refiere a un enlazador peptídico que consiste de aminoácidos tales como residuos de glicina y/o serina usados solos o en combinación, para unir regiones variables de cadena pesada y ligera juntas. En una modalidad, el enlazador polipeptídico flexible es un enlazador Gly/Ser y comprende la secuencia de aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser) n , donde n es un número entero positivo igual o mayor que 1. Por ejemplo, $n=1$, $n=2$, $n=3$, $n=4$, $n=5$ y $n=6$, $n=7$, $n=8$, $n=9$ y $n=10$ (SEQ ID NO:6592). En una modalidad, los enlazadores polipeptídicos

flexibles incluyen, pero no se limitan a, (Gly4 Ser)4 o (Gly4 Ser)3. En otra modalidad, los enlazadores incluyen múltiples repeticiones de (Gly2Ser), (GlySer) o (Gly3Ser).

[00358] Como se utiliza en el presente documento, el término "modificado" significa un estado o estructura modificada de una molécula o célula de la invención. Las moléculas pueden modificarse de muchas maneras, incluidas química, estructural y funcionalmente. Las células pueden modificarse mediante la introducción de ácidos nucleicos.

[00359] Como se utiliza en el presente documento, el término "modulación" significa mediar en un aumento o disminución detectable en el nivel de una respuesta en un sujeto en comparación con el nivel de una respuesta en el sujeto en ausencia de un tratamiento o compuesto, y/o en comparación con el nivel de una respuesta en un sujeto por lo demás idéntico pero no tratado. El término abarca perturbar y/o afectar una señal o respuesta nativa, mediando así una respuesta terapéutica benéfica en un sujeto, preferiblemente, un ser humano.

[00360] En el contexto de la presente invención, se utilizan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos habituales. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citosina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina y "U" se refiere a uridina.

[00361] A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN también puede incluir intrones en la medida en que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína puede contener en alguna versión uno o más intrones.

[00362] Como se utiliza en el presente documento, el término "operablemente ligado" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia reguladora y una secuencia de ácido nucleico heteróloga que da como resultado la expresión de esta última. Por ejemplo, una primera secuencia de ácido nucleico se une operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está operablemente ligado a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

[00363] Como se utiliza en el presente documento, el término antígeno tumoral

"sobreexpresado" o "sobreexpresión" de un antígeno tumoral pretende indicar un nivel anormal de expresión de un antígeno tumoral en una célula de un área de enfermedad como un tumor sólido dentro de un tejido u órgano específico del paciente en relación con el nivel de expresión en una célula normal de ese tejido u órgano. Los pacientes que tienen tumores sólidos o una neoplasia maligna hematológica caracterizada por la sobreexpresión del antígeno tumoral pueden determinarse mediante ensayos estándar conocidos en la técnica.

[00364] Como se utiliza en el presente documento, el término administración "parenteral" de una composición inmunogénica incluye, *por ejemplo*, inyección subcutánea (sc), intravenosa (iv), intramuscular (im) o intraesternal, o técnicas de infusión.

[00365] Como se utiliza en el presente documento, el término "polinucleótido" como se utiliza en el presente documento se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Por tanto, los ácidos nucleicos y polinucleótidos como se utilizan en el presente documento son intercambiables. Un experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que pueden hidrolizarse en los "nucleótidos" monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Como se usan en el presente documento, los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, todas las

secuencias de ácidos nucleicos que se obtienen mediante cualquier medio disponible en la técnica, incluidos, pero no limitados a, medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácidos nucleicos de una biblioteca recombinante o de un genoma celular, usando tecnología de clonación ordinaria y PCR™, y similares, y por medios sintéticos.

[00366] Como se utilizan en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un compuesto comprendido por residuos de aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se impone ninguna limitación al número máximo de aminoácidos que pueden comprender la secuencia de una proteína o péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Como se utiliza en el presente documento, el término se refiere tanto a cadenas cortas, a las que también se hace referencia comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, a las que en general se hace referencia en la técnica como proteínas, de las cuales hay muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados,

derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o una combinación de los mismos.

[00367] Como se utiliza en el presente documento, el término "promotor" se define como una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de una secuencia de polinucleótidos.

[00368] Como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto de gen operablemente ligado a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos, esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto de gen. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que exprese el producto de gen de una manera específica de tejido.

[00369] Como se utiliza en el presente documento, el término "promotor constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto

de gen, hace que el producto de gen se produzca en una célula en la mayoría o en todas las condiciones fisiológicas de la célula.

[00370] Como se utiliza en el presente documento, el término "promotor inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica o especifica un producto de gen, hace que el producto de gen se produzca en una célula sustancialmente sólo cuando se utiliza un inductor que corresponde al promotor. está presente en la célula.

[00371] Como se utiliza en el presente documento, el término "promotor específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se une operativamente con un polinucleótido que codifica o se especifica por un gen, hace que el producto de gen se produzca en una célula sustancialmente sólo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

[00372] Como se utiliza en el presente documento, el término "virus Sendai" se refiere a un género de la familia *Paramyxoviridae*. Los virus Sendai son virus de ARN de cadena sencilla negativos que no se integran en el genoma del huésped ni alteran la información genética de la célula hospedera. Los virus Sendai tienen una gama de hospederos excepcionalmente amplia y no son patógenos para los humanos. Utilizados como vector viral recombinante, los virus Sendai son capaces de una expresión genética

transitoria pero fuerte.

[0373] Como se utiliza en el presente documento, el término "trayectoria de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señales que desempeñan un papel en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. La frase "receptor de superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y transmitirla a través de la membrana plasmática de una célula.

[0374] Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpos de cadena sencilla" se refiere a anticuerpos formados mediante técnicas de ADN recombinante en las que fragmentos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas se unen a la región Fv mediante una serie de aminoácidos diseñados por ingeniería genética. Se conocen varios métodos para generar anticuerpos de cadena sencilla, que incluyen aquellos descritos en la Patente Estadounidense No. 4,694,778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); Ward et al., Nature 334:544-548 (1989); Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988).

[00375] Como se utiliza en el presente documento, el término "especificidad" se refiere a la capacidad de unirse específicamente (por ejemplo, inmunorreaccionar con) un antígeno objetivo determinado (por

ejemplo, un antígeno objetivo humano). Un receptor de antígeno quimérico puede ser monoespecífico y contener uno o más sitios de unión que se unen específicamente a un objetivo o un receptor de antígeno quimérico puede ser multiespecífico y contener dos o más sitios de unión que se unen específicamente al mismo o diferentes objetivos. En ciertas modalidades, un receptor de antígeno quimérico es específico para dos porciones diferentes (*por ejemplo*, no superpuestas) del mismo objetivo. En ciertas modalidades, un receptor de antígeno quimérico es específico para más de un objetivo.

[00376]

Como se usa en el presente documento, el término "se une específicamente", con respecto a un anticuerpo, significa un anticuerpo o fragmento de unión del mismo (*por ejemplo*, scFv) que reconoce un antígeno específico, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de una especie también puede unirse a ese antígeno de una o más especies. Pero tal reactividad entre especies no altera en sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En otro ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno. Sin embargo, tal reactividad cruzada no altera por sí misma la clasificación de un anticuerpo como específico. En algunos casos, los términos "unión específica" o "que se une específicamente" pueden usarse en referencia a

la interacción de un anticuerpo, una proteína, un receptor de antígeno quimérico o un péptido con una segunda especie química, para significar que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (*por ejemplo*, un determinante antigénico o epítipo) en la especie química; por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de proteínas en general. Si un anticuerpo es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre y sin marcar), en una reacción que contiene la "A" marcada y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcada unida al anticuerpo.

[00377] Como se usa en el presente documento, el término "estimulación" significa una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimulante (*por ejemplo*, un complejo TCR/CD3) con su ligando cognato, mediando así un evento de transducción de señales, tal como, pero no limitado a, señal de transducción a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, tal como la regulación negativa de TGF-beta y/o la reorganización de estructuras citoesqueléticas, la expansión clonal y la diferenciación en subconjuntos distintos.

[00378] Como se utiliza en el presente documento, el término "molécula estimulante" significa una molécula en una célula T que se une

específicamente con un ligando estimulador cognato presente en una célula presentadora de antígeno.

[00379] Como se usa en el presente documento, el término "ligando estimulador" significa un ligando que cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (*por ejemplo*, una aAPC, una célula dendrítica, una célula B y similares) puede unirse específicamente con un asociado de unión cognato (denominada aquí como una "molécula estimulante") en una célula T, mediando así una respuesta primaria por parte de la célula T, que incluye, pero no se limita a, activación, inicio de una respuesta inmune, proliferación y similares. Los ligandos estimuladores son bien conocidos en la técnica y abarcan, entre otros, una molécula de MHC Clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo superagonista anti-CD28 y un anticuerpo superagonista anti-CD2.

[00380] Como se utilizan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente. Como se usa en el presente documento, un sujeto puede ser un mamífero, tal como un no primate (*por ejemplo*, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) o un primate (*por ejemplo*, mono y humano). En ciertas modalidades, el término "sujeto", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un vertebrado, tal como un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, humanos, primates no humanos, animales silvestres, animales

silvestres, animales de granja, animales deportivos y mascotas. Cualquier organismo vivo en donde se pueda provocar una respuesta inmune puede ser un sujeto o paciente. En ciertas modalidades ejemplares, un sujeto es un ser humano.

[00381] Como se utiliza en el presente documento, el término célula "sustancialmente purificada" es una célula que está esencialmente libre de otros tipos de células. Una célula sustancialmente purificada también se refiere a una célula que ha sido separada de otros tipos de células con los que normalmente está asociada en su estado natural. En algunos casos, una población de células sustancialmente purificadas se refiere a una población homogénea de células. En otros casos, este término se refiere simplemente a células que han sido separadas de las células con las que están asociadas naturalmente en su estado natural. En algunas modalidades, las células se cultivan *in vitro*. En otras modalidades, las células no se cultivan *in vitro*.

[00382] Como se usa en el presente documento, el término "sitio objetivo" o "secuencia objetivo" se refiere a una secuencia de ácido nucleico genómico que define una porción de un ácido nucleico a la que una molécula de unión puede unirse específicamente en condiciones suficientes para que se produzca la unión.

[00383] Como se utiliza en el presente documento, el término "dominio objetivo" utilizado en relación con un ARNg se refiere a una porción de la

molécula de ARNg que reconoce una secuencia objetivo o es complementaria de ella. Por ejemplo, una secuencia objetivo dentro del ácido nucleico de una célula (*por ejemplo*, dentro de un gen).

[00384] Como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia objetivo" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos complementaria, por ejemplo totalmente complementaria, a un dominio dirigido a ARNg. En algunas modalidades, la secuencia objetivo está dispuesta en ADN genómico. En alguna modalidad, la secuencia objetivo es adyacente (ya sea en la misma cadena o en la cadena complementaria de ADN) a una secuencia de porción adyacente protoespaciadora (PAM) reconocida por una proteína que tiene actividad nucleasa u otra actividad efectora, por *ejemplo*, una secuencia PAM reconocida por Cas9. En algunas modalidades, la secuencia objetivo es una secuencia objetivo de una célula de células T alogeneica. En algunas modalidades, la secuencia objetivo es una secuencia objetivo de una molécula inhibidora. En algunas modalidades, la secuencia objetivo es una secuencia objetivo de un efector corriente abajo de una molécula inhibidora.

[00385] Como se usa en el presente documento, el término "receptor de células T" o "TCR" se refiere a un complejo de proteínas de membrana que participan en la activación de células T en respuesta a la presentación de antígeno. El TCR es responsable de reconocer antígenos

unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. El TCR está comprendido por un heterodímero de una cadena alfa (α) y beta (β), acoplado a tres módulos diméricos CD3 δ /CD3 ϵ , CD3 γ /CD3 ϵ y CD3 ζ /CD3 ζ . En algunas células, el TCR consiste de cadenas gamma y delta (γ/δ) (CD3 γ /CD3 ϵ). En algunas modalidades, los TCR pueden existir en formas alfa/beta y gamma/delta, que son estructuralmente similares pero tienen ubicaciones y funciones anatómicas distintas. Cada cadena está compuesta por dos dominios extracelulares, un dominio variable y uno constante. En algunas modalidades, el TCR puede modificarse en cualquier célula que comprenda un TCR, incluyendo, por ejemplo, una célula T auxiliar, una célula T citotóxica, una célula T de memoria, una célula T reguladora, una célula T asesina natural y una célula T gamma delta.

[00386] El término "terapéutico" como se usa en el presente documento significa un tratamiento y/o profilaxis. Un efecto terapéutico se obtiene mediante la supresión, remisión o erradicación de una enfermedad.

[00387] Como se usa en el presente documento, el término "terapia" se refiere a cualquier protocolo, método y/o agente (*por ejemplo*, un CAR-T) que puede usarse en la prevención, manejo, tratamiento y/o mejoramiento de una enfermedad o un síntoma relacionado con la misma. En algunas modalidades, los términos "terapias" y "terapia" se refieren a una terapia biológica (*por ejemplo*,

terapia celular adoptiva), terapia de apoyo (por ejemplo, terapia de agotamiento linfoide) y/u otras terapias útiles en la prevención, manejo, tratamiento y/o mejoramiento de una enfermedad o un síntoma relacionado con la misma, conocido por un experto en la técnica, tal como el personal médico.

[00388] Como se usa en el presente documento, el término "tracr" usado en relación con una molécula de ARNg se refiere a una porción del ARNg que se une a una nucleasa u otra molécula efectora. En algunas modalidades, el tracr comprende una secuencia de ácido nucleico que se une específicamente a Cas9. En algunas modalidades, el tracr comprende una secuencia de ácido nucleico que forma parte del mástil. Como se utiliza en el presente documento, el término "transfectado" o "transformado" o "transducido" se refiere a un proceso mediante el cual un ácido nucleico exógeno se transfiere o introduce en una célula hospedera. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es aquella que ha sido transfectada, transformada o transducida con un ácido nucleico exógeno. La célula incluye una célula sujeto primaria y su progenie.

[00389] Como se utilizan en el presente documento, los términos "trata", "tratamiento" y "tratar" se refieren a la reducción o mejoramiento de la progresión, gravedad, frecuencia y/o duración de una enfermedad o un síntoma relacionado con la misma, resultante de la administración de uno o más terapias (incluida, pero no

limitada a, una terapia CAR-T dirigida al tratamiento de tumores sólidos). El término "tratar", como se utiliza en el presente documento, también puede referirse a alterar el curso de la enfermedad del sujeto que está siendo tratado. Los efectos terapéuticos del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, la prevención de la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la disminución de las consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, la disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, el mejoramiento o paliación del estado de la enfermedad y remisión o mejor pronóstico.

[0390] Como se usa en el presente documento, el término "bajo control transcripcional" u "operablemente ligado" como se usa en el presente documento significa que el promotor está en la ubicación y orientación correctas en relación con un polinucleótido para controlar el inicio de la transcripción por la ARN polimerasa y la expresión del polinucleótido.

[00391] Como se utiliza en el presente documento, el término "vector" es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que puede usarse para administrar el ácido nucleico aislado al interior de una célula. Se conocen numerosos vectores en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Por tanto, el término "vector"

incluye un plásmido o un virus que se replica de forma autónoma. También se debe interpretar que el término incluye compuestos no plásmidos y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico al interior de las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, vectores virales de Sendai, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales y similares.

[00392] Como se utiliza en el presente documento, el término "xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un animal de una especie diferente.

[00393] Como se usa en el presente documento, los términos "medio completo" y "medios completos" se refieren a medios de cultivo celular que están optimizados para el crecimiento de células inmunitarias (*por ejemplo*, crecimiento de células T). En algunos casos, un medio completo comprende proteínas, sales inorgánicas, oligoelementos, vitaminas, aminoácidos, lípidos, carbohidratos, citocinas y/o factores de crecimiento, en los que la proporción de cada componente se ha optimizado para el crecimiento celular. Las proteínas ejemplares incluyen albúmina, transferrina, fibronectina e insulina. Los carbohidratos ejemplares incluyen glucosa. Las sales inorgánicas ejemplares incluyen iones de sodio, potasio y calcio. Los oligoelementos ejemplares incluyen zinc, cobre,

selenio y ácido tricarboxílico. Los aminoácidos ejemplares incluyen aminoácidos esenciales tales como L-glutamina (*por ejemplo*, alanil-l-glutamina o glicil-l-glutamina); o aminoácidos no esenciales (NEAA) tales como glicina, L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-prolina y/o L-serina. En algunas modalidades, el medio completo también comprende uno o más de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico), rojo de fenol, antibióticos y/o β-mercaptoetanol. En algunos casos, el medio completo es un medio libre de suero. En algunos casos, los medios completos son medios libres de xenos.

[00394] Como se utiliza en el presente documento, el término "medio químicamente definido" se refiere a un medio de cultivo celular en donde se conocen las composiciones y concentraciones de todos los componentes. Se diferencia de un medio completo en que el medio completo puede contener componentes, *por ejemplo*, componentes derivados de animales, en los que se desconoce la composición y/o concentración.

[00395] En algunos casos, un medio "libre de xenos" no contiene ningún componente de origen animal (no humano). En algunos casos, un medio libre de xenos contiene uno o más componentes de origen humano, tales como suero humano, factores de crecimiento e insulina.

[00396] En algunas modalidades, un

medio "libre de suero" no contiene suero o plasma pero puede contener componentes derivados de suero o plasma. En algunos casos, los medios "libres de suero" contienen componentes de origen animal, como la albúmina de suero bovina (BSA).

[00397] En alguna modalidad, un medio "mínimo" comprende las necesidades mínimas para el crecimiento de una célula objetivo. En algunos casos, el medio mínimo contiene sales inorgánicas, fuente de carbono y agua. En algunos casos, se añaden suplementos, citocinas y/o proteínas tales como albúmina (*por ejemplo*, HSA) al medio mínimo. Como se usa en el presente documento, los suplementos comprenden oligoelementos, vitaminas, aminoácidos, lípidos, carbohidratos, citocinas, factores de crecimiento o una combinación de los mismos.

[0398] Rangos: a lo largo de esta descripción, se pueden presentar varios aspectos de la invención en un formato de rango. Debe entenderse que la descripción en formato de rango es simplemente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible al alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un rango ha revelado específicamente todos los subrangos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un rango tal como de 1 a 6 tiene subrangos específicamente descritos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1

a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

EJEMPLOS

[0399] Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no para limitar el alcance de las reivindicaciones proporcionadas en este documento.

Ejemplo 1

[0400] Este ejemplo proporciona materiales y métodos utilizados para producir las nuevas células CART alogeneicas de la presente descripción.

[0401] *Expansiones primarias de células T humanas y criopreservación celular.* Las células T se incubaron a 1×10^6 células/mL en medio y se activaron usando Dynabeads® (ThermoFisher) al comienzo del cultivo. Las células se contaron cada dos días utilizando un contador de células automatizado NC200™ (Chemometec). Además, la viabilidad celular y el tamaño de las células se determinaron cada dos días. Las células se alimentaron con medio de células T nuevo y se resuspendieron a 5×10^5 células/ml. Del día 9 al 11, las células se recolectaron y se criopreservaron en medios de congelación que contienen DMSO al 5%.

[0402] *Análisis de citometría de flujo policromática.* Las células se lavaron y se

resuspendieron en amortiguador FACS (solución salina amortiguada con fosfato que contiene suero fetal de ternera al 5%). Se añadió a las células una mezcla maestra de anticuerpos conjugados con fluoróforos específicos. Las células se lavaron y resuspendieron en amortiguador FACS y se analizaron utilizando un citómetro MACSQuant® (Miltenyi). El panel de anticuerpos utilizado incluyó anti-CD3-VioBlue, anti-TCRab-APC, anti-B2M-PE-Vio770, anti-HLA-DR-VioGreen, anti-HLAI-ABC-FITC, anti-CAR-PE y 7AAD para evaluación de viabilidad. Se utilizó el software FlowJo® (BD Biosciences) para el análisis de datos.

[0403] *"Edición genética de células T humanas primarias"*. Se transfectaron ribonucleoproteínas (RNP) en forma de nucleasa conjugada con el ARN guía respectivo para cada objetivo en células T humanas. Las células se cultivaron en medios especiales para células T que contienen 5% de suero humano, IL-7, IL-15 y glutamina durante 5 a 8 días. Al finalizar los cultivos, se realizó citometría de flujo policromática para determinar simultáneamente el nivel de eficiencia de edición de genes para cada uno de los genes objetivo.

[0404] *Ensayo de citotoxicidad tumoral en tiempo real*. La capacidad citotóxica de las células T con CAR se evaluó utilizando el instrumento de análisis celular en tiempo real xCelligence™ (Agilent). Brevemente, se co-cultivaron células CAR T en placas de

microtitulación con células objetivo tumorales en diferentes proporciones de efector-objetivo (por ejemplo, 1:10, 1:5, 1:2,5, 1:1) durante varios días. La muerte de las células tumorales se determinó continuamente como el cambio en la impedancia celular medida para cada condición. Los datos se capturaron utilizando el software RTCA® (Agilent).

[0405] *Eficiencia de edición de genes mediante ensayo de endonucleasa T7E1.* Para determinar la eficiencia de la edición de genes a nivel molecular, se utilizó el ensayo de endonucleasa T7E1 adaptado a cada gen objetivo en particular. El ADN genómico total se aisló de las células T y se almacenó a -80°C o se usó directamente para el ensayo. Se realizaron reacciones de PCR utilizando cebadores que abarcaban el sitio de corte para cada objetivo. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel para validar el tamaño y la cantidad del amplicón. Luego, los amplicones de PCR se digirieron utilizando la nucleasa T7E1 y se analizaron utilizando un instrumento BioAnalyzer® de electroforesis automatizada de alta resolución 2100 (Agilent). Se utilizó el software 2100 Expert® para determinar la eficiencia de la edición de genes.

[0406] *Reacciones de leucocitos mixtos.* Se establecieron cocultivos de células T CAR alogeneicas con células T de un donante no emparentado (etiquetado como "2^{do}. donante") en diferentes proporciones y se siguieron durante 16 días. La muerte celular se determinó

mediante citometría de flujo utilizando marcadores específicos para diferenciar y rastrear cada tipo de célula en particular (es decir, células CART alogeneicas frente a células T del "2^{do}. Donante"). Se agregaron eBeads 123count™ antes de la citometría de flujo para determinar el número absoluto de células y se usó colorante 7AAD para evaluar la viabilidad celular.

Ejemplo 2

[0407] El propósito de este ejemplo fue detallar una estrategia de triple inactivación.

[0408] La Tabla 3 a continuación ilustra la nueva plataforma de células CART alogeneicas que comprende una estrategia de eliminación triple (combinación de inactivación de 3 genes) de la presente descripción. El procedimiento único implica dirigir a uno o más genes de los módulos de TCR (CD3 δ , CD3 ϵ y CD3 γ), uno o más genes de HLA-I y uno o más genes de HLA-II.

Tabla 3: Combinaciones de CRISPR			
	TCR	HLA-I	HLA-II
1	TRAC	B2M	C2TA
2	CD3 ϵ	B2M	C2TA
3	CD3 ϵ	B2M	RFX5
4	CD3 ϵ	B2M	RFXAP
5	CD3 ϵ	B2M	RFXANK
6	CD3 ϵ	B2M	HLA-DM
7	CD3 ϵ	TAP1	RFX5
8	CD3 ϵ	TAP1	RFXANK
9	CD3 ϵ	TAP1	RFXAP
10	CD3 ϵ	TAP1	HLA-DM
11	CD3 ϵ	NLRC5	RFX5
12	CD3 ϵ	NLRC5	RFXANK
13	CD3 ϵ	NLRC5	RFXAP
14	CD3 ϵ	NLRC5	HLA-DM
15	CD3 ϵ	TAP2	RFX5
16	CD3 ϵ	TAP2	RFXANK
17	CD3 ϵ	TAP2	RFXAP
18	CD3 ϵ	TAP2	HLA-DM
19	CD3 δ	B2M	C2TA
20	CD3 δ	B2M	RFX5
21	CD3 δ	B2M	RFXAP
22	CD3 δ	B2M	RFXANK
23	CD3 δ	B2M	HLA-DM
24	CD3 δ	TAP1	RFX5
25	CD3 δ	TAP1	RFXANK
26	CD3 δ	TAP1	RFXAP

Tabla 3: Combinaciones de CRISPR			
	TCR	HLA-I	HLA-II
27	CD3 δ	TAP1	HLA-DM
28	CD3 δ	NLRC5	RFX5
29	CD3 δ	NLRC5	RFXANK
30	CD3 δ	NLRC5	RFXAP
31	CD3 δ	NLRC5	HLA-DM
32	CD3 δ	TAP2	RFX5
33	CD3 δ	TAP2	RFXANK
34	CD3 δ	TAP2	RFXAP
35	CD3 δ	TAP2	HLA-DM
36	CD3 γ	B2M	C2TA
37	CD3 γ	B2M	RFX5
38	CD3 γ	B2M	RFXAP
39	CD3 γ	B2M	RFXANK
40	CD3 γ	B2M	HLA-DM
41	CD3 γ	TAP1	RFX5
42	CD3 γ	TAP1	RFXANK
43	CD3 γ	TAP1	RFXAP
44	CD3 γ	TAP1	HLA-DM
45	CD3 γ	NLRC5	RFX5
46	CD3 γ	NLRC5	RFXANK
47	CD3 γ	NLRC5	RFXAP
48	CD3 γ	NLRC5	HLA-DM
49	CD3 γ	TAP2	RFX5
50	CD3 γ	TAP2	RFXANK
51	CD3 γ	TAP2	RFXAP
52	CD3 γ	TAP2	HLA-DM

[0409] Se espera que la estrategia de eliminar múltiples genes produzca un producto de células T alogeneico mejorado.

Ejemplo 3

[0410] El propósito de este ejemplo fue preparar varios constructos como se describe en el presente documento, con al menos un gen inactivado.

[0411] La **Tabla 1** ilustra una nueva estrategia CART alogeneica de la presente descripción que implica la inactivación (KO) de subunidades alternativas del receptor de células T (CD3 δ , CD3 γ y CD3 ϵ) y genes críticos adicionales en las trayectorias de presentación y procesamiento de antígenos. En particular, se seleccionaron 15 objetivos genéticos y cada uno se probó con múltiples ARN guía (ARNg) utilizando el sistema de endonucleasa asociado a CRISPR (Cas) (CRISPR-Cas). Se describen ejemplos de ARNg utilizados para dirigirse a los 15 genes en la **Tabla 4**.

Tabla 4: ARNgs Ejemplares		
SEQ ID NO	Objetivos de Gen	Secuencia de ARNg (espaciador)
52	CD3épsilon	AGATCCAGGATACTGAGGGCA
53	CD3delta	TCTCTGGCCTGGTACTGGCTA
54	CD3gamma	GCTTCTGCATCACAAGTCAGA
55	B2M	TATCTCTTGTACTACACTGA
56	TAP1	GCTCTTGGAGCCAACCGTTG
57	TAP2	CTTCCTCAAGGGCTGCCAGGA
58	TAPBP_ARNg1	CCTACATGCCCCCACCTCC
59	TAPBP_ARNg2	CGCTCGCATCCTCCACGAAC
60	NLRC5	GTGAGCAGCCTCACAAGACAG
61	C2TA	CCTTGGGGCTCTGACAGGTA
62	HLA-DMA	CCAGAACACTCGGGTGCCTCG
63	RFX5_ARNg1	CAAGGCCGTGCAGAACAAAGT
64	RFX5_ARNg2	TTCTGCACGGCCTTGGAATG
65	RFXANK	CCTGCACCCCTGAGCCTGTGA
66	RFXAP	GAGGATCTAGAGGACGAGGAG
67	Cadena Ii_ARNg1	CATCCTGGTGACTCTGCTCCT
68	Cadena Ii_ARNg2	TCCAGCCGGCCCTGCTGCTGG

Ejemplo 4

[0412] El propósito de este ejemplo fue evaluar la eficacia de la inactivación de TCR α/β utilizando diferentes constructos centrados en la interrupción dirigida de CD3 δ (**Figura 2A**), CD3 ϵ (**Figura 2B**), y CD3 γ (**Figura 2C**).

[0413] El porcentaje de la eficiencia de interrupción de las cadenas TCR- α y TCR- β en células T humanas se mide por citometría de flujo después de la interrupción dirigida de genes CD3 δ (**Figura 2A**), CD3 ϵ (**Figura 2B**), y CD3 γ (**Figura 2C**) usando un sistema CRISPR/Cas. La **Figura 2A** muestra los resultados después de interrupción de CD3 δ usando cuatro diferentes ARNs guía: ARNg1, ARNg2, ARNg3, y ARNg4. La interrupción de CD3 δ usando ARNs guía ARNg1 y ARNg3 en el sistema CRISPR/Cas resultó en 100% de eficiencia de KO de TCR α/β , mientras el uso de ARNg2 y ARNg4 en el sistema CRISPR/Cas resultó en más de aproximadamente 90% de eficiencia de KO de TCR α/β . De este modo, el uso de ARNg1 y ARNg3 es preferido en un sistema CRISPR/Cas para interrumpir a CD3 δ .

[0414] La **Figura 2B** muestra los resultados después de la interrupción dirigida de CD3 ϵ usando cinco diferentes ARNs guía: ARNg1, ARNg2, ARNg3, ARNg4, y ARNg5. La interrupción de CD3 ϵ usando ARNs guías ARNg4 y ARNg5 en el sistema CRISPR/Cas resultó en 100% de eficiencia de KO de TCR α/β , mientras el uso de ARNg1 resultó en solamente aproximadamente a 50% de eficiencia de KO de TCR

α/β , y finalmente el uso de ARNg2 y ARNg3 guías en el sistema CRISPR/Cas resultó en más de aproximadamente 90% de eficiencia de KO de TCR α/β . De este modo, el uso de ARNs guía ARNg4 y ARNg5 es preferido en un sistema CRISPR/Cas para interrumpir a CD3 ϵ .

[0415] La **Figura 2C** muestra los resultados después de la interrupción dirigida de CD3 γ usando cinco diferentes ARNs guía: ARNg1, ARNg2, ARNg3, ARNg4, y ARNg5. La interrupción de CD3 ϵ usando ARNg4 y ARNs guía en el sistema CRISPR/Cas resultó en 100% de eficiencia de KO de TCR α/β , mientras el uso de ARNg5 resultó en a más de aproximadamente 95%KO de eficiencia de TCR α/β , y finalmente el uso de ARNs guía ARNg1, ARNg2 y ARNg3 en el sistema CRISPR/Cas resultó en eficiencia de KO menos favorable de TCR α/β . De este modo, el uso de ARN guía ARNg4 es preferido en un sistema CRISPR/Cas para interrumpir a CD3 γ .

Ejemplo 5

[0416] El propósito de este ejemplo fue evaluar la expansión de diferentes constructos de células CART alogeneicas durante un período de 10 días.

[0417] Los diferentes constructos probados incluyen células CART alogeneicas que comprenden: (1) inactivación de TRAC (ALO (TRAC KO) en la **Figura 3**) (por ejemplo, la inactivación usada antes de la presente descripción), (2) inactivación de CD3 δ (ALO (D1 KO) en la **Figura 3**), (3) inactivación de CD3 γ (ALO (G4 KO) en la **Figura**

3), y (4) inactivación de CD3 ϵ (ALO (E4 KO) en la **Figura 3**). El porcentaje del doble de la población celular se muestra en el eje Y mientras el número de días se muestra en el eje X. Los resultados se detallan en la **Figura 3**.

[0418] La **Figura 3** muestra una gráfica que ilustra la expansión de células CART alogeneicas generadas usando la estrategia de la Figura 1, e ilustra el número de duplicaciones de la población durante un periodo de diez días. Las células CART alogeneicas probadas son células T diseñadas por ingeniería genética que comprenden inactivación de TRAC (TRAC KO), inactivación de CD3 δ (D1 KO), inactivación de CD3 γ (G4 KO), e inactivación de CD3 ϵ (E4 KO).

Ejemplo 6

[0419] Este ejemplo evaluó varios constructos diferentes inactivados para comparar la expresión de superficie de la cadena TCR- α/β .

[0420] Las **Figuras 4A y 4B** muestran resultados de citometría de flujo comparando la regulación negativa mediada por CRISPR de inactivación de la cadena TCR- α (TRAC) (por ejemplo, el constructo usado antes de la presente descripción), inactivación de CD3 δ (D1 KO), inactivación de CD3 γ (G4 KO), e inactivación de CD3 ϵ (E4 KO). La **Figura 4A** muestra que la inactivación de CD3 ϵ (E4 KO) es un mejor objetivo para la inactivación del receptor de células T, como se mide por la expresión de superficie de la cadena TCR- α/β . La **Figura 4B** muestra que las células CART

alogeneicas que comprenden inactivación de CD3 ϵ (E4 KO) tienen elevada eficiencia de transducción y fueron funcionalmente mejor que las células CART que comprenden, por ejemplo inactivación de CD3 γ o CD3 δ ; se ilustra una modalidad de células PSMA CART.

Ejemplo 7

[0421] El propósito de este ejemplo fue evaluar la capacidad de destrucción de tumores de diferentes constructos de células PSMA CART.

[0422] La **Figura 5** muestra una gráfica que demuestra la capacidad de destrucción tumoral de células PSMA CART alogeneicas que comprenden la inactivación de la cadena TCR- α (TRAC) (por ejemplo, el constructo usado antes de la presente descripción), inactivación de CD3 δ (D1), inactivación de CD3 ϵ (E4), e inactivación de CD3 γ (G4). Los resultados ilustran que las células CART alogeneicas PSMA E4 tienen la mejor capacidad de destrucción. Las células objetivos fueron células PC3, las cuales son una línea de cáncer de células de cáncer de próstata humano.

[0423] Estos resultados fueron sorprendentes e inesperados porque no se esperaba que la alteración dirigida de una subunidad CD3 diera como resultado células CART alogeneicas más potentes en comparación con la alteración dirigida de las otras subunidades CD3. La Figura 5 demuestra el hallazgo inesperado de que las células alo CART dirigidas a CD3 ϵ (por ejemplo, inactivación de CD3 ϵ (E4))

fueron más potentes (es decir, matan las células tumorales mucho más rápido) en comparación con las células CART inactivadas de cadena α TCR- α , células CART de inactivación α CD3 δ (D1), células CART de inactivación α CD3 γ (G4).

Ejemplo 8

[0424] El propósito de este ejemplo fue evaluar la efectividad de la metodología CRISPR-Cas para efectuar una inactivación del gen objetivo. En particular,

[0425] Las **Figuras 6A-6D** muestran la actividad de CRISPR-Cas ilustrada con el ensayo de detección de desemparejamiento de endonucleasa T7 (T7E1). La **Figura 6A** muestra una imagen de electroforesis en gel representativa de productos de PCR tratados con T7E1 amplificados a partir de los sitios de tres diferentes genes CRISPR-Cas C2TA (CIITA) usando tres diferentes ARNg. Las **Figuras 6B-7D** muestran electroferogramas generados por electroferograma Bioanalizador Agilent del ensayo de endonucleasa T7E1 demostrando la eficiencia de edición CRISPR-Cas.

[0426] Además, las **Figuras 7A-D** muestran electroferogramas de Bioanalizador Agilent y electroforesis de gel de PCR tratado con T7E1 y de control ilustrando resultados de eficiencia de edición CRISPR de C2TA (CIITA).

Ejemplo 9

[0427] El propósito de este ejemplo

fue determinar la viabilidad de diferentes tipos de células.

[0428] Se condujo un ensayo de linfocito mezclado (MLA). La **Figura 8** muestra una gráfica que ilustra el resultado del ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR) con alo células solas, células T (segundo donante) solas, alo células en co-cultivo y células T (segundo donante) en co-cultivo. En particular, las células T del receptor (células T de un donante diferente) se co-cultivaron con células CART alogeneicas durante 14 días y se analizó la proliferación de células T.

[0429] Los resultados demuestran la viabilidad de las células T de control (2^{do}. donante), células PSMA CART alogeneicas solas o en co-cultivo, y muestran que las células T "del receptor" no reaccionaron (no proliferaron) a la presencia de células alogeneicas. Por lo tanto, la Figura 8 muestra que las células T de un 2^{do}. donante (irrelevante) no proliferaron en respuesta a células PSMA CART alogeneicas en co-cultivo a pesar de la presencia de un desemparejamiento de HLA. Las CART alogeneica comprenden PSMA CART y ARNg TRAC/B2M/C2TA editadas con CRISPR. Por consiguiente, las células CART alogeneicas de la presente invención tendrán una ventana de oportunidad para destruir células tumorales sin ser detectadas por el sistema inmunológico del receptor (es decir, células T).

[0430] Si bien se han ilustrado y descrito ciertas modalidades, debe entenderse que se pueden

realizar cambios y modificaciones en las mismas de conformidad con los conocimientos habituales en la técnica sin apartarse de la tecnología en sus aspectos más amplios como se define en las siguientes reivindicaciones.

[0431] Las modalidades, descritas ilustrativamente en el presente documento, pueden practicarse adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritas específicamente en el presente documento. De este modo, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc. se leerán de manera amplia y sin limitación. Además, se entenderá que la frase "que consiste esencialmente de" incluye aquellos elementos específicamente listados y aquellos elementos adicionales que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la tecnología reivindicada. La frase "que consiste de" excluye cualquier elemento no especificado.

[0432] Además, cuando las características o aspectos de la descripción se describen en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la descripción también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

[0433] Como entenderá un experto en la técnica, para todos y cada uno de los fines, particularmente en términos de proporcionar una descripción

escrita, todos los rangos descritos en el presente documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subrangos y combinaciones de subrangos de los mismos, incluidos los puntos finales. Se puede reconocer fácilmente que cualquier rango listado describe suficientemente y permite dividir el mismo rango en al menos mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como ejemplo no limitante, cada rango discutido en el presente documento se puede descomponer fácilmente en un tercio inferior, un tercio medio y un tercio superior, etc. Como también entenderá un experto en la técnica, todos los lenguajes tales como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que" y por ejemplo, incluyen el número citado y hacen referencia a rangos que posteriormente pueden dividirse en subrangos como se analizó anteriormente. Finalmente, como entenderá un experto en la técnica, un rango incluye cada miembro individual.

[0434] Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes emitidas y otros documentos disponibles públicamente a los que se hace referencia en esta especificación se incorporan en este documento por referencia como si cada publicación individual, solicitud de patente, patente emitida u otro documento se indicara específica e individualmente para incorporarse por referencia en su totalidad. Las definiciones que están contenidas en el texto incorporado por referencia se excluyen en la medida en que contradigan las definiciones de esta descripción.

[0435]

Otras modalidades se exponen
en las siguientes reivindicaciones.