CÉLULAS INMUNITARIAS QUE TIENEN ARNHC COEXPRESADOS Y SISTEMAS DE COMPUERTA LÓGICA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.° 63/255,887, presentada el 14 de octubre de 2021; solicitud provisional estadounidense n.° 63/255,889, presentada el 14 de octubre de 2021; solicitud provisional estadounidense n.° 63/255,891, presentada el 14 de octubre de 2021; y solicitud provisional estadounidense n.° 63/303,422, presentada el 26 de enero de 2022, cuyos contenidos se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que se presentó a través del sistema de presentación electrónica EFS-Web y se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Dicha copia ASCII, creada el mes XX, 20XX, se denomina XXXXXUS_sequencelisting.xml, y tiene un tamaño de X,XXX,XXX bytes.

ANTECEDENTES

[0003] El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento incontrolable de células. Se han probado muchos enfoques para tratar el cáncer, incluidos fármacos y radioterapia. Los tratamientos contra el cáncer recientes han buscado utilizar las propias células inmunitarias del cuerpo para atacar las células cancerosas. Un enfoque prometedor utiliza células T que se toman de un paciente y se modifican genéticamente para producir receptores de antígenos quiméricos, o CAR, proteínas receptoras que dan a las células T una nueva capacidad para dirigirse a una proteína específica. Los receptores son quiméricos porque combinan funciones de unión al antígeno y de activación de células T en un solo receptor.

[0004] La inmunoterapia que utiliza células CAR-T es prometedora porque las células T modificadas tienen el potencial de reconocer las células cancerosas para atacarlas y destruirlas de manera más efectiva.

[0005] Después de que las células T se modifican con los CAR, las células CAR-T resultantes se introducen en los pacientes para atacar las células tumorales. Las células CAR-T pueden

derivarse de células T de la propia sangre de un paciente (autólogas) o de células T de otro donante sano (alogénicas). Una vez que las células CAR-T se infunden en un paciente, entran en contacto con su antígeno diana en una célula. Las células CAR-T se unen al antígeno y se activan. Tras la interacción con el antígeno, las células CAR T pueden proliferar exponencialmente, iniciar la producción de citocinas antitumorales y apuntar a la destrucción de células tumorales.

[0006] Sin embargo, persisten algunas preocupaciones y limitaciones de la inmunoterapia basada en células CAR T. Algunas células CAR T pueden interactuar con células normales que expresan niveles bajos de antígenos diana, lo que provoca una toxicidad fuera de la diana. Sin embargo, persisten algunas limitaciones de la inmunoterapia basada en células CAR T. Además, las células CAR-T pueden carecer de supervivencia periférica, pueden tener una expansión y función efectora reducidas, son susceptibles a la supresión y el agotamiento y pueden no dar como resultado la persistencia de las células T de memoria. Por lo tanto, se necesitan terapias adicionales dirigidas a las vías intrínsecas y que, por ejemplo, reduzcan la toxicidad fuera de la diana para abordar estos obstáculos.

COMPENDIO

[0007] En un aspecto, se proporcionan en la presente uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde el uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador; un segundo polipéptido quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR); y al menos una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde al menos una secuencia de ácido nucleico comprende uno o más de: (1) una primera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica el receptor de muerte de la superficie de la célula Fas humana (FAS) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, (2) una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica el no receptor de proteína tirosina fosfatasa humana tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; y (3) una tercera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la Caja de Grupo de Alta Movilidad asociada a la selección de timocitos humanos (TOX) que comprende la secuencia establecida

en la SEQ ID NO: 41.

[0008] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina de células germinales (ALPG/P).

[0009] En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, CDR-H2 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 , CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6

[0010] En algunas modalidades, el CAR comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), y donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR- H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

[0011] En algunas modalidades, al menos una secuencia de ácido nucleico comprende cada uno de: (1) la primera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39; y (2) la segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[0012] En algunas modalidades, el CAR comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN).

[0013] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR- H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la

secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

[0014] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR- H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

[0015] En un aspecto, se proporcionan en la presente uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a fosfatasa alcalina, de células placentarias/germinales (ALPG/P), donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2, CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, y CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6; un segundo polipéptido quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR); una primera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementario a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[0016] En algunas modalidades, la primera secuencia de cadena VH del dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

[0017] En algunas modalidades, la primera secuencia de cadena VL del dominio de unión al

antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.

[0018] En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

[0019] En algunas modalidades, el CAR comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN).

[0020] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR- H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

[0021] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

[0022] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR- H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

[0023] En algunas modalidades, la segunda secuencia de cadena VHH del dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[0024] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[0025] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 168, 167 o 166.

[0026] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[0027] En un aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud

complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39.

[0028] En un aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica la proteína tirosina fosfatasa humana no receptora tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[0029] En un aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la caja de grupo de alta movilidad asociada a la selección de timocitos humanos (TOX) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[0030] En un aspecto, se proporcionan en la presente uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39 y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[0031] En un aspecto, se proporcionan en la presente uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39; y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[0032] En algunas modalidades, la primera, segunda y tercera secuencias de ácido nucleico tienen al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud.

[0033] En algunas modalidades, la primera, segunda y tercera secuencias de ácido nucleico son un ARN de horquilla corta (ARNhc), un ARN de interferencia pequeño (ARNip), un ARN bicatenario (ARNbc) o un oligonucleótido antisentido.

[0034] En algunas modalidades, la primera, segunda y tercera secuencias de ácido nucleico son ARNhc.

[0035] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42-71.

[0036] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49.

[0037] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico reduce la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[0038] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72-97.

[0039] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

[0040] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71; y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72 a 97.

[0041] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49 y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

[0042] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico reduce la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[0043] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98-125.

[0044] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en las SEQ ID NO: 99 o 104.

[0045] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71; y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98 a 125.

[0046] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49 y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en las SEQ ID NO: 99 o 104.

[0047] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico reduce la expresión de TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[0048] En un aspecto, se proporcionan en la presente uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador, un segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio único que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR- H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12; y una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[0049] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[0050] En un aspecto, se proporcionan en la presente uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador, un segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR- H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16; y una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[0051] En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

[0052] En un aspecto, se proporcionan en la presente uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina, de células germinales (ALPG/P); y un segundo polipéptido quimérico comprende un CAR que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN); una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o es

complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[0053] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[0054] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 168, 167 o 166.

[0055] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[0056] En algunas modalidades, la primera y segunda secuencias de ácido nucleico tienen al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud.

[0057] En algunas modalidades, los primeros y segundos ácidos nucleicos son un ARN de horquilla corta (ARNhc), un ARN de interferencia pequeño (ARNip), un ARN bicatenario (ARNbc) o un oligonucleótido antisentido.

[0058] En algunas modalidades, los primeros y segundos ácidos nucleicos son ARNhc.

[0059] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42-71.

[0060] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49.

[0061] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico reduce la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[0062] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72-97.

[0063] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

[0064] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico reduce la expresión de PTPN2 en

la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[0065] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98-125.

[0066] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en las SEQ ID NO: 99 o 104.

[0067] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico reduce la expresión de TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[0068] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende, desde el extremo N hasta el extremo C, el primer dominio de unión al antígeno extracelular; un primer dominio transmembrana que comprende uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando; y un dominio intracelular que comprende un efector transcripcional humano o humanizado, donde la unión de ALPG/P por el primer dominio de unión al antígeno extracelular da como resultado la escisión en uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando.

[0069] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende además un primer dominio bisagra ubicado entre el primer dominio de unión al antígeno extracelular y el primer dominio transmembrana.

[0070] En algunas modalidades, el primer dominio bisagra comprende un dominio bisagra CD8α o un dominio bisagra CD8α truncado.

[0071] En algunas modalidades, la primera bisagra comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 18.

[0072] En algunas modalidades, el primer dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana Notch1.

[0073] En algunas modalidades, el primer dominio transmembrana comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 19.

[0074] En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio HNF1a/p65 o un dominio Gal4/VP64.

[0075] En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende la secuencia establecida

en la SEQ ID NO: 23.

[0076] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende además una secuencia de terminación de transferencia entre el primer dominio transmembrana y el dominio intracelular.

[0077] En algunas modalidades, la secuencia de terminación de transferencia comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 20.

[0078] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 24.

[0079] En algunas modalidades, el CAR comprende, desde el extremo N hasta el extremo C, un segundo dominio de unión al antígeno extracelular; un segundo dominio transmembrana; un dominio coestimulador intracelular; y un dominio de activación intracelular.

[0080] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR- H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

[0081] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[0082] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR- H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

[0083] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

[0084] En algunas modalidades, el CAR comprende un segundo dominio bisagra.

[0085] En algunas modalidades, el segundo dominio bisagra comprende un dominio bisagra CD8α o un dominio bisagra CD8α truncado.

[0086] En algunas modalidades, el segundo dominio transmembrana comprende un dominio

transmembrana CD8α.

[0087] En algunas modalidades, el dominio coestimulador intracelular comprende un dominio 4-1BB.

[0088] En algunas modalidades, el dominio de activación intracelular comprende un dominio CD3ζ.

[0089] En algunas modalidades, el CAR comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 30 o 31.

[0090] En algunas modalidades, el receptor cebador y el CAR son capaces de unirse a una única célula diana si la célula diana expresa cada uno de ALPG/P y MSLN.

[0091] En algunas modalidades, la célula diana es una célula humana.

[0092] En algunas modalidades, la célula diana es una célula cancerosa.

[0093] En algunas modalidades, la célula cancerosa es una célula cancerosa sólida o una célula cancerosa líquida.

[0094] En algunas modalidades, la célula cancerosa es cáncer de ovario, cáncer de Falopio, cáncer peritoneal primario, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer de cuello uterino o cáncer de páncreas.

[0095] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende dos o más fragmentos de ácido nucleico.

[0096] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además un promotor inducible unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR.

[0097] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además un primer promotor constitutivo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

[0098] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además un promotor inducible unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico y un promotor constitutivo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

[0099] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además un segundo promotor constitutivo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario a FAS humano.

[00100] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además un

segundo promotor constitutivo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo ácido nucleico complementario a PTPN2 o TOX humano.

[00101] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además un segundo promotor constitutivo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario a FAS humano o el segundo ácido nucleico complementario a PTPN2 o TOX humano.

[00102] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende, en dirección 5' a 3', el primer promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario a FAS humano, PTPN2 humano o TOX humano; el promotor inducible; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

[00103] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende, en dirección 5' a 3', el primer promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario a FAS humano; la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo primer ácido nucleico complementario a PTPN2 o TOX humano; el promotor inducible; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

[00104] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende, en dirección 5' a 3', el promotor inducible; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario a FAS humano; la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo primer ácido nucleico complementario a PTPN2 o TOX humano; el primer promotor constitutivo; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

[00105] En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 36.

[00106] En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 37 o 38.

[00107] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además un brazo de reparación dirigido por homología 5' y un brazo de reparación dirigido por homología 3' complementario a un sitio de inserción en un cromosoma de la célula hospedadora.

[00108] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además una

secuencia de nucleótidos que codifica un péptido 2A autoescindible (P2A).

[00109] En algunas modalidades, el P2A está en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

[00110] En algunas modalidades, el P2A está en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

[00111] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además un elemento regulador postraduccional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).

[00112] En algunas modalidades, el WPRE está en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico y en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador o donde el WPRE está en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador y en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

[00113] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además un elemento poliA de SV40.

[00114] En algunas modalidades, el ácido nucleico se incorpora en un casete de expresión o un vector de expresión.

[00115] En algunas modalidades, el vector de expresión es un vector no viral.

[00116] En un aspecto, en la presente se proporcionan vectores de expresión que comprenden el ácido nucleico recombinante descrito en la presente.

[00117] En algunas modalidades, los extremos 5' y 3' del ácido nucleico recombinante comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en un genoma de una célula primaria.

[00118] En algunas modalidades, el sitio de inserción está ubicado en un locus del receptor alfa constante de células T (TRAC) o en un locus de puerto seguro genómico (GSH).

[00119] En algunas modalidades, el locus GHS es un locus GS94.

[00120] En un aspecto, en la presente se proporcionan células inmunitarias que comprenden: al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes descritos en la presente; y/o el vector descrito en la presente.

[00121] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria humana primaria.

[00122] En algunas modalidades, la célula inmunitaria humana primaria es una célula

inmunitaria autóloga.

[00123] En algunas modalidades, la célula inmunitaria primaria es una célula citolítica natural (NK), una célula T, una célula T CD8+, una célula T CD4+, una célula T primaria o un progenitor de célula T.

[00124] En algunas modalidades, la célula inmunitaria primaria es una célula T primaria.

[00125] En algunas modalidades, la célula inmunitaria primaria es una célula T humana primaria.

[00126] En algunas modalidades, la célula inmunitaria primaria está libre de virus.

[00127] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria autóloga.

[00128] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria alogénica.

[00129] En un aspecto, se proporcionan en la presente células inmunitarias primarias que comprenden al menos un ácido nucleico recombinante que comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a ALPG/P; un receptor de antígeno quimérico que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a MSLN; una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41; donde el ácido nucleico recombinante se inserta en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria primaria no comprende un vector viral para introducir el ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria primaria.

[00130] En un aspecto, se proporcionan en la presente células inmunitarias primarias que comprenden al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82, insertado en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria

primaria no comprende un vector viral para introducir uno o más ácidos nucleicos recombinantes en la célula inmunitaria primaria.

[00131] En un aspecto, se proporcionan en la presente células inmunitarias primarias que comprenden al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104, insertado en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria primaria no comprende un vector viral para introducir el ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria primaria.

[00132] En un aspecto, se proporcionan en la presente células primarias viables sin virus que comprenden un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido nucleico recombinante, donde el RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, y donde el ácido nucleico recombinante codifica: un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a ALPG/P; un receptor de antígeno quimérico que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a MSLN; una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41; y donde los extremos 5’ y 3’ del ácido nucleico recombinante comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a las secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

[00133] En un aspecto, se proporcionan en la presente células primarias viables, libres de virus, que comprenden un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido(s) nucleico(s) recombinante(s), donde el RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que

comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82, y donde los extremos 5' y 3' de uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

[00134] En un aspecto, se proporcionan en la presente células primarias viables, libres de virus, que comprenden un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido(s) nucleico(s) recombinante(s), donde el RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104, y donde los extremos 5' y 3' de uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

[00135] En algunas modalidades, la célula comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 168, 167 o 166.

[00136] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico reduce la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico.

[00137] En algunas modalidades, la expresión de FAS en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico.

[00138] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico reduce la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00139] En algunas modalidades, la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00140] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico reduce la expresión de TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido

nucleico.

[00141] En algunas modalidades, la expresión de TOX en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00142] En algunas modalidades, la expresión de FAS, PTPN2 y/o TOX se determina mediante un ensayo de ácido nucleico o un ensayo de proteínas.

[00143] En algunas modalidades, el ensayo de ácido nucleico comprende al menos uno de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), RT-qPCR, micromatriz, matriz de genes o RNAseq.

[00144] En algunas modalidades, el ensayo de proteínas comprende al menos uno de inmunotransferencia, clasificación de células activadas por fluorescencia, citometría de flujo, clasificación de células activadas magnéticamente o separación celular basada en afinidad.

[00145] En un aspecto, en la presente se proporciona una población de células que comprende una pluralidad de células inmunitarias descritas en la presente.

[00146] En un aspecto, se proporcionan en la presente una composición farmacéutica que comprende la célula inmunitaria descrita en la presente o la población de células descrita en la presente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[00147] En un aspecto, se proporcionan en la presente una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico recombinante descrito en la presente o el vector descrito en la presente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[00148] En un aspecto, en la presente se proporciona un método para editar una célula inmunitaria, que comprende: proporcionar un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido nucleico recombinante, donde la RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde el ácido nucleico recombinante comprende el ácido nucleico recombinante descrito en la presente, y donde los extremos 5' y 3' del ácido nucleico recombinante comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria; introducir de forma no viral el complejo de RNP-ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria, donde el ARN guía se hibrida específicamente con una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde el dominio de nucleasa escinde la región diana para crear el sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria; y editar la célula inmunitaria mediante la inserción del ácido

nucleico recombinante descrito en la presente en el sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria.

[00149] En algunas modalidades, la introducción no viral comprende electroporación.

[00150] En algunas modalidades, el dominio de nucleasa comprende una endonucleasa asociada a CRISPR (Cas), opcionalmente una nucleasa Cas9.

[00151] En algunas modalidades, la región diana del genoma de la célula es un locus del receptor alfa constante de células T (TRAC) o un locus de puerto seguro genómico (GSH).

[00152] En algunas modalidades, el locus de GSH es el locus GS94.

[00153] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico recombinante bicatenario o un ácido nucleico recombinante monocatenario.

[00154] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico recombinante lineal o un ácido nucleico recombinante circular, opcionalmente donde el ácido nucleico recombinante circular es un plásmido.

[00155] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria humana primaria.

[00156] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria alogénica.

[00157] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria autóloga.

[00158] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula citolítica natural (NK), una célula T, una célula T CD8+, una célula T CD4+, una célula T primaria o un progenitor de célula T.

[00159] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula T primaria.

[00160] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula T humana primaria.

[00161] En algunas modalidades, la célula inmunitaria está libre de virus.

[00162] En algunas modalidades, el método comprende además obtener la célula inmunitaria de un paciente e introducir el ácido nucleico recombinante in vitro.

[00163] En un aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar una enfermedad en un sujeto que comprende administrar la célula inmunitaria descrita en la presente o la composición farmacéutica descrita en la presente al sujeto.

[00164] En algunas modalidades, la enfermedad es cáncer.

[00165] En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer sólido o un cáncer líquido.

[00166] En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de ovario, cáncer de Falopio, cáncer

peritoneal primario, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer de cuello uterino o cáncer de páncreas.

[00167] En algunas modalidades, la administración de la célula inmunitaria mejora una respuesta inmunitaria en el sujeto.

[00168] En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria mejorada es una respuesta inmunitaria adaptativa.

[00169] En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria mejorada es una respuesta inmunitaria innata.

[00170] En algunas modalidades, la respuesta inmune mejorada es una expresión aumentada de al menos una citocina o quimiocina.

[00171] En algunas modalidades, al menos una citocina o quimiocina es IL-2 o IFNγ.

[00172] En algunas modalidades, el método comprende además administrar una inmunoterapia al sujeto simultáneamente con la célula inmunitaria o posteriormente a la célula inmunitaria.

[00173] En un aspecto, se proporciona en la presente un método para inhibir una célula diana en un sujeto que comprende administrar la célula inmunitaria descrita en la presente al sujeto, donde la célula inmunitaria inhibe la célula diana.

[00174] En algunas modalidades, la célula diana expresa ALPG/P y MSLN.

[00175] En algunas modalidades, la célula diana es una célula cancerosa.

[00176] En un aspecto, se proporciona en la presente un método para inducir la expresión de un receptor de antígeno quimérico con un receptor cebador en una célula inmunitaria que comprende: obtener una célula inmunitaria que comprende el ácido nucleico recombinante descrito en la presente; y/o el vector descrito en la presente; y poner en contacto la célula inmune con una célula diana que expresa ALPG/P y MSLN, donde la unión del receptor cebador a ALPG/P en la célula diana induce la activación del receptor cebador y la expresión del receptor de antígeno quimérico.

[00177] En un aspecto, se proporciona en la presente un método para modular la actividad de una célula inmunitaria que comprende: obtener una célula inmunitaria que comprende el ácido nucleico recombinante descrito en la presente; y/o el vector descrito en la presente; y poner en contacto la célula inmune con una célula diana que expresa ALPG/P y MSLN, donde la unión del receptor cebador a ALPG/P en la célula diana induce la activación del receptor

cebador y la expresión del receptor de antígeno quimérico y donde la unión del receptor de antígeno quimérico a MSLN en la célula diana modula la actividad de la célula inmunitaria.

[00178] En algunas modalidades, la modulación de la actividad de la célula inmunitaria comprende mejorar una respuesta inmunitaria.

[00179] En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria mejorada es una respuesta inmunitaria adaptativa.

[00180] En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria mejorada es una respuesta inmunitaria innata.

[00181] En algunas modalidades, la actividad de la célula inmunitaria es una expresión aumentada de al menos una citocina o quimiocina.

[00182] En algunas modalidades, al menos una citocina o quimiocina es IL-2 o IFNγ.

[00183] En algunas modalidades, la expresión de FAS en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico.

[00184] En algunas modalidades, la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00185] En algunas modalidades, la expresión de TOX en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00186] En algunas modalidades, la expresión de FAS, PTPN2 y/o TOX en la célula inmunitaria se determina mediante un ensayo de ácido nucleico o un ensayo de proteínas.

[00187] En algunas modalidades, el ensayo de ácido nucleico comprende al menos uno de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), RT-qPCR, micromatriz, matriz de genes o RNAseq.

[00188] En algunas modalidades, el ensayo de proteínas comprende al menos uno de inmunotransferencia, clasificación de células activadas por fluorescencia, citometría de flujo, clasificación de células activadas magnéticamente o separación celular basada en afinidad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

[00189] Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se

entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción y los dibujos adjuntos, donde:

[00190] La FIG. 1 muestra un esquema de la expresión de compuerta lógica con el ensayo de activación de células T.

[00191] La FIG. 2 proporciona datos de citometría de flujo que muestran que las células T que expresan ambas compuertas lógicas (LG1 y LG3) mostraron expresión del receptor cebador pero una expresión mínima de CAR en ausencia de estimulación del antígeno cebador y en presencia de estimulación de activación de células T.

[00192] La FIG. 3A muestra que no se observó citotoxicidad en las células T de control negativo sólo con RNP. La FIG. 3B muestra la actividad de las células T que expresa compuerta lógica mínima contra las células K562-ALPG positivas para un único antígeno. La FIG. 3C no muestra ninguna actividad de células T que expresa compuerta lógica contra K562-MSLN positivas para un único antígeno. La FIG. 3D muestra la actividad específica del tumor en las células T que expresan la compuerta lógica.

[00193] La FIG. 4 muestra que las células T de compuerta Lógica 1 mostraron una destrucción de células diana K562-ALPG/MSLN más rápida y más completa en relación con las células T de compuerta lógica 3.

[00194] La FIG. 5A muestra la producción de citocinas mediante las células T que expresan la compuerta lógica (LG1 y LG3), las células T que expresan CAR o las células de control negativo después de la incubación con la línea celular K562.La FIG. 5B muestra la producción de citocinas mediante las células T que expresan la compuerta lógica (LG1 y LG3), las células T que expresan CAR o las células de control negativo después de la incubación con la línea celular $K562^{MSLN}$.La FIG. 5C muestra la producción de citocinas mediante las células T que expresan la compuerta lógica (LG1 y LG3), las células T que expresan CAR o las células de control negativo después de la incubación con la línea celular $K562^{ALPG}$. La FIG. 5D muestra la producción de citocinas mediante las células T que expresan la compuerta lógica (LG1 y LG3), las células T que expresan CAR o las células de control negativo después de la incubación con la línea celular $K562^{ALPG/MSLN}$.

[00195] La FIG. 6A muestra la expresión de ALPG en células AsPC-1, células $K562^{ALPG/MSLN}$ y células K562-EFG. La FIG. 6B muestra la tinción con ALPG IHC en células AsPC-1 y tumores de cáncer de ovario primario.

[00196] La FIG. 7A muestra la expresión de MSLN en células AsPC-1, células $K562^{ALPG/MSLN}$

y células K562-EFG. La FIG. 7B muestra la tinción con ALPG IHC en células AsPC-1 y tumores de cáncer de ovario primario.

[00197] La FIG. 8A muestra la expresión de ALPG en células de baja y alta expresión de $K562^{ALPG}$. La FIG. 8B muestra la expresión de ALPG en células de baja y alta expresión de $K562^{ALPG}$, células AsPC-1 y células K562-EFG. La FIG. 8C muestra la expresión del receptor cebador y CAR en células T modificadas genéticamente antes y después de la incubación con células de baja y alta expresión de $K562^{ALPG}$.

[00198] La FIG. 9A muestra la expresión de ALPG en células SKOV3-EFG, células $K562^{ALPG/MSLN}$ y células K562 EFG. La FIG. 9B muestra la expresión de MSLN en células SKOV3-WT, células $K562^{ALPG/MSLN}$ y células K562 EFG. La FIG. 9C muestra la producción de citocina IL-2 después de la incubación de células T que expresan el LG o CAR indicado con las células SKOV3-EFG. La FIG. 9D muestra la producción de citocina IFNγ después de la incubación de células T que expresan el LG o CAR indicado con las células SKOV3-EFG.

[00199] La FIG. 10A muestra la expresión de ALPG en muestras de cáncer de ovario. La FIG. 10B muestra la expresión de MSLN en muestras de cáncer de ovario. La FIG. 10C muestra un ensayo de dosis para el porcentaje de destrucción de células diana con un porcentaje creciente de células negativas para ALPG incubadas con células T que expresan la compuerta lógica o CAR indicada.

[00200] La FIG. 11A muestra la producción de citocina IL-2 después de la incubación de células T que expresan compuerta lógica o células T que expresan CAR con células diana en presencia de CA125. La FIG. 11B muestra la producción de citocina IL-2 después de la incubación de células T que expresan compuerta lógica o células T que expresan CAR con células diana en presencia de MSLN.

[00201] La FIG. 12A muestra el volumen del tumor en el modelo de doble flanco K562 en el tumor $K562^{MSLN}$, modelando el revestimiento mesotelial sano, después del tratamiento con el CAR constitutivo. La FIG. 12B muestra el volumen del tumor en el tumor $K562^{ALPG/MSLN}$, modelando un tumor en la diana, después del tratamiento con el CAR constitutivo. La FIG. 12C muestra el volumen del tumor en el tumor $K562^{MSLN}$ después del tratamiento con las células T de compuerta lógica 1. La FIG. 12D muestra el volumen del tumor en el tumor $K562^{ALPG/MSLN}$ después del tratamiento con las células T de compuerta lógica 1. La FIG. 12E muestra el volumen del tumor en el tumor $K562^{MSLN}$ después del tratamiento con las células T

de compuerta lógica 3. La FIG. 12F muestra el volumen del tumor en el tumor $K562^{ALPG/MSLN}$ después del tratamiento con las células T de compuerta lógica 3. En cada figura, la línea inferior muestra el volumen del tumor después del tratamiento con las células T indicadas y la línea superior muestra el volumen del tumor después del tratamiento con las células T de control.

[00202] La FIG. 13A muestra el volumen del tumor en el modelo MSTO después del tratamiento con una dosis baja de las células T modificadas indicadas. La FIG. 13B muestra el volumen del tumor después del tratamiento con una dosis media de «estrés» de las células T modificadas indicadas. La FIG. 13A muestra el volumen del tumor después del tratamiento con una dosis alta de las células T modificadas indicadas. La FIG. 13D muestra la expansión de células T en muestras de sangre después del tratamiento con las células T indicadas.

[00203] La FIG. 14A muestra el análisis de flujo de células T encontradas en la sangre periférica después del tratamiento con células T de control. La FIG. 14B muestra el análisis de flujo de células T encontradas en la sangre periférica después del tratamiento con la dosis media de células T que expresan CAR 1. La FIG. 14C muestra el análisis de flujo de células T encontradas en la sangre periférica después del tratamiento con la dosis media de células T que expresan LG1. La FIG. 14D muestra el análisis de flujo de células T encontradas en la sangre periférica después del tratamiento con la dosis alta de células T que expresan LG1, células T que expresan CAR o células de control negativo.

[00204] La FIG. 15A muestra el porcentaje de células editadas con el ARNhc indicado después de una expansión de 9 días. La FIG. 15B muestra el total de células editadas con el ARNhc indicado después de una expansión de 9 días.

[00205] La FIG. 16 muestra la desactivación del gen diana de ambos genes indicados cuando se usan en combinación.

[00206] La FIG. 17A muestra que el módulo de ARNhc dirigido a FAS, PTPN2 y TOX proporciona una reducción estable de FAS durante al menos 7 semanas después de la edición en condiciones de reposo. La FIG. 17B muestra que los niveles de proteína FAS, PTPN2 y NR4A1 también se redujeron significativamente 6 días después de la edición.

[00207] La FIG. 18 muestra que la reducción del gen diana en las células T se mantuvo durante toda la estimulación crónica.

[00208] La FIG. 19A muestra que hubo una fuerte reducción de FAS en las células del

ARNhc. La FIG. 19B muestra que las células T con reducción de FAS conservaron más del 80 % de la viabilidad normalizada con respecto a las células T con solo el ARNhc de control después del tratamiento con un anticuerpo activador anti-FAS durante 24 horas.

[00209] La FIG. 20 muestra que las células T modificadas con la combinación de módulos de ARNhc no mostraron evidencia de un mayor riesgo de transformación.

[00210] La FIG. 21 muestra que las células T modificadas con la combinación de módulos de ARNhc no mostraron evidencia de actividad citotóxica reducida durante el ensayo de luciferasa de 48 horas con el antígeno diana que expresa la línea celular K562.

[00211] La FIG. 22 muestra que las células T modificadas con los módulos de reducción de ARNhc no mostraron evidencia de actividad citotóxica reducida durante el ensayo de incucitos de 48 horas con el antígeno diana que expresa la línea celular MSTO.

[00212] La FIG. 23 muestra la expansión acumulativa de células T durante la estimulación crónica del antígeno después de la reducción del ARNhc de la diana indicada.

[00213] La FIG. 24A muestra que las células T modificadas con un módulo de ARNhc dirigido a PTPN2 exhibieron marcas del ciclo celular después de la estimulación crónica del antígeno. La FIG. 24B muestra que las células T modificadas con un módulo de ARNhc dirigido a PTPN2 exhibieron marcas del ciclo celular después de la estimulación crónica del antígeno.

[00214] La FIG. 25 muestra la expresión de interferón gamma en células T después de la reducción del ARNhc de la diana indicada.

[00215] La FIG. 26A muestra que las células T modificadas con un módulo de ARNhc dirigido a PTPN2 exhibieron marcas del ciclo celular después de la estimulación crónica del antígeno. La FIG. 26B muestra que las células T modificadas con un módulo de ARNhc dirigido a PTPN2 exhibieron marcas del ciclo celular después de la estimulación crónica del antígeno.

[00216] La FIG. 27 muestra los porcentajes de células T CD4 o CD8 en % en las poblaciones de células T modificadas, y las cantidades relativas de células T efectoras (Te), células T efectoras de memoria (Tem), células T de memoria central (Tcm) o células T madre de memoria (Tscm) después de la reducción del ARNhc de la diana indicada.

[00217] La FIG. 28A muestra el crecimiento tumoral en ratones después del tratamiento con la célula T CAR indicada o células T de control. La FIG. 28B muestra la expansión de células

T en sangre periférica después del tratamiento con las células CAR T o células T de control indicadas.

[00218] La FIG. 29 muestra el volumen del tumor después del crecimiento del tumor en ratones después del tratamiento con las cantidades indicadas de células CAR T o células T de control.

[00219] La FIG. 30A muestra la cuantificación de los tipos de células T en la población de células T CD8 editadas después del tratamiento con células T con reducción de ARNhc de la diana indicada. La FIG. 30B muestra la cantidad de células T editadas en el tumor o el bazo de los ratones después del tratamiento con células T con reducción de ARNhc de la diana indicada.

[00220] La FIG. 31 muestra el peso corporal del ratón después del tratamiento con células T con reducción de ARNhc de la diana indicada.

[00221] La FIG. 32 muestra la lisis de células diana que expresan MSLN o ALPG y MSLN después de la incubación con células T que expresan una compuerta lógica y ARNhc de FAS/PTPN2.

[00222] La FIG. 33 muestra la expresión relativa de FAS en células T que expresan una compuerta lógica ALPG/MSLN y ARNhc de FAS/PTPN2 en comparación con células de control que expresan la compuerta lógica ALPG/MSLN sola.

[00223] La FIG. 34A muestra el volumen tumoral *in vivo* después del tratamiento con células T de donante dos que expresan una compuerta lógica de ALPG/MSLN y ARNhc de FAS/PTPN2 en comparación con las células T de control que expresan la compuerta lógica de ALPG/MSLN sola. La FIG. 34B muestra el volumen tumoral *in vivo* después del tratamiento con células T de donante tres que expresan una compuerta lógica de ALPG/MSLN y ARNhc de FAS/PTPN2 en comparación con las células T de control que expresan la compuerta lógica de ALPG/MSLN sola.

[00224] La FIG. 35A muestra el volumen tumoral *in vivo* después del tratamiento con células T de donante dos que expresan una compuerta lógica de ALPG/MSLN y ARNhc de FAS/PTPN2 o FAS/TOX en comparación con las células T de control (RNP). La FIG. 35B muestra el volumen tumoral *in vivo* después del tratamiento con células T de donante tres que expresan una compuerta lógica de ALPG/MSLN y ARNhc de FAS/PTPN2 o FAS/TOX en comparación con las células T de control (RNP).

[00225] La FIG. 36A muestra los niveles de ARNm de FAS después de la reducción de ARNhc. La FIG. 36B muestra los niveles de ARNm de PTPN2 después de la reducción de ARNhc. La FIG. 36C muestra los niveles de ARNm de TOX después de la reducción de ARNhc. La FIG. 36D muestra los niveles de ARNm de ZC3H12A después de la reducción de ARNhc.

[00226] La FIG. 37 muestra los niveles de proteína de FAS después de la reducción de ARNhc.

[00227] La FIG. 38 muestra que la eliminación de FAS mejoró la proliferación celular y la función efectora.

[00228] La FIG. 39A proporciona un diagrama del sistema de reducción y un diagrama de un ejemplo de construcción dual ARNhc-CAR. La FIG. 39B muestra una reducción dual robusta (>50%) de FAS y dianas adicionales utilizando ARNhc.

[00229] La FIG. 40A proporciona un diagrama de un ejemplo de sistema de control y shFAS. La FIG. 40B muestra que la reducción de FAS proporcionó una protección mejorada >2 veces contra la apoptosis mediada por FAS.

[00230] La FIG. 41 muestra que las reducciones duales con FAS y genes adicionales mejoraron la eficacia in vivo de las células CAR T (CD19-41BBZ introducidas en el locus TRAC) en un modelo NALM6 sistémico.

[00231] La FIG. 42A proporciona un esquema de un ejemplo de construcción de ARNhc y compuerta lógica completa. La FIG. 42B muestra que se observó una eficacia de activación del transgén similar con cada una de las construcciones. La FIG. 42C muestra que las células T que expresan PrimeR tenían una expresión de CAR mínima, debido a la función de la expresión de CAR de compuerta a compuerta lógica en la exposición a células diana ALPG+. La FIG. 42D muestra la composición de CD4/CD8 de la población KI+ (o transducida para las poblaciones lentivirales) para todas las células T modificadas genéticamente y la población de células T en masa para las células RNP y no transducidas (UNT).

[00232] La FIG. 43 muestra el fenotipado de la memoria de los circuitos de ARNhc LG1 y FAS/PTPN2.

[00233] La FIG. 44A muestra la reducción del ARNhc de FAS. La FIG. 44B muestra la reducción del ARNhc de PTPN2.

[00234] La FIG. 45 muestra que AB-1013, AB-1014 y AB-1015 indujeron la expresión de

CAR dependiente de ALPG.

[00235] La FIG. 46 muestra que AB-1013, AB-1014 y AB-1015 eliminaron las poblaciones de células diana heterogéneas del antígeno cebador.

[00236] La FIG. 47A muestra que las células T CAR sólo inhibieron el crecimiento de células tumorales $K526^{MSLN}$. La FIG. 47B muestra que las células T CAR sólo inhibieron el crecimiento de células tumorales $K526^{MSLN/ALPG}$. La FIG. 47C muestra que las células T del circuito de compuerta lógica ARNhc+ AB-1013, AB-1014 y AB-1015 no inhibieron el crecimiento de las células tumorales $K526^{MSLN}$. La FIG. 47D muestra que las células T del circuito de compuerta lógica ARNhc+ AB-1013, AB-1014 y AB-1015 inhibieron el crecimiento de las células tumorales $K526^{MSLN/ALGP}$.

[00237] La FIG. 48 muestra que las células que expresan solo LG1 (compuerta lógica AB-X) mostraron un mejor control tumoral que SS1-CAR y un control tumoral equivalente como TC-210.

[00238] La FIG. 49 muestra que las tres células T del circuito ARNhc+ LG1 (AB-1013, AB-1014 y AB-1015) mostraron una expansión de células T y un control tumoral mejorados (por ejemplo, menos expansión tumoral) en el ensayo de estimulación continua en comparación con las células T LG1.

[00239] La FIG. 50A muestra que las células T que expresan los CAR anti-MSLN constitutivos eliminaron tanto las células $K562^{MSLN}$ como $K562^{ALPG/MSLN}$ y que la citotoxicidad de las células T de ARNhc + compuerta lógica (AB-1013, AB-1014 y AB-1015) fue específica para células de antígeno dual $K562^{ALPG/MSLN}$ sólo. La FIG. 50B muestra que la producción de IFNγ a partir de las células T del circuito de compuerta lógica/ARNhc se limitó a muestras con las células diana de antígeno dual $K562^{ALPG/MSLN}$. La FIG. 50B muestra que la producción de IFNγ a partir de las células T del circuito de compuerta lógica/ARNhc se limitó a muestras con las células diana de antígeno dual $K562^{ALPG/MSLN}$.

[00240] La FIG. 51 muestra que AB-1015 se asoció con un aumento modesto en la actividad de eliminación independiente de ALPG en células $K562^{MSLN}$ y una mayor expresión de IFNγ en comparación con AB-1013 y AB-1014.

[00241] La FIG. 52 muestra que las tres células T del circuito de compuerta lógica ARNhc+ indujeron la eliminación de la diana.

[00242] La FIG. 53 muestra que no se observó transformación celular en células T editadas

con los tres circuitos ARNhc+LG1 (AB-1013, AB-1014 o AB-1015).

[00243] La FIG. 54A muestra que las células CAR T de MSLN no reconocieron las células SLC2A9+ (células THP-1). La FIG. 54B muestra que las células CAR T de MSLN no reconocieron las células de control negativo K562. La FIG. 54C muestra que las células CAR T de MSLN se unieron a las células que expresan MSLN de control positivo. La FIG. 54D muestra que las células CAR T de MSLN no reconocieron las células GP2+

[00244] La FIG. 55 muestra que no se observó evidencia de polirreactividad con las células MSLN CAR contra células A498 o células H1975.

[00245] La FIG. 56A muestra la aleatorización de grupos de ratones 5 días después de la implantación. La FIG. 56B muestra que las células T AB-1015 redujeron el volumen del tumor en un modelo de cáncer de ovario in vivo. La FIG. 56C muestra el peso del ratón después de la implantación del tumor después del tratamiento con células T AB-1015. El tratamiento con células T AB-1015 no produjo pérdida de peso corporal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

[00246] Los términos utilizados en las reivindicaciones y la memoria descriptiva se definen como se establece a continuación, a menos que se especifique algo diferente.

[00247] Tal como se utiliza en la presente, el término «gen» se refiere a la unidad básica de la herencia, que consiste en un segmento de ADN dispuesto a lo largo de un cromosoma, que codifica una proteína o un segmento de proteína específico. Un gen normalmente incluye un promotor, una región 5' no traducida, una o más secuencias codificantes (exones), opcionalmente intrones y una región 3' no traducida. El gen puede comprender además un terminador, potenciadores y/o silenciadores.

[00248] Tal como se utiliza en la presente, el término «locus» se refiere a una ubicación física fija y específica en un cromosoma donde se encuentra un gen o marcador genético.

[00249] La expresión «locus de puerto seguro» se refiere a un locus en el que se pueden incorporar genes o elementos genéticos sin alterar la expresión o regulación de genes adyacentes. Estos loci de puerto seguro también se denominan sitios de puerto seguro (SHS) o sitios de puerto seguro genómico (GSH). Como se usa en la presente, un locus de puerto seguro se refiere a un «sitio de integración» o «sitio de activación» en el que se puede insertar

una secuencia que codifica un transgén, como se define en la presente. En algunas modalidades, la inserción se produce con la sustitución de una secuencia que está ubicada en el sitio de integración. En algunas modalidades, la inserción se produce sin la sustitución de una secuencia en el sitio de integración. En la Tabla D se proporcionan ejemplos de sitios de integración contemplados.

[00250] Como se usa en la presente, el término «insertar» se refiere a una secuencia de nucleótidos que está integrada (insertada) en un locus diana o sitio de puerto seguro. El inserto se puede usar para hacer referencia a los genes o elementos genéticos que se incorporan en el locus diana o sitio de puerto seguro usando, por ejemplo, reparación dirigida por homología (HDR), edición del genoma CRISPR/Cas9 u otros métodos para insertar secuencias de nucleótidos en una región genómica conocida por los expertos en la técnica.

[00251] El término «insertar» se refiere a una manipulación de una secuencia de nucleótidos para introducir una secuencia no nativa. Esto se hace, por ejemplo, mediante el uso de enzimas de restricción y ligasas, mediante las cuales la secuencia de ADN de interés, que normalmente codifica el gen de interés, puede incorporarse en otra molécula de ácido nucleico digiriendo ambas moléculas con enzimas de restricción apropiadas para crear superposiciones compatibles y luego usando una ligasa para unir las moléculas. Un experto en la técnica está muy familiarizado con tales manipulaciones y se pueden encontrar ejemplos en Sambrook et ál. (Sambrook, Fritsch y Maniatis, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), que se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad, incluidos los dibujos, figuras y tablas.

[00252] El sistema «CRISPR/Cas» se refiere a una clase generalizada de sistemas bacterianos para la defensa contra ácidos nucleicos extraños. Los sistemas CRISPR/Cas se encuentran en una amplia gama de organismos eubacterianos y arqueales. Los sistemas CRISPR/Cas incluyen los subtipos tipo I, II y III. Los sistemas CRISPR/Cas tipo II de tipo silvestre utilizan una nucleasa mediada por ARN, Cas9, en complejo con ARN guía y activador para reconocer y escindir ácidos nucleicos extraños. Los ARN guía que tienen la actividad tanto de un ARN guía como de un ARN activador también se conocen en la técnica. En algunos casos, estos ARN guía de actividad dual se denominan ARN guía pequeño (ARNgp).

[00253] Los homólogos de Cas9 se encuentran en una amplia variedad de eubacterias, incluidas, entre otras, bacterias de los siguientes grupos taxonómicos: Actinobacteria,

Aquificae, Bacteroidetes-Chlorobi, Chlamydiae-Verrucomicrobia, Chlroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes y Thermotogae. Un ejemplo de proteína Cas9 es la proteína Cas9 de Streptococcus pyogenes. Proteínas Cas9 adicionales y homólogos de estas se describen, por ejemplo, en Chylinksi, et ál., RNA Biol. 1 de mayo de 2013; 10(5): 726–737; Nat. Rev. Microbiol. Junio de 2011; 9(6): 467-477; Hou, et ál., Proc Natl Acad Sci US A. 24 de septiembre de 2013;110(39):15644-9; Sampson et ál., Nature. 9 de mayo de 2013; 497 (7448): 254-7; y Jinek, et ál., Science. 17 de agosto de 2012; 337 (6096): 816-21. El dominio de la nucleasa Cas9 se puede optimizar para una actividad eficiente o una mayor estabilidad en la célula hospedadora.

[00254] Como se usa en la presente, el término «Cas9» se refiere a una nucleasa mediada por ARN (por ejemplo, de origen bacteriano o arqueal, o derivada de esta). Los ejemplos de nucleasas mediadas por ARN incluyen las proteínas Cas9 anteriores y sus homólogos, e incluyen, entre otros, CPF1 (véase, por ejemplo, Zetsche et ál., Cell, Volumen 163, Número 3, p759–771, 22 de octubre de 2015). De manera similar, como se usa en la presente, el término complejo «ribonucleoproteína Cas9» y similares se refiere a un complejo entre la proteína Cas9 y un ARNcr (p. ej., ARN guía o ARN guía pequeño), la proteína Cas9 y un ARNcr transactivador (ARNtracr), la proteína Cas9 y un ARN guía pequeño, o una combinación de estos (p. ej., un complejo que contiene la proteína Cas9, un ARNtracr y un ARN guía de ARNcr).

[00255] Tal como se utiliza en la presente, la frase «célula inmunitaria» incluye todos los tipos de células que pueden dar lugar a células inmunitarias, incluidas las células hematopoyéticas, tales como células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes y células madre pluripotentes inducidas (iPSC). En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula B, macrófago, una célula citolítica natural (NK), una célula madre pluripotente inducida (iPSC), una célula madre pluripotente humana (HSPC), una célula T o una célula progenitora o dendrítica de célula T. En algunas modalidades, la célula es una célula inmunitaria innata.

[00256] Tal como se utiliza en la presente, el término «primaria» en el contexto de una célula primaria o célula madre primaria se refiere a una célula que no ha sido transformada ni inmortalizada. Dichas células primarias se pueden cultivar, subcultivar o pasar un número limitado de veces (p. ej., cultivar 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces). En algunos casos, las células primarias se adaptan a las condiciones de cultivo in

vitro. En algunos casos, las células primarias se aíslan de un organismo, sistema, órgano o tejido, opcionalmente se clasifican y se utilizan, por ejemplo, directamente sin cultivo o subcultivo. En algunos casos, las células primarias son estimuladas, activadas o diferenciadas. Por ejemplo, las células T primarias pueden activarse mediante contacto con (p. ej., cultivo en presencia de) CD3, agonistas de CD28, IL-2, IFN-γ o una combinación de estos.

[00257] Tal como se usan en la presente, los términos «linfocito T» y «célula T» se usan indistintamente y se refieren a células que han completado su maduración en el timo e identifican determinados antígenos extraños en el cuerpo. Los términos también se refieren a los principales tipos de leucocitos que desempeñan diversas funciones en el sistema inmunológico, incluida la activación y desactivación de otras células inmunitarias. La célula T puede ser cualquier célula T tal como una célula T cultivada, por ejemplo, una célula T primaria, o una célula T derivada de una línea de células T cultivada, por ejemplo, un Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida de un mamífero. Las células T incluyen, entre otras, células T vírgenes, células T estimuladas, células T primarias (p. ej., no cultivadas), células T cultivadas, células T inmortalizadas, células T auxiliares, células T citotóxicas, células T de memoria, células T reguladoras, células T citolíticas naturales, combinaciones de estas o subpoblaciones de estas. La célula T puede ser una célula CD3+. Las células T pueden ser $CD4^+$, $CD8^+$ o $CD4^+$ y $CD8^+$. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T, células T CD4+/CD8+ doblemente positivas, células T auxiliares CD4+ (por ejemplo, células Th1 y Th2), células T CD8+ (por ejemplo, células T citotóxicas), periféricas que incluyen, de modo no taxativo, células mononucleares sanguíneas (PBMC), leucocitos de sangre periférica (PBL), linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), células T de memoria, células T vírgenes, células T reguladoras, células T γδ, etc. Puede ser cualquier célula T en cualquier etapa de desarrollo. Los tipos adicionales de células T auxiliares incluyen células Th3 (Treg), células Th17, células Th9 o células Tfh. Los tipos adicionales de células T de memoria incluyen células tales como células T de memoria central (células Tcm), células T de memoria efectoras (células Tem y células TEMRA). Una célula T también puede referirse a una célula T modificada genéticamente, como una célula T que ha sido modificada para expresar un receptor de célula T (TCR) o un receptor de antígeno quimérico (CAR). Las células T también se pueden diferenciar de las células madre o células progenitoras.

[00258] «Células T CD4+» se refiere a un subconjunto de células T que expresan CD4 en su superficie y están asociadas con una respuesta inmunitaria celular. Las células T CD4+ se caracterizan por un perfil de secreción posestimulación que puede incluir la secreción de citocinas como IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-10. «CD4» es una glicoproteína de 55 kD definida originalmente como un antígeno de diferenciación en los linfocitos T, pero también se encontró en otras células, incluidos monocitos y macrófagos. El antígeno CD4 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se ha implicado como elemento de reconocimiento asociativo en respuestas inmunitarias restringidas de clase II del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad). En los linfocitos T, el antígeno CD4 define un subconjunto auxiliar/inductor.

[00259] «Células T CD8+» se refiere a un subconjunto de células T que expresan CD8 en su superficie, están restringidas al MHC de clase I y funcionan como células T citotóxicas. La molécula «CD8» es un antígeno de diferenciación presente en los timocitos, así como en los linfocitos T citotóxicos y supresores. El antígeno CD8 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y es un elemento de reconocimiento asociativo en las interacciones de restricción de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad.

[00260] Tal como se utiliza en la presente, la frase «célula madre hematopoyética» se refiere a un tipo de célula madre que puede dar lugar a una célula sanguínea. Las células madre hematopoyéticas pueden dar lugar a células de los linajes mieloide o linfoide, o una combinación de estos. Las células madre hematopoyéticas se encuentran predominantemente en la médula ósea, aunque pueden aislarse de la sangre periférica o de una fracción de ella. Se pueden utilizar varios marcadores de superficie celular para identificar, clasificar o purificar células madre hematopoyéticas. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas se identifican como c-kit^{+} y lin^{-}. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas humanas se identifican como CD34^{+}, CD59^{+}, Thy1/CD90^{+}, CD38$^{lo/-}$, C-kit/CD117^{+}, lin^{-}. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas humanas se identifican como CD34^{-}, CD59^{+}, Thy1/CD90^{+}, CD38$^{lo/-}$, C-kit/CD117^{+}, lin^{-}. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas humanas se identifican como CD133^{+}, CD59^{+}, Thy1/CD90^{+}, CD38$^{lo/-}$, C-kit/CD117^{+}, lin^{-}. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas de ratón se identifican como CD34$^{lo/-}$, SCA-1^{+}, Thy1$^{+/lo}$, CD38^{+}, C-kit $^{+}$, lin^{-}. En algunos casos, las células madre hematopoyéticas son CD150^{+}CD48^{-}CD244^{-}.

[00261] Tal como se utiliza en la presente, la frase «célula hematopoyética» se refiere a una célula derivada de una célula madre hematopoyética. La célula hematopoyética puede obtenerse o proporcionarse mediante aislamiento de un organismo, sistema, órgano o tejido (p. ej., sangre o una fracción de este). Alternativamente, se puede aislar una célula madre hematopoyética y obtener o proporcionar la célula hematopoyética diferenciando la célula madre. Las células hematopoyéticas incluyen células con potencial limitado para diferenciarse en otros tipos de células. Dichas células hematopoyéticas incluyen, entre otras, células progenitoras multipotentes, células progenitoras de linaje restringido, células progenitoras mieloides comunes, células progenitoras de granulocitos-macrófagos o células progenitoras de megacariocitos-eritroides. Las células hematopoyéticas incluyen células de los linajes linfoide y mieloide, como linfocitos, eritrocitos, granulocitos, monocitos y trombocitos.

[00262] Tal como se utiliza en la presente, el término «construcción» se refiere a un complejo de moléculas, que incluyen macromoléculas o polinucleótidos.

[00263] Como se usa en la presente, el término «integración» se refiere al proceso de insertar de manera estable uno o más nucleótidos de una construcción en el genoma celular, es decir, unir covalentemente a una secuencia de ácido nucleico en el ADN cromosómico de la célula. También puede referirse a eliminaciones de nucleótidos en un sitio de integración. Cuando hay una eliminación en el sitio de inserción, la «integración» puede incluir además la sustitución de la secuencia endógena o el nucleótido eliminado con uno o más nucleótidos insertados.

[00264] Tal como se utiliza en la presente, el término «exógeno» se refiere a una molécula o actividad que se ha introducido en una célula hospedadora y no es nativa de esa célula. La molécula puede introducirse, por ejemplo, mediante introducción del ácido nucleico codificante en el material genético del hospedador, tal como mediante integración en un cromosoma hospedador, o como material genético no cromosómico, tal como un plásmido. Por tanto, el término, cuando se usa en relación con la expresión de un ácido nucleico codificante, se refiere a la introducción del ácido nucleico codificante en una célula en una forma expresable. El término «endógeno» se refiere a una molécula o actividad que está presente en una célula hospedadora en condiciones naturales y no editadas. De manera similar, el término, cuando se usa en relación con la expresión del ácido nucleico codificante, se refiere a la expresión del ácido nucleico codificante que está contenido dentro de la célula y no introducido

exógenamente.

[00265] El término «heterólogo» se refiere a una secuencia o dominio de ácido nucleico o polipéptido que no es nativo de una secuencia flanqueante, por ejemplo, donde la secuencia heteróloga no se encuentra en la naturaleza acoplada a las secuencias de ácido nucleico o polipéptido que se encuentran en uno o ambos extremos.

[00266] El término «homólogo» se refiere a una secuencia o dominio de ácido nucleico o polipéptido que es nativo de una secuencia flanqueante, por ejemplo, donde la secuencia homóloga se encuentra en la naturaleza acoplada a las secuencias de ácido nucleico o polipéptido que se encuentran en uno o ambos extremos.

[00267] Como se usa en la presente, una «construcción donante de polinucleótidos» se refiere a una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, secuencia de ADN) que se inserta genéticamente en un polinucleótido y es exógena a ese polinucleótido. La construcción donante de polinucleótidos se transcribe en ARN y opcionalmente se traduce en un polipéptido. La construcción donante de polinucleótidos puede incluir secuencias procarióticas, ADNc de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (por ejemplo, de mamífero) y secuencias de ADN sintético. Por ejemplo, la construcción donante de polinucleótidos puede ser un miARN, ARNhc, un polipéptido natural (es decir, un polipéptido de origen natural) o un fragmento de este o un polipéptido variante (por ejemplo, un polipéptido natural que tiene menos del 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido natural) o fragmentos de este.

[00268] Tal como se utiliza en la presente, el término «complementario» o «complementariedad» se refiere a un emparejamiento de bases específico entre nucleótidos o ácidos nucleicos. Los nucleótidos complementarios son, generalmente, A y T (o A y U), y G y C. Los ARN guía descritos en la presente pueden comprender secuencias, por ejemplo, secuencia de direccionamiento de ADN que son perfectamente complementarias o sustancialmente complementarias (por ejemplo, que tienen de 1 a 4 incompatibilidades) a una secuencia genómica en una célula.

[00269] El término «codificar» se refiere a secuencias codificantes de proteínas o secuencias no codificantes de proteínas. Las secuencias no codificantes de proteínas incluyen, entre otras, ARN en horquilla corta (ARNhc), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc) u oligonucleótidos antisentido.

[00270] Tal como se utiliza en la presente, el término «transgén» se refiere a un polinucleótido que se ha transferido de forma natural o mediante cualquiera de varias técnicas de ingeniería genética de un organismo a otro. Opcionalmente se traduce en un polipéptido. Opcionalmente se traduce en una proteína recombinante. Una «proteína recombinante» es una proteína codificada por un gen (ADN recombinante) que ha sido clonado en un sistema que soporta la expresión del gen y la traducción del ARN mensajero (ver sistema de expresión). La proteína recombinante puede ser un agente terapéutico, por ejemplo, una proteína que trata una enfermedad o trastorno descrito en la presente. Tal como se usa, transgén puede referirse a un polinucleótido que codifica un polipéptido.

[00271] Los términos «proteína», «polipéptido» y «péptido» se usan en forma intercambiable en la presente.

[00272] Tal como se utiliza en la presente, la expresión «unido operativamente» o «unido de manera operativa» se refiere a la unión de una secuencia de ácido nucleico a un único fragmento de ácido nucleico de manera que una función se ve afectada por la otra. Por ejemplo, si un promotor es capaz de afectar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional (es decir, la secuencia codificante o ARN funcional está bajo control transcripcional por el promotor), el promotor está unido operativamente a este. Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a secuencias de control tanto en orientación sentido como antisentido.

[00273] Como se usa en la presente, la expresión «estados de desarrollo celular» se refiere, por ejemplo, a estados en los que la célula está inactiva, se expresa activamente, se diferencia, senescente, etc. el estado de desarrollo celular también puede referirse a una célula en un estado precursor (p. ej., un precursor de células T).

[00274] Tal como se usa, el término «codificante» se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína o polipéptido de interés. La secuencia de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN o ARN. En modalidades preferidas, la molécula es una molécula de ADN. En otras modalidades preferidas, la molécula es una molécula de ARN. Cuando está presente como una molécula de ARN, comprenderá secuencias que dirigen a los ribosomas de la célula hospedadora para que inicien la traducción (por ejemplo, un codón de inicio, ATG) y dirigen a los ribosomas para que finalicen la traducción (por ejemplo, un codón de terminación). Entre el codón de inicio y el codón de terminación hay un marco de lectura

abierto (ORF). Dichos términos son conocidos por un experto en la técnica.

[00275] Tal como se utiliza en la presente, el término «sujeto» se refiere a un sujeto mamífero. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, camellos, cabras, conejos, cerdos y ovejas. En determinadas modalidades, el sujeto es un ser humano. En algunas modalidades, el sujeto tiene una enfermedad o afección que puede tratarse con una célula modificada proporcionada en la presente o una población de esta. En algunos aspectos, la enfermedad o afección es un cáncer.

[00276] Como se usa en la presente, el término «promotor» se refiere a una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, secuencia de ADN) capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. La secuencia promotora consiste en elementos corriente arriba proximales y más distales, estos últimos elementos a menudo se denominan potenciadores. Un promotor puede derivarse de genes naturales en su totalidad, puede estar compuesto de diferentes elementos de diferentes promotores que se encuentran en la naturaleza y/o puede comprender segmentos de ADN sintético. Un promotor, como se contempla en la presente, puede ser endógeno a la célula de interés o exógeno a la célula de interés. Los expertos en la técnica reconocerán que diferentes promotores pueden inducir la expresión génica en diferentes tejidos o tipos de células, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Como se sabe en la técnica, se puede seleccionar un promotor según la fuerza del promotor y/o las condiciones bajo las cuales el promotor es activo, por ejemplo, promotor constitutivo, promotor fuerte, promotor débil, promotor inducible/reprimible, promotores específicos de tejido o regulados por el desarrollo, promotores dependientes del ciclo celular y similares.

[00277] Un promotor puede ser un promotor inducible (por ejemplo, un promotor de choque térmico, un promotor regulado por tetraciclina, un promotor regulado por esteroides, un promotor regulado por metales, un promotor regulado por receptores de estrógenos, etc.). El promotor puede ser un promotor constitutivo (por ejemplo, promotor CMV, promotor UBC). En algunas modalidades, el promotor puede ser un promotor espacialmente restringido y/o temporalmente restringido (por ejemplo, un promotor específico de tejido, un promotor específico de tipo celular, etc.). Ver, por ejemplo, la publicación estadounidense 20180127786, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

[00278] La edición de genes, como se contempla en la presente, puede implicar la activación o desactivación de un gen (o secuencia de nucleótidos). Tal como se utiliza en la presente, el término «activación» se refiere a una adición de una secuencia de ADN, o fragmento de esta, en un genoma. Dichas secuencias de ADN que se van a activar pueden incluir un gen o genes completos, pueden incluir secuencias reguladoras asociadas con un gen o cualquier porción o fragmento de lo anterior. Por ejemplo, se puede insertar una construcción donante de polinucleótidos que codifica una proteína recombinante en el genoma de una célula que porta un gen mutante. En algunas modalidades, una estrategia de activación implica la sustitución de una secuencia existente con la secuencia proporcionada, por ejemplo, la sustitución de un alelo mutante con una copia de tipo silvestre. Por otro lado, el término «desactivación» se refiere a la eliminación de un gen o la expresión de un gen. Por ejemplo, un gen puede ser desactivado mediante una eliminación o adición de una secuencia de nucleótidos que conduce a una alteración del marco de lectura. Como otro ejemplo, se puede eliminar un gen reemplazando una parte del gen con una secuencia irrelevante (por ejemplo, no codificante).

[00279] Tal como se utiliza en la presente, la expresión «unión de extremos no homólogos» o NHEJ se refiere a un proceso celular en el que los extremos cortados o mellados de una cadena de ADN se ligan directamente sin la necesidad de un ácido nucleico de plantilla homólogo. NHEJ puede conducir a la adición, eliminación, sustitución o combinación de estas, de uno o más nucleótidos en el sitio de reparación.

[00280] Tal como se utiliza en la presente, la expresión «reparación dirigida por homología» o HDR se refiere a un proceso celular en el que los extremos cortados o mellados de una cadena de ADN se reparan mediante polimerización a partir de un ácido nucleico de plantilla homólogo. Por lo tanto, la secuencia original se reemplaza con la secuencia de la plantilla. El ácido nucleico de plantilla homólogo puede ser proporcionado por secuencias homólogas en otras partes del genoma (cromátidas hermanas, cromosomas homólogos o regiones repetidas en el mismo cromosoma o en diferentes cromosomas). Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico de plantilla exógeno para obtener un cambio específico inducido por HDR de la secuencia en el sitio diana. De esta manera, se pueden introducir mutaciones específicas en el lugar del corte.

[00281] Como se usa en la presente, una plantilla de ADN monocatenario o un molde de ADN bicatenario se refiere a un oligonucleótido de ADN que una célula puede usar como plantilla

para HDR. Generalmente, la plantilla de ADN monocatenario o una plantilla de ADN bicatenario tiene al menos una región de homología con un sitio diana. En algunos casos, la plantilla de ADN monocatenario o la plantilla de ADN bicatenario tiene dos regiones homólogas que flanquean una región que contiene una secuencia heteróloga que se insertará en un sitio de corte diana.

[00282] Los términos «vector» y «plásmido» se usan indistintamente y tal como se usan en la presente se refieren a vehículos polinucleotídicos útiles para introducir material genético en una célula. Los vectores pueden ser lineales o circulares. Los vectores pueden integrarse en un genoma diana de una célula hospedadora o replicarse de forma independiente en una célula hospedadora. Los vectores pueden comprender, por ejemplo, un origen de replicación, un sitio de multiclonación y/o un marcador seleccionable. Un vector de expresión normalmente comprende un casete de expresión. Los vectores y plásmidos incluyen, entre otros, vectores de integración, plásmidos procarióticos, plásmidos eucariotas, cromosomas sintéticos vegetales, episomas, cósmidos y cromosomas artificiales.

[00283] Como se usa en la presente, la frase «introducir» en el contexto de introducir un ácido nucleico o un complejo que comprende un ácido nucleico, por ejemplo, un complejo de plantilla de RNP-ADN, se refiere a la translocación de la secuencia de ácido nucleico o del complejo de plantilla de RNP-ADN desde el exterior de una célula hacia el interior de esta. En algunos casos, introducir se refiere a la translocación del ácido nucleico o del complejo desde el exterior de la célula hacia el interior del núcleo de esta. Se contemplan varios métodos de dicha translocación, que incluyen, entre otros, electroporación, contacto con nanocables o nanotubos, internalización mediada por receptores, translocación mediante péptidos que penetran en las células, translocación mediada por liposomas y similares.

[00284] Como se usa en la presente, la expresión «casete de expresión» es una construcción de polinucleótido, generada de forma recombinante o sintética, que comprende secuencias reguladoras unidas operativamente a un polinucleótido seleccionado para facilitar la expresión del polinucleótido seleccionado en una célula hospedadora. Por ejemplo, las secuencias reguladoras pueden facilitar la transcripción del polinucleótido seleccionado en una célula hospedadora, o la transcripción y traducción del polinucleótido seleccionado en una célula hospedadora. Un casete de expresión puede estar integrado, por ejemplo, en el genoma de una célula hospedadora o estar presente en un vector de expresión.

[00285] Como se usa en la presente, la frase «sujeto que lo necesita» se refiere a un sujeto que presenta y/o se le diagnostica uno o más síntomas o signos de una enfermedad o trastorno como se describe en la presente.

[00286] Un «agente quimioterapéutico» se refiere a un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los agentes quimioterapéuticos incluyen «agentes antihormonales» o «terapias endocrinas» que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer.

[00287] El término «composición» se refiere a una mezcla que contiene, por ejemplo, una célula o proteína modificada contemplada en la presente. En algunas modalidades, la composición puede contener componentes adicionales, tales como adyuvantes, estabilizadores, excipientes y similares. La expresión «composición» o «composición farmacéutica» hace referencia a una preparación de forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en esta sea eficaz para tratar a un sujeto, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para el sujeto en las cantidades proporcionadas en la composición farmacéutica.

[00288] El término «in situ» se refiere a procesos que ocurren en una célula viva que crece separada de un organismo vivo, por ejemplo, que crece en un cultivo de tejidos.

[00289] El término «in vivo» se refiere a procesos que ocurren en un organismo vivo.

[00290] Tal como se utiliza en la presente, el término «ex vivo» generalmente incluye experimentos o mediciones realizadas en o sobre tejido vivo, preferiblemente en un ambiente artificial fuera del organismo, preferiblemente con diferencias mínimas con respecto a las condiciones naturales.

[00291] El término «mamífero», como se utiliza en la presente, incluye humanos y no humanos e incluye, entre otros, humanos, primates no humanos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos y porcinos.

[00292] El término porcentaje de «identidad», en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia, según se mide utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias que se describen a continuación (por ejemplo, BLASTP y BLASTN u otros algoritmos disponibles para los

expertos) o mediante inspección visual. En función de la aplicación, el porcentaje de «identidad» puede existir sobre una región de la secuencia que se compara, por ejemplo, sobre un dominio funcional o, alternativamente, puede existir sobre la longitud completa de las dos secuencias que se comparan.

[00293] Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Luego, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa designados.

[00294] El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación homológica de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por el método de búsqueda de similitudes de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección visual (véase, de manera general, Ausubel et al., infra).

[00295] Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

[00296] La expresión «cantidad suficiente» significa una cantidad suficiente para producir un efecto deseado, por ejemplo, una cantidad suficiente para modular la agregación de proteínas en una célula.

[00297] La expresión «cantidad terapéuticamente eficaz» es una cantidad que es eficaz para mejorar un síntoma de una enfermedad.

[00298] El término «mejorar» se refiere a cualquier resultado terapéuticamente beneficioso en

el tratamiento de un estado de enfermedad, por ejemplo, un estado de enfermedad de cáncer, disminución de la gravedad o progresión, remisión o cura de este.

[00299] Como se usa en la presente, la expresión «cantidad eficaz» se refiere a la cantidad de un compuesto (por ejemplo, composiciones descritas en la presente, células descritas en la presente) suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no se pretende que se limite a una formulación o vía de administración particular.

[00300] Como se usa en la presente, el término «tratar» incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminuir, reducir, modular, mejorar o eliminar, que tenga como resultado la mejora de la afección, enfermedad, trastorno y similares, o la mejora de un síntoma de este.

[00301] Los términos «modular» y «modulación» se refieren a reducir o inhibir o, alternativamente, activar o aumentar, una variable mencionada.

[00302] Los términos «aumentar» y «activar» se refieren a un aumento del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más en una variable mencionada.

[00303] Los términos «reducir» e «inhibir» se refieren a una disminución del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más en una variable mencionada.

[00304] Cabe destacar que, tal como se utilizan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una» y «el/la» incluyen las formas plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Sistemas de compuertas lógicas

[00305] Como se usa en la presente, una «compuerta lógica», «circuito», «receptor de circuito», «sistema» o «receptor de sistema» se refiere a un sistema de expresión de proteínas de dos partes que comprende un receptor cebador y un receptor de antígeno quimérico. El sistema puede codificarse en al menos un ácido nucleico insertado en una célula, donde el receptor cebador se expresa en la célula. El dominio intracelular del receptor cebador se escinde del dominio transmembrana tras la unión del receptor cebador a su antígeno diana. El dominio intracelular es entonces capaz de translocarse al núcleo celular donde induce la expresión del receptor de antígeno quimérico.

[00306] En un aspecto, se proporcionan en la presente sistemas que comprenden un

receptor cebador que se une a ALPG/P y un receptor de antígeno quimérico que se une a MSLN, donde el factor de transcripción del dominio intracelular del receptor cebador es capaz de inducir la expresión del CAR. Estos sistemas también se denominan «compuertas lógicas» o «circuitos». En algunos aspectos, el sistema está codificado por transgenes de ácido nucleico insertados en una célula inmunitaria. El sistema puede codificarse en un único inserto o fragmento de ácido nucleico que comprende ambos transgenes, o puede codificarse en dos ácidos nucleicos que codifican los transgenes del sistema individualmente. El receptor cebador y el CAR del sistema se pueden colocar en cualquier orden en un único ácido nucleico. Por ejemplo, el receptor cebador puede estar en el extremo 5' y el CAR puede estar en el extremo 3', o el CAR puede estar en el extremo 5' y el receptor cebador puede estar en el extremo 3'.

[00307] Un primer promotor constitutivo puede unirse operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador. Un promotor inducible también puede unirse operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR. Un segundo promotor constitutivo puede unirse operativamente al primer ácido nucleico complementario a un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39. Un tercer promotor constitutivo puede unirse operativamente al segundo ácido nucleico complementario a un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40 o que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00308] En algunas modalidades, cuando el sistema está codificado en un único inserto o fragmento de ácido nucleico recombinante que comprende tanto transgenes como ácido(s) nucleico(s), el inserto de ácido nucleico recombinante puede comprender, en una dirección de 5' a 3', el primer promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica un primer ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano, al ARNm de PTPN2 humano o al ARNm de TOX humano; el promotor inducible; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

[00309] En algunas modalidades, cuando el sistema está codificado en un único inserto o fragmento de ácido nucleico recombinante que comprende tanto transgenes como ácido(s) nucleico(s), el inserto de ácido nucleico recombinante puede comprender, en una dirección de

5' a 3', el primer promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador; la secuencia de nucleótidos que codifica un primer ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano, al ARNm de PTPN2 humano o al ARNm de TOX humano; el promotor inducible; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

[00310] En algunas modalidades, cuando el sistema está codificado en un único inserto o fragmento de ácido nucleico recombinante que comprende tanto transgenes como ácido(s) nucleico(s), el inserto de ácido nucleico recombinante puede comprender, en una dirección de 5' a 3', el primer promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador; la secuencia de nucleótidos que codifica un primer ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano, al ARNm de PTPN2 humano o al ARNm de TOX humano; la secuencia de nucleótidos que codifica un segundo ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano, al ARNm de PTPN2 humano o al ARNm de TOX humano; el promotor inducible; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

[00311] En algunas modalidades, cuando el sistema está codificado en un único inserto o fragmento de ácido nucleico recombinante que comprende tanto transgenes como ácido(s) nucleico(s), el inserto de ácido nucleico recombinante puede comprender, en una dirección de 5' a 3', el promotor inducible; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica un primer ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano, al ARNm de PTPN2 humano o al ARNm de TOX humano; y el primer promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

[00312] En algunas modalidades, cuando el sistema está codificado en un único inserto o fragmento de ácido nucleico recombinante que comprende tanto transgenes como ácido(s) nucleico(s), el inserto de ácido nucleico recombinante puede comprender, en una dirección de 5' a 3', el promotor inducible; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico; el primer promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica un primer ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano, al ARNm de PTPN2 humano o al ARNm de TOX humano; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

[00313] En algunas modalidades, cuando el sistema está codificado en un único inserto o

fragmento de ácido nucleico recombinante que comprende tanto transgenes como ácido(s) nucleico(s), el inserto de ácido nucleico recombinante puede comprender, en una dirección de 5' a 3', el promotor inducible; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico; el primer promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica un primer ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano, al ARNm de PTPN2 humano o al ARNm de TOX humano; la secuencia de nucleótidos que codifica un segundo ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano, al ARNm de PTPN2 humano o al ARNm de TOX humano; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

[00314] En algunas modalidades, cuando el sistema está codificado en un único inserto o fragmento de ácido nucleico recombinante que comprende tanto transgenes como ácido(s) nucleico(s), el inserto de ácido nucleico recombinante puede comprender, en una dirección de 5' a 3', el primer promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano; la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo ácido nucleico complementario al ARNm de PTPN2 o al ARNm de TOX humanos; el promotor inducible; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

[00315] En otras modalidades, el inserto de ácido nucleico recombinante puede comprender, en dirección 5' a 3', el primer promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo primer ácido nucleico complementario al ARNm de PTPN2 o al ARNm de TOX humanos; la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano; el promotor inducible; y la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

[00316] En otras modalidades, el inserto de ácido nucleico recombinante puede comprender, en dirección 5' a 3', el promotor inducible; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano; la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo primer ácido nucleico complementario al ARNm de PTPN2 o al ARNm de TOX humanos; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

[00317] En otras modalidades, el inserto de ácido nucleico recombinante puede comprender, en dirección 5' a 3', el promotor inducible; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo primer ácido nucleico complementario al ARNm de PTPN2 o al ARNm de TOX humanos; la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario al ARNm de FAS humano; el segundo promotor constitutivo; la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

[00318] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO; 166, 167, 168, 169, 170 o 171. En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 166. En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 167. En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 168. En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 169. En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 170. En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 171.

Receptores cebadores

[00319] En la presente se proporcionan receptores cebadores que comprenden un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina placentaria/de células germinales (ALPG/P); ALPP: NCBI Entrez Gene: 250, UniProtKB/Swiss-Prot: P05187; ALPG: NCBI Entrez Gene: 251, UniProtKB/Swiss-Prot: P10696). En algunas modalidades, el receptor cebador comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina placentaria (ALPP). En algunas modalidades, el receptor cebador comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina de células germinales (ALPG). Como se utiliza en la presente, «Fosfatasa alcalina placentaria/de células germinales (ALPG/P)» se refiere tanto a la fosfatasa alcalina placentaria (ALPP) como a la fosfatasa alcalina de células germinales (ALPG). Un dominio de unión al antígeno que se une específicamente a ALPG/P es capaz de unirse específicamente a ALPG y/o ALPP.

[00320] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende una secuencia como se

establece en la SEQ ID NO: 24. En algunas modalidades, el receptor cebador comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 25.

[00321] En determinados aspectos de la presente divulgación, el receptor cebador es un receptor sintético basado en la proteína Notch. La unión de un receptor Notch natural a un ligando afín, como los de la familia de proteínas Delta, provoca una proteólisis intramembrana que escinde un fragmento intracelular de la proteína Notch. Este fragmento intracelular es un regulador transcripcional que sólo funciona cuando se escinde de Notch. La escisión puede ocurrir mediante proteólisis secuencial por la metaloproteasa ADAM y el complejo gamma-secretasa. Este fragmento intracelular ingresa al núcleo de una célula y activa genes de señalización intercelular. A diferencia de una proteína Notch natural, un receptor cebador de Notch sintético reemplaza el fragmento intracelular de Notch natural por uno que hace que un gen que codifica una proteína de elección, como un CAR, se transcriba tras la liberación del fragmento intracelular del receptor cebador.

[00322] Los receptores Notch tienen una organización de dominio modular. Los ectodominios de los receptores Notch consisten en una serie de repeticiones similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) de extremo N que son responsables de la unión del ligando. En los receptores Notch sintéticos o receptores cebadores, el dominio de unión al ligando de Notch se reemplaza con un dominio de unión al ligando que se une a un ligando o antígeno diana seleccionado. Las repeticiones de EGF van seguidas de tres módulos de repetición LIN -12/Notch (LNR), que son exclusivos de los receptores Notch y, según se informa ampliamente, participan en la prevención de la activación prematura del receptor. El dominio de heterodimerización (HD) de Notchl se divide mediante escisión de furina, de modo que su parte de extremo N termina la subunidad extracelular y su mitad de extremo C constituye el comienzo de la subunidad transmembrana. Después de la región extracelular, el receptor tiene un segmento transmembrana y un dominio intracelular (ICD), que incluye un regulador transcripcional.

[00323] Se pueden usar múltiples formas de receptores cebadores en los métodos, células y ácidos nucleicos como se describen en la presente. Un tipo de receptor cebador contemplado para su uso en los métodos y células de la presente comprende un dominio de unión al ligando extracelular heterólogo, un polipéptido de unión que tiene una identidad de secuencia sustancial con un receptor Notch que incluye el NRR, un TMD y un ICD. Los receptores «Fn

Notch» comprenden un dominio de unión al ligando extracelular heterólogo, un polipéptido de enlace que tiene una identidad de secuencia sustancial con un receptor Robo (tal como un Robol, Robo2, Robo3 o Robo4 de mamífero), seguido de 1, 2 o 3 repeticiones de fibronectina («Fn»), un TMD y un ICD. Los receptores «Mini Notch» comprenden un dominio de unión al ligando extracelular heterólogo, un polipéptido de enlace que tiene una identidad de secuencia sustancial con un receptor Notch (que carece de NRR), un TMD y un ICD. Los receptores «Notch enlazador mínimo» comprenden un dominio de unión al ligando extracelular heterólogo, un polipéptido de enlace que carece de identidad de secuencia sustancial con un receptor Notch (p. ej., una secuencia polipeptídica sintética (GGS)n), un TMD y un ICD. Los receptores «Notch bisagra» comprenden un dominio de unión al ligando extracelular heterólogo, una secuencia bisagra que comprende un dominio de oligomerización (es decir, un dominio que promueve la dimerización, trimerización o multimerización de orden superior con un receptor sintético y/o un receptor hospedador existente), un TMD y un ICD. Todas estas clases de receptores son sintéticos, recombinantes y no se encuentran en la naturaleza. En algunas modalidades, los receptores no naturales descritos en la presente se unen a un ligando exhibido en la superficie de la célula diana, lo que desencadena la escisión proteolítica de los receptores y la liberación de un regulador transcripcional que modula un programa transcripcional personalizado en la célula. En algunas modalidades, el receptor cebador no incluye una repetición LIN-12-Notch (LNR) y/o un dominio de heterodimerización (HD) de un receptor Notch.

Dominio extracelular del receptor cebador

[00324] El receptor cebador descrito en la presente comprende un dominio extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina placentaria/de células germinales (ALPG/P; ALPP: NCBI Entrez Gene: 250, UniProtKB/Swiss-Prot: P05187; ALPG: NCBI Entrez Gene: 251, UniProtKB/Swiss-Prot: P10696). En algunas modalidades, el dominio extracelular incluye la porción de unión al ligando de un receptor. En algunas modalidades, el dominio extracelular incluye un resto de unión al antígeno que se une a uno o más antígenos diana. En algunas modalidades, el resto de unión al antígeno incluye uno o más determinantes de unión al antígeno de un anticuerpo o un fragmento funcional de unión al antígeno de este. En algunas modalidades, el resto de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un nanocuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo o un minicuerpo, un fragmento

F(ab')2, un fragmento Fab, un fragmento variable de cadena simple (scFv), y un anticuerpo de dominio único (sdAb), o un fragmento funcional de este. En algunas modalidades, el resto de unión al antígeno comprende un scFv. El resto de unión al antígeno puede incluir secuencias de aminoácidos naturales o puede diseñarse o modificarse para proporcionar propiedades deseadas y/o mejoradas, por ejemplo, mayor afinidad de unión.

[00325] Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula diana, los términos «unir», «unión específica», «se une de forma específica a», «específico para», «se une de forma selectiva» y «selectivo para» un antígeno particular (por ejemplo, una diana polipeptídica) o un epítopo en un antígeno particular indican una unión perceptiblemente diferente a una interacción no específica o no selectiva (por ejemplo, con una molécula distinta de la diana). Por ejemplo, un anticuerpo que «se une selectivamente» o «se une específicamente» a un antígeno es un resto de unión al antígeno que se une al antígeno con alta afinidad y no se une significativamente a otros antígenos no relacionados. La unión específica se puede medir, por ejemplo, midiendo la unión a una molécula diana y comparándola con la unión a una molécula no diana. La unión específica también puede determinarse mediante competencia con una molécula de control que imita el epítopo reconocido en la molécula diana. En ese caso, la unión específica está indicada si la molécula de control inhibe competitivamente la unión del anticuerpo a la molécula diana. En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a la fosfatasa alcalina de tipo célula germinal (ALPG). En algunas modalidades, el dominio extracelular incluye un resto de unión al antígeno que se une a la fosfatasa alcalina placenta (ALPP).

[00326] «Afinidad» se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno o epítopo). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en la presente, «afinidad» hace referencia a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno o epítopo). La afinidad de una molécula X por su compañera Y puede estar representada por la constante de equilibrio de disociación (K_D). Los componentes cinéticos que contribuyen a la constante de equilibrio de disociación se describen con más detalle a continuación. La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen, entre otros, tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) (por ejemplo, BIACORE®)

o interferometría de biocapa (por ejemplo, FORTEBIO®).

[00327] Las expresiones «región hipervariable» o «HVR», cuando se usan en la presente, hacen referencia a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en cuanto a secuencia y/o que forman bucles estructuralmente definidos («bucles hipervariables»). Generalmente, los anticuerpos de cuatro cadenas naturales comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Los HVR generalmente comprenden residuos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), siendo estas últimas las de mayor variabilidad de secuencia y/o implicadas en el reconocimiento de antígenos. Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los residuos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan «regiones determinantes de complementariedad» (CDR), y estos términos se usan en la presente indistintamente en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión al antígeno. Esta región particular ha sido descrita por Kabat et ál., Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) y por Chothia et ál., J Mol Biol 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen superposiciones o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, se pretende que la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de este esté dentro del alcance del término tal como se define y utiliza en la presente. Los números exactos de residuos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar de forma rutinaria qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

[00328] Los límites de la secuencia de aminoácidos de una CDR pueden ser determinados por un experto en la técnica utilizando cualquiera de varios esquemas de numeración conocidos, incluidos los descritos por Kabat et ál., supra (esquema de numeración «Kabat»); Al-Lazikani et ál., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948 (esquema de numeración «Chothia»); MacCallum et ál., 1996, J. Mol. Biol. 262:732-745 (esquema de numeración «Contact»); Lefranc et ál., Dev. Comp. Inmunol., 2003, 27:55-77 (esquema de numeración «IMGT»); y Honegage y Plückthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657-70 (esquema de numeración «AHo»); cada uno de los cuales se incorpora mediante referencia en su totalidad.

[00329] La Tabla A proporciona las posiciones de CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 identificadas por los esquemas de Kabat y Chothia. Para CDR-H1, la numeración de residuos se proporciona utilizando los esquemas de numeración de Kabat y Chothia.

[00330] Las CDR se pueden asignar, por ejemplo, usando software de numeración de anticuerpos, tal como Abnum, disponible en bioinf.org.uk/abs/abnum/, y descrito en Abhinandan y Martin, Immunology, 2008, 45:3832-3839, incorporado mediante referencia en su totalidad.

Tabla A. Residuos en CDR de acuerdo con esquemas de numeración de Kabat y Chothia.

CDR	**Kabat**	**Chothia**
L1	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97
H1 (Numeración Kabat)	H31-H35B	H26-H32 o H34*
H1 (Numeración de Chothia)	H31-H35	H26-H32
H2	H50-H65	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102

* El extremo C de CDR-H1, cuando se numera utilizando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34, dependiendo de la longitud de la CDR.

[00331] El «esquema de numeración UE» se utiliza generalmente cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo (por ejemplo, como se informa en Kabat et ál., supra). A menos que se indique lo contrario, el esquema de numeración UE se utiliza para hacer referencia a residuos en las regiones constantes de la cadena pesada del anticuerpo descritas en la presente.

[00332] **Tabla A1**. Sustituciones conservadoras ilustrativas

Original	**Ejemplos de sustituciones**	**Ejemplos de sustituciones específicas**
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln

Original	Ejemplos de sustituciones	Ejemplos de sustituciones específicas
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala	Leu

[00333] Tal como se utiliza en la presente, la expresión «cadena simple» se refiere a una molécula que comprende monómeros de aminoácidos unidos linealmente mediante enlaces peptídicos. En una modalidad particular de este tipo, el extremo C de la cadena ligera Fab está conectado al extremo N de la cadena pesada Fab en la molécula Fab de cadena simple. Como se describe con más detalle en la presente, un scFv tiene un dominio variable de cadena ligera (VL) conectado desde su extremo C al extremo N de un dominio variable de cadena pesada (VH) mediante una cadena polipeptídica. Alternativamente, el scFv consta de una cadena polipeptídica en la que el extremo C de VH está conectado al extremo N de VL mediante una cadena polipeptídica.

[00334] El «fragmento Fab» (también denominado fragmento de unión al antígeno) contiene el dominio constante (CL) de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada junto con los dominios variables VL y VH en las cadenas ligera y pesada, respectivamente. Los dominios variables comprenden los bucles determinantes de la

complementariedad (CDR, también denominados región hipervariable) que participan en la unión al antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab debido a la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.

[00335] Los fragmentos «$F(ab')_2$» contienen dos fragmentos Fab' unidos, cerca de la región bisagra, mediante enlaces disulfuro. Los fragmentos $F(ab')_2$ pueden generarse, por ejemplo, mediante métodos recombinantes o mediante digestión con pepsina de un anticuerpo intacto. Los fragmentos F(ab') pueden disociarse, por ejemplo, mediante tratamiento con ß-mercaptoetanol.

[00336] Los fragmentos «Fv» comprenden un dímero unido no covalentemente de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera.

[00337] El «Fv de cadena simple» o «scFv» incluye los dominios VH y VL de un anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En una modalidad, el polipéptido Fv comprende, además, un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para analizar el scFv véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, tomo 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994). Los fragmentos scFv del anticuerpo HER2 se describen en el documento WO93/16185; Patente de EE.UU. nº 5,571,894; y la patente de EE.UU. nº 5,587,458.

[00338] La expresión «anticuerpo de dominio simple» o «sdAb» se refiere a una molécula en la que un dominio variable de un anticuerpo se une específicamente a un antígeno sin la presencia del otro dominio variable. Los anticuerpos de dominio simple y sus fragmentos se describen en Arabi Ghahroudi et ál., FEBS Letters, 1998, 414:521-526 y Muyldermans et ál., Trends in Biochem. Sci., 2001, 26:230-245, cada uno de los cuales se incorpora mediante referencia en su totalidad. Los anticuerpos de dominio simple también se conocen como sdAb o nanocuerpos. Los Sdabs son bastante estables y fáciles de expresar como auxiliar de fusión con la cadena Fc de un anticuerpo (Harmsen MM, De Haard HJ (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments". Appl. Microbiol Biotechnol. 77(1): 13-22).

<u>CDR del receptor cebador, dominios VH, VL</u>

[00339] En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno extracelular del receptor

cebador comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL). que comprende tres secuencias CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2, CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5; y CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la secuencia de la cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, la VL comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el dominio extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

[00340] En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno extracelular del receptor cebador CDR-H3 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H3 de SEQ ID NO: 3, la CDR-H2 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H2 de SEQ ID NO: 2, la CDR-H1 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, la CDR-L3 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95% de identidad con una CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, la CDR-L2 tiene al menos aproximadamente un 50%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con una CDR-L2 de SEQ ID NO: 5, y la CDR-L1 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-L1 de SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, la CDR-H3 es una CDR-H3 de SEQ ID NO: 3, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; la CDR-H2 es una CDR-H2 de SEQ ID NO: 2, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; la CDR-H1 es una CDR-H1 de SEQ ID NO: 1, con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos; la CDR-L3 es una CDR-L3 de SEQ ID NO: 6, con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos; la CDR-L2 es una CDR-L2 de SEQ ID NO: 5, con hasta 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos; y la CDR-L1 es una CDR-L1 de SEQ ID NO: 4 con hasta 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos.

[00341] En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno extracelular del receptor cebador proporcionado en la presente comprende de una a tres CDR de un dominio VH como

se establece en la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende de dos a tres CDR de un dominio VH como se establece en la SEQ ID N: 7. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende tres CDR de un dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 7. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Kabat. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Chothia. En algunos aspectos, las CDR son CDR de AbM. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Contact. En algunos aspectos, las CDR son CDR de IMGT.

[00342] En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno extracelular del receptor cebador proporcionado en la presente comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con una secuencia VH establecida en la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende una secuencia VH proporcionada en la SEQ ID NO: 7, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, se hace referencia en la presente a los dominios de unión al antígeno descritos en este párrafo como «variantes». En algunas modalidades, dichas variantes derivan de una secuencia proporcionada en la presente, por ejemplo, mediante maduración por afinidad, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o cualquier otro método conocido en la técnica o descrito en la presente. En algunas modalidades, dichas variantes no derivan de una secuencia proporcionada en la presente y pueden, por ejemplo, aislarse *de novo* de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente para obtener anticuerpos o dominios de unión al antígeno.

[00343] En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno extracelular del receptor cebador proporcionado en la presente comprende de una a tres CDR de un dominio VL como se establece en la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende de dos a tres CDR de un dominio VL como se establece en la SEQ ID N: 8. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende tres CDR de un dominio VL como se establece en la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Kabat. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Chothia. En algunos aspectos, las CDR son CDR de AbM. En algunos

aspectos, las CDR son CDR de Contact. En algunos aspectos, las CDR son CDR de IMGT.

[00344] En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno extracelular del receptor cebador proporcionado en la presente comprende una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con una secuencia VL establecida en la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende una secuencia VL proporcionada en la SEQ ID NO: 8, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, se hace referencia en la presente a los anticuerpos descritos en este párrafo como «variantes». En algunas modalidades, dichas variantes derivan de una secuencia proporcionada en la presente, por ejemplo, mediante maduración por afinidad, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o cualquier otro método conocido en la técnica o descrito en la presente. En algunas modalidades, dichas variantes no derivan de una secuencia proporcionada en la presente y pueden, por ejemplo, aislarse *de novo* de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente para obtener anticuerpos o dominios de unión al antígeno.

[00345] La Tabla B proporciona las secuencias CDR de VH y VL de un dominio de unión al antígeno ALPG/P ilustrativo de acuerdo con los esquemas de numeración indicados.

Tabla B

SEQ ID NO	Nombre	Esquema de numeración	Secuencia
1	CDR-H1	Chothia	GFSLTSY---
173		AbM	GFSLTSYGVS
174		Kabat	-----SYGVS
175		Contact	----TSYGVS
176		IMGT	GFSLTSYG--
2	CDR-H2	Chothia	-----WEDGS---------
177		AbM	---VIWEDGSTN-------
178		Kabat	---VIWEDGSTNYHSALIS
179		Contact	WIGVIWEDGSTN-------

180		IMGT	----IWEDGST--------
3	CDR-H3	Chothia	--PHYGSSYVGAMEY
3		AbM	--PHYGSSYVGAMEY
3		Kabat	--PHYGSSYVGAMEY
181		Contact	ARPHYGSSYVGAME-
182		IMGT	ARPHYGSSYVGAMEY
4	CDR-L1	Chothia	RASENIYSYVA--
4		AbM	RASENIYSYVA--
4		Kabat	RASENIYSYVA--
183		Contact	------YSYVAWY
184		IMGT	---ENIYSY----
5	CDR-L2	Chothia	----NAKSLAS
5		AbM	----NAKSLAS
5		Kabat	----NAKSLAS
185		Contact	LLIYNAKSLA-
186		IMGT	----NA-----
6	CDR-L3	Chothia	QHHYVSPWT
6		AbM	QHHYVSPWT
6		Kabat	QHHYVSPWT
187		Contact	QHHYVSPW-
6		IMGT	QHHYVSPWT

Dominio transmembrana

[00346] Como se describió anteriormente, el receptor cebador comprende un dominio transmembrana (TMD) que comprende uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando.

[00347] En algunas modalidades, el TMD comprende un dominio transmebrana Notch1. En algunas modalidades, el dominio transmembrana comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 19.

[00348] Generalmente, el TMD adecuado para los receptores quiméricos descritos en la presente puede ser cualquier dominio transmembrana de un receptor transmembrana de tipo 1 que incluye al menos un sitio de escisión de gamma-secretasa. Una descripción detallada

de la estructura y función del complejo gamma-secretasa, así como de sus proteínas sustrato, incluida la proteína precursora de amiloide (APP) y Notch, se puede encontrar, por ejemplo, en una revisión reciente de Zhang et ál, Frontiers Cell Neurosci (2014). Los TMD adecuados no taxativos de receptores transmembrana de tipo 1 incluyen aquellos de CLSTN1, CLSTN2, APLP1, APLP2, LRP8, APP, BTC, TGBR3, SPN, CD44, CSF1R, CXCL16, CX3CL1, DCC, DLL1, DSG2, DAG1, CDH1, EPCAM. EPHA4, EPHB2, EFNB1, EFNB2, ErbB4, GHR, HLA-A e IFNAR2, donde el TMD incluye al menos un sitio de escisión de gamma secretasa. Los TMD adicionales adecuados para las composiciones y los métodos descritos en la presente incluyen, entre otros, dominios transmembrana de receptores transmembrana de tipo 1 IL1R1, IL1R2, IL6R, INSR, ERN1, ERN2, JAG2, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE4, KL, CHL1, PTPRF, SCN1B, SCN3B, NPR3, NGFR, PLXDC2, PAM, AGER, ROBOl, SORCS3, SORCS1, SORL1, SDC1, SDC2, SPN, TYR, TYRP1, DCT, YASN, FLT1, CDH5, PKHD1, NECTINl, PCDHGC3, NRG1, LRP1B, CDH2, NRG2, PTPRK, SCN2B, Nradd y PTPRM. En algunas modalidades, el TMD de los polipéptidos quiméricos o receptores Notch de la divulgación es un TMD derivado del TMD de un miembro de la familia de la calsintenina, tal como alcadeína alfa y alcadeína gamma. En algunas modalidades, el TMD de los polipéptidos quiméricos o receptores Notch de la divulgación es un TMD conocido para los receptores Notch. En algunas modalidades, el TMD de los polipéptidos quiméricos o receptores Notch de la divulgación es un TMD derivado de un receptor Notch diferente. Por ejemplo, en un Mini Notch basado en Notchl humano, el TMD Notchl se puede sustituir por un TMD Notch2, TMD Notch3, TMD Notch4 o un TMD Notch de un animal no humano tal como Danio rerio, Drosophila melanogaster, Xenopus laevis, o Gallus gallus.

[00349] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende un sitio de escisión Notch, tal como S2 o S3. Sitios de escisión proteolítica adicionales adecuados para las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen, entre otros, ADAM10, un sitio de escisión de metaloproteinasa para una MMP seleccionada de colagenasa-1, -2 y -3 (MMP-1, -8 y -13), gelatinasa A y B (MMP-2 y -9), estromelisina 1, 2 y 3 (MMP-3, -10 y -11), matrilisina (MMP-7) y metaloproteinasas de membrana (MT1- MMP y MT2-MMP). Otro ejemplo de un sitio de escisión de proteasa adecuado es un sitio de escisión del activador del plasminógeno, por ejemplo, un activador del plasminógeno de urocinasa (uPA) o un sitio de escisión del activador del plasminógeno tisular (tPA). Otro ejemplo de un sitio de escisión de proteasa

adecuado es un sitio de escisión de prolactina. Ejemplos específicos de secuencias de escisión de uPA y tPA incluyen secuencias que comprenden Yal-Gly-Arg. Otro ejemplo de un sitio de escisión de proteasa que puede incluirse en un enlazador proteolíticamente escindible es un sitio de escisión de proteasa de virus de grabado de tabaco (TEV), por ejemplo, Glu-Asn-Leu-Tyr-Thr-Gln-Ser (SEQ ID NO: 188), donde la proteasa se escinde entre la glutamina y la serina. Otro ejemplo de un sitio de escisión de proteasa que puede incluirse en un enlazador proteolíticamente escindible es un sitio de escisión de enterocinasa, por ejemplo, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO: 189), donde la escisión se produce después del residuo de lisina. Otro ejemplo de un sitio de escisión de proteasa que puede incluirse en un enlazador proteolíticamente escindible es un sitio de escisión de trombina, por ejemplo, Leu-Val-Pro-Arg (SEQ ID NO: 190). Enlazadores adecuados adicionales que comprenden sitios de escisión de proteasa incluyen secuencias escindibles por las siguientes proteasas: una proteasa PreScission™ (una proteína de fusión que comprende proteasa 3C del rinovirus humano y glutatión-S-transferasa), una trombina, catepsina B, proteasa del virus de Epstein-Barr, MMP- 3 (estromelisina), MMP-7 (matrilisina), MMP-9; MMP similar a termolisina, metaloproteinasa de matriz 2 (MMP-2), catepsina L; catepsina D, metaloproteinasa de matriz 1 (MMP-1), activador del plasminógeno tipo urocinasa, metaloproteinasa de matriz tipo 1 de membrana (MT-MMP), estromelisina 3 (o MMP-11), termolisina, colagenasa de fibroblastos y estromelisina-1, metaloproteinasa de matriz 13 (colagenasa-3), activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA), antígeno prostático específico humano, calicreína (hK3), elastasa de neutrófilos y calpaína (proteasa neutra activada por calcio). Se pueden usar proteasas que no son nativas de la célula hospedadora en la que se expresa el receptor (por ejemplo, TEV) como mecanismo regulador adicional, en el que la activación del receptor se reduce hasta que la proteasa se expresa o se proporciona de otro modo. Además, una proteasa puede estar asociada a un tumor o a una enfermedad (expresada en un grado significativamente mayor que en el tejido normal) y servir como un mecanismo regulador independiente. Por ejemplo, algunas metaloproteasas de matriz se expresan altamente en determinados tipos de cáncer.

[00350] En algunas modalidades, la(s) sustituciones de aminoácidos dentro del TMD incluyen una o más sustituciones dentro de un motivo «GV» del TMD. En algunas modalidades, al menos una de dichas sustituciones comprende una sustitución de alanina. Se describen secuencias y sustituciones adicionales en el documento WO2021061872, incorporado en la

presente mediante referencia en su totalidad.

Dominio intracelular

[00351] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende uno o más dominios intracelulares de o derivados de un regulador transcripcional y/o un dominio de unión al ADN. En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio HNF1a/p65 o un dominio Gal4/VP64. En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende la secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 23.

[00352] Los reguladores transcripcionales activan o reprimen la transcripción de promotores afines. Los activadores transcripcionales normalmente se unen cerca de los promotores transcripcionales y reclutan ARN polimerasa para iniciar directamente la transcripción. Los represores transcripcionales se unen a los promotores transcripcionales y obstaculizan estéricamente el inicio de la transcripción mediante la ARN polimerasa. Otros reguladores transcripcionales actúan como activadores o represores dependiendo de dónde se une y de las condiciones celulares. Por consiguiente, como se usa en la presente, un «dominio de activación transcripcional» se refiere al dominio de un factor de transcripción que interactúa con elementos de control transcripcional y/o proteínas reguladoras transcripcionales (es decir, factores de transcripción, ARN polimerasas, etc.) para aumentar y/o activar la transcripción de uno o más genes. Los ejemplos no taxativos de dominios de activación transcripcional incluyen: un dominio de activación de VP16 del virus del herpes simple, VP64 (que es un derivado tetramérico de VP16), TAT de VIH, un dominio de activación de p65 de NFkB, dominios de activación de p53 1 y 2, un dominio de activación de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP), un dominio de activación de E2A, dominio de activación de NFAT (factor nuclear de células T activadas), levadura Gal4, levadura GCN4, levadura HAP1, dominio de activación de la transcripción del receptor de glucocorticoides MLL, RTG3, GLN3, OAF1, PIP2, PDR1, PDR3, PHO4, LEU3, proteína del homeodominio POU de células B Oct2, Ap2 de planta o cualquier otro conocido por un experto en la técnica. En algunas modalidades, el regulador transcripcional se selecciona entre Gal4-VP16, Gal4-VP64, tetR-VP64, ZFHD1-YP64, Gal4-KRAB y HAP1-VP16. En algunas modalidades, el regulador transcripcional es Gal4-VP64. Un dominio de activación transcripcional puede comprender una secuencia de tipo silvestre o de origen natural, o puede ser una versión modificada, mutante o derivada del dominio de activación transcripcional original que tiene la capacidad

deseada de aumentar y/o activar la transcripción de uno o más genes. En algunas modalidades, el regulador transcripcional puede incluir además una señal de localización nuclear.

[00353] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende uno o más «dominios de unión al ADN» intracelulares (o «dominios DB»). Dichos «dominios de unión al ADN» se refieren a dominios de unión al ADN específicos de secuencia que se unen a un elemento de secuencia de ADN particular. Por consiguiente, como se usa en la presente, un «dominio de unión al ADN específico de secuencia» se refiere a una porción de dominio proteico que tiene la capacidad de unirse selectivamente al ADN que tiene una secuencia predeterminada específica. Un dominio de unión al ADN específico de secuencia puede comprender una secuencia de tipo silvestre o de origen natural, o puede ser una versión modificada, mutante o derivada del dominio original que tiene la capacidad deseada de unirse a una secuencia deseada. En algunas modalidades, el dominio de unión al ADN específico de secuencia está diseñado para unirse a una secuencia deseada. Los ejemplos no taxativos de proteínas que tienen dominios de unión al ADN específicos de secuencia que se pueden usar en las proteínas sintéticas descritas en la presente incluyen HNF1a, Gal4, GCN4, receptor de tetraciclina inverso, THY1, SYN1, NSE/RU5', AGRP, CALB2, CAMK2A, CCK, CHAT, DLX6A, EMX1, proteínas con dedos de zinc o dominios de estas, proteínas CRISPR/Cas, tales como Cas9, Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (o CasD), Cash, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1 (o CasA), Cse2 (o CasB), Cse3 (o CasE), Cse4 (o CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csz1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, y Cu196 y TALES.

[00354] En aquellas modalidades en las que se usa una proteína similar a CRISPR/Cas, la proteína similar a CRISPR/Cas puede ser una proteína CRISPR/Cas de tipo silvestre, una proteína CRISPR/Cas modificada o un fragmento de una proteína CRISPR/Cas de tipo silvestre o modificada. La proteína similar a CRISPR/Cas se puede modificar para aumentar la afinidad y/o especificidad de unión al ácido nucleico, alterar una actividad enzimática y/o cambiar otra propiedad de la proteína. Por ejemplo, los dominios de nucleasa (es decir, DNasa, RNasa) de la proteína similar a CRISPR/Cas pueden modificarse, eliminarse o inactivarse. Alternativamente, la proteína similar a CRISPR/Cas se puede truncar para

eliminar dominios que no son esenciales para las funciones de los sistemas descritos en la presente. Por ejemplo, una enzima CRISPR que se usa como proteína de unión al ADN o un dominio de esta puede mutarse con respecto a una enzima de tipo silvestre correspondiente de manera que el CRISPR mutado o su dominio carezca de la capacidad de escindir una secuencia de ácido nucleico que contiene un sitio diana del dominio de unión al ADN. Por ejemplo, una mutación D10A se puede combinar con una o más de las mutaciones H840A, N854A o N863A para producir una enzima Cas9 que carece sustancialmente de toda actividad de escisión del ADN.

Dominio yuxtamembrana

[00355] El ECD y el TMD, o el TMD y el ICD, pueden unirse entre sí con un polipéptido de enlace, tal como un dominio yuxtamembrana. «SynNotch» o receptores notch sintéticos comprenden un dominio de unión al ligando extracelular heterólogo, un polipéptido de enlace que tiene una identidad de secuencia sustancial con un receptor Notch JMD (que incluye el NRR), un TMD y un ICD. Los receptores «Fn Notch» comprenden un dominio de unión al ligando extracelular heterólogo, un polipéptido de enlace que tiene una identidad de secuencia sustancial con un receptor Robo (tal como un Robol, Robo2, Robo3 o Robo4 de mamífero), seguido de 1, 2 o 3 repeticiones de fibronectina («Fn»), un TMD y un ICD. Los receptores «Mini Notch» comprenden un dominio de unión al ligando extracelular heterólogo, un polipéptido de enlace que tiene una identidad de secuencia sustancial con un receptor Notch JMD pero que carece del NRR (los módulos de repetición LIN-12-Notch (LNR) y el dominio de heterodimerización), un TMD y un ICD. Los receptores «Notch de enlazador mínimo» comprenden un dominio de unión al ligando extracelular heterólogo, un polipéptido de enlace que carece de identidad de secuencia sustancial con un receptor Notch (por ejemplo, de modo no taxativo, que tiene una secuencia polipeptídica sintética $(GGS)_n$), un TMD y un ICD. Los receptores «Notch bisagra» comprenden un dominio de unión al ligando extracelular heterólogo, una secuencia bisagra que comprende un dominio de oligomerización (es decir, un dominio que promueve la dimerización, trimerización o multimerización de orden superior con un receptor sintético y/o un receptor hospedador existente), un TMD y un ICD.

[00356] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende un péptido del dominio yuxtamembrana (JMD) entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana. En algunas modalidades, el receptor cebador comprende un péptido del dominio yuxtamembrana (JMD)

entre el dominio transmembrana y el dominio intracelular. En algunas modalidades, el péptido JMD comprende un motivo LWF. El uso de motivos LWF en construcciones de receptores se describe en la patente estadounidense N.º 10,858,443, incorporada a la presente mediante referencia en su totalidad. En algunas modalidades, el péptido JMD tiene una identidad de secuencia sustancial con el JMD de Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4. En algunas modalidades, el péptido JMD tiene una identidad de secuencia sustancial con el JMD Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4, pero no incluye una repetición LIN-12-Notch (LNR) y/o un dominio de heterodimerización (HD) de un receptor Notch. En algunas modalidades, el péptido JMD no tiene una identidad de secuencia sustancial con el JMD de Notch1, Notch2, Notch3 y/o Notch4. En algunas modalidades, el péptido JMD incluye un dominio de oligomerización que promueve la formación de dímeros, trímeros o conjuntos de orden superior del receptor. Dichos péptidos JMD se describen en el documento WO2021061872, que se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad.

[00357] En el receptor Mini Notch, el polipéptido de enlace deriva de una secuencia Notch JMD después de la eliminación del dominio NRR y HD. La secuencia Notch JMD puede ser la secuencia de Notch1, Notch2, Notch3 o Notch4, y puede derivarse de un homólogo no humano, tal como los de Drosophila, Gallus, Danio y similares. Se pueden usar de cuatro a 50 residuos de aminoácidos de la secuencia de Notch restante como enlazador polipeptídico. En algunas modalidades, la longitud y la composición de aminoácidos de la secuencia del polipéptido enlazador se varían para modificar la orientación y/o proximidad del ECD y el TMD entre sí para lograr una actividad deseada del polipéptido quimérico, tal como el nivel de transducción de señales cuando es inducido por ligando o en ausencia de ligando.

[00358] En el receptor Notch enlazador mínimo, el polipéptido de enlace no tiene una identidad de secuencia sustancial con una secuencia Notch JMD, incluida la secuencia Notch JMD de Notch1, Notch2, Notch3 o Notch4, o un homólogo no humano de esta. Se pueden utilizar de cuatro a 50 residuos de aminoácidos como enlazador polipeptídico. En algunas modalidades, la longitud y la composición de aminoácidos de la secuencia del polipéptido enlazador se varían para modificar la orientación y/o proximidad del ECD y el TMD entre sí para lograr una actividad deseada del polipéptido quimérico de la divulgación. La secuencia del enlazador mínimo puede diseñarse para incluir u omitir un sitio de escisión de proteasa, y puede incluir u omitir un sitio o sitios de glicosilación para otros tipos de modificación

postraduccional. En algunas modalidades, el enlazador mínimo no comprende un sitio de escisión de proteasa o un sitio de glisosilación.

[00359] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende además una bisagra. Los enlazadores bisagra que pueden usarse en el receptor cebador pueden incluir un dominio de oligomerización (por ejemplo, un dominio bisagra) que contiene uno o más motivos polipeptídicos que promueven la formación de oligómeros de los polipéptidos quiméricos mediante enlaces disulfuro intermoleculares. En estos casos, dentro de los receptores quiméricos descritos en la presente, el dominio bisagra generalmente incluye una región conectora de polipéptido flexible dispuesta entre el ECD y el TMD. Por lo tanto, el dominio bisagra proporciona flexibilidad entre el ECD y el TMD y también proporciona sitios para el enlace disulfuro intermolecular entre dos o más monómeros polipeptídicos quiméricos para formar un complejo oligomérico. En algunas modalidades, el dominio bisagra incluye motivos que promueven la formación de dímeros de los polipéptidos quiméricos descritos en la presente. En algunas modalidades, el dominio bisagra incluye motivos que promueven la formación de trímeros de los polipéptidos quiméricos descritos en la presente (por ejemplo, un dominio bisagra derivado de OX40). Las secuencias de polipéptidos bisagra adecuadas para las composiciones y métodos de la divulgación pueden ser secuencias de polipéptidos bisagra de origen natural (por ejemplo, aquellas de inmunoglobulinas de origen natural) o pueden diseñarse o modificarse para proporcionar propiedades deseadas y/o mejoradas, por ejemplo, modular la transcripción. Las secuencias de polipéptidos bisagra adecuadas incluyen, entre otras, aquellas derivadas de subclases de IgA, IgD e IgG, tales como el dominio bisagra de IgGl, el dominio bisagra de IgG2, el dominio bisagra de IgG3 y el dominio bisagra de IgG4, o una variante funcional de estos. En algunas modalidades, la secuencia del polipéptido bisagra contiene uno o más motivos CXXC. En algunas modalidades, la secuencia del polipéptido bisagra contiene uno o más motivos CPPC (SEQ ID NO: 191).

[00360] Las secuencias de polipéptidos bisagra también pueden derivarse de un dominio bisagra CD8α, un dominio bisagra CD28, un dominio bisagra CD152, un dominio bisagra PD-1, un dominio bisagra CTLA4, un dominio bisagra OX40 y variantes funcionales de estos. En algunas modalidades, el dominio bisagra incluye una secuencia de polipéptido bisagra derivada de un dominio bisagra CD8 α o una variante funcional de este. En algunas modalidades, el dominio bisagra incluye una secuencia de polipéptido bisagra derivada de un

dominio bisagra CD28 o una variante funcional de este. En algunas modalidades, el dominio bisagra incluye una secuencia de polipéptido bisagra derivada de un dominio bisagra OX40 o una variante funcional de este. En algunas modalidades, el dominio bisagra incluye una secuencia de polipéptido bisagra derivada de un dominio bisagra IgG4 o una variante funcional de este.

[00361] El polipéptido de unión Fn Notch se deriva de Robol JMD, que contiene un dominio de repetición de fibronectina (Fn), con una secuencia polipeptídica corta entre las repeticiones de Fn y el TMD. El polipéptido de unión Fn Notch no contiene una región reguladora negativa de Notch (NRR) ni el dominio Notch HD. El polipéptido de unión Fn puede contener 1, 2, 3, 4 o 5 repeticiones de Fn. En algunas modalidades, el receptor quimérico comprende un polipéptido de unión a Fn que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 repeticiones de Fn, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 repeticiones de Fn o de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 repeticiones de Fn. La secuencia polipeptídica corta entre las repeticiones Fn y el TMD puede tener de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos. En algunas modalidades, la secuencia polipeptídica corta puede tener entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 aminoácidos, de cualquier secuencia. En algunas modalidades, la secuencia polipeptídica corta puede tener entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 aminoácidos de origen natural, de cualquier secuencia. En algunas modalidades, la secuencia polipeptídica corta puede tener entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 aminoácidos, de cualquier secuencia pero que no tiene más de una prolina. En algunas modalidades, la secuencia polipeptídica corta puede tener entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 aminoácidos, y aproximadamente el 50 % o más de los aminoácidos son glicina. En algunas modalidades, la secuencia polipeptídica corta puede tener entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 aminoácidos, donde los aminoácidos se seleccionan entre glicina, serina, treonina y alanina. En algunas modalidades, la longitud y la composición de aminoácidos de la secuencia del polipéptido enlazador de Fn se varían para modificar la orientación y/o proximidad del ECD y el TMD entre sí para lograr una actividad deseada del polipéptido quimérico de la divulgación.

Secuencia de terminación de transferencia

[00362] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende además una secuencia de terminación de transferencia (STS) entre el dominio transmembrana y los dominios

intracelulares. El STS comprende una secuencia lipofóbica cargada. Sin limitarse a ninguna teoría, el STS sirve como anclaje a la membrana y se cree que evita el paso del dominio intracelular a la membrana plasmática. El uso de dominios STS en los receptores cebadores se describe en el documento WO2021061872, incorporado en la presente mediante referencia en su totalidad. Las secuencias STS ilustrativas no taxativas incluyen secuencias STS APLP1, APLP2, APP, TGBR3, CSF1R, CXCL16, CX3CL1, DAG1, DCC, DNER, DSG2, CDH1, GHR, HLA-A, IFNAR2, IGF1R, IL1R1, ERN2, KCNE1, KCNE2, CHL1, LRPl, LRP2, LRP18, PTPRF, SCN1B, SCN3B, NPR3, NGFR, PLXDC2, PAM, AGER, ROBOl, SORCS3, SORCS1, SORL1, SDC1, SDC2, SPN, TYR, TYRP1, DCT, VASN, FLT1, CDH5, PKTFD1, NECTINl, KL, IL6R, EFNB1, CD44, CLSTN1, LRP8, PCDHGC3, NRG1, LRP1B, JAG2, EFNB2, DLL1, CLSTN2, EPCAM, ErbB4, KCNE3, CDH2, NRG2, PTPRK, BTC, EPHA4, IL1R2, KCNE4, SCN2B, Nradd, PTPRM, Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4. En algunas modalidades, el STS es heterólogo con respecto al dominio transmembrana. En algunas modalidades, el STS es homólogo con respecto al dominio transmembrana. Las secuencias STS se describen en el documento WO2021061872, que se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

[00363] En algunas modalidades, la secuencia de terminación de transferencia comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 20.

Anticuerpos ALPG/P y fragmentos de unión al antígeno

[00364] En algunos aspectos, en la presente se proporcionan anticuerpos de fosfatasa alcalina, de células placentarias/germinales (ALPG/P) o fragmentos de unión al antígeno. En algunas modalidades, el resto de unión al antígeno ALPG/P se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un nanocuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo o un minicuerpo, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fab, un fragmento variable de cadena simple (scFv), y un anticuerpo de dominio simple (sdAb), o un fragmento funcional de este. En algunas modalidades, el resto de unión al antígeno comprende un scFv. El resto de unión al antígeno puede incluir secuencias de aminoácidos naturales o puede diseñarse o modificarse para proporcionar propiedades deseadas y/o mejoradas, por ejemplo, mayor afinidad de unión.

[00365] En un aspecto, se proporcionan en la presente anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen a la fosfatasa alcalina de células placentarias/germinales (ALPG/P), que comprenden una secuencia de cadena pesada

variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 1, 173, 174, 175 o 176, CDR-H2 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 2, 177, 178, 179 o 180, y CDR-H3 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 3, 181 o 182, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR -L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde: CDR-L1 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 4, 183 o 184, CDR-L2 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 5, 185 o 186, y CDR-L3 comprende una secuencia como se establece en las SEQ ID NO: 6 o 187.

[00366] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3. En algunas modalidades, la secuencia de cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, la secuencia de cadena VL comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.

[00367] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o el fragmento de unión al antígeno CDR-H3 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 3, 181 o 182; la CDR-H2 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 2, 177, 178, 179 o 180; la CDR-H1 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 1, 173, 174, 175 o 176. En algunas modalidades, la CDR-H3 es una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 3, 181 o 182, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; la CDR-H2 es una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 2, 177, 178, 179 o 180, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; y la CDR-H1 es una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 1, 173, 174, 175 o 176, con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos.

[00368] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o el fragmento de unión al antígeno CDR-L3 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-L3 de la SEQ ID NO: 6 o 187; la CDR-L2 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-L2 de

la SEQ ID NO: 5, 185 o 186; la CDR-L1 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-L1 de la SEQ ID NO: 4, 183 o 184. En algunas modalidades, la CDR-L3 es una CDR-L3 de la SEQ ID NO: 6 o 187, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; la CDR-L2 es una CDR-L2 de la SEQ ID NO: 5, 185 o 186, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; y la CDR-L1 es una CDR-L1 de la SEQ ID NO: 4, 183 o 184, con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos.

[00369] En algunas modalidades, un anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende de una a tres CDR de un dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende de dos a tres CDR de un dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende tres CDR de un dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, un anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende de una a tres CDR de un dominio VL como se establece en la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende de dos a tres CDR de un dominio VL como se establece en la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende tres CDR de un dominio VL como se establece en la SEQ ID NO: 8. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Kabat. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Chothia. En algunos aspectos, las CDR son CDR de AbM. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Contact. En algunos aspectos, las CDR son CDR de IMGT.

[00370] En algunas modalidades, un anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con una secuencia VH establecida en la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende una secuencia VH proporcionada en la SEQ ID NO: 7, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 sustituciones de aminoácidos. En algunas modalidades, un anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende una secuencia VL que tiene al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con una secuencia VL establecida en la SEQ ID NO: 8. En algunas

modalidades, un dominio de unión al antígeno ALPG/P proporcionado en la presente comprende una secuencia VL proporcionada en la SEQ ID NO: 8, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, se hace referencia en la presente a los dominios de unión al antígeno descritos en este párrafo como «variantes». En algunas modalidades, dichas variantes derivan de una secuencia proporcionada en la presente, por ejemplo, mediante maduración por afinidad, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o cualquier otro método conocido en la técnica o descrito en la presente. En algunas modalidades, dichas variantes no derivan de una secuencia proporcionada en la presente y pueden, por ejemplo, aislarse *de novo* de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente para obtener anticuerpos o dominios de unión al antígeno.

[00371] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos un 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos un 85 % (tal como, por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o el fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos un 90 % (tal como, por ejemplo, 90 %, 95 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que se encuentra el conjunto completo de CDR 1, 2 y 3 de VH (combinadas) tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 7.

[00372] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) en la que el conjunto completo de CDR VL 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos un 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %,

95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) en la que el conjunto completo de CDR VL 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos un 85 % (tal como, por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o el fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) en la que el conjunto completo de CDR VL 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos un 90 % (tal como, por ejemplo, 90 %, 95 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) en la que se encuentra el conjunto completo de CDR 1, 2 y 3 de VL (combinadas) tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 8.

[00373] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos un 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) en la que el conjunto completo de CDR VL 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 8.

[00374] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

(i) una región determinante de complementariedad de VH uno (CDR1) que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:1, 173, 174, 175 o 176;

(ii) una CDR2 de VH que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:2, 177, 178, 179 o 180;

(iii) una CDR3 de VH que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por

ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:3, 181 o 182;

(iv) una CDR1 de VL que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:4, 183 o 184;

(v) una CDR2 de VL que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:5, 185 o 186;

y

(vi) una CDR3 de VL que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:6 o 187.

[00375] En algunas modalidades, cada modificación de aminoácido, si la hay, es una sustitución de aminoácido conservadora. En algunas modalidades, cada modificación de aminoácido, si la hay, es una sustitución de aminoácido conservadora enumerada en la Tabla A1.

[00376] En algunas modalidades, la CDR1 de VH comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 1, 173, 174, 175 o 176. En algunas modalidades, la CDR2 de VH que comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:2, 177, 178, 179 o 180. En algunas modalidades, la CDR3 de VH comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 3, 181 o 182. En algunas modalidades, la CDR1 de VL comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 4, 183 o 184. En algunas modalidades, la CDR2 de VL comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 5, 185 o 186. En algunas modalidades, la CDR3 de VL comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 6 o 187. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una sustitución de aminoácido. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una sustitución de aminoácido conservadora. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una eliminación de aminoácido. En algunas modalidades, como máximo una

modificación de aminoácido es una adición de aminoácido.

[00377] En algunas modalidades, la CDR1 de VH comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, la CDR2 de VH comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, la CDR3 de VH comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 3.

[00378] En algunas modalidades, la CDR1 de VL comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, la CDR2 de VL comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, la CDR3 de VL comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 6.

[00379] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

(i) una región determinante de complementariedad de VH uno (CDR1) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 1;

(ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 2;

(iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 3;

(iv) una región determinante de complementariedad de VL uno (CDR1) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 4;

(v) una CDR2 de VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 5; y

(ivi) una CDR3 de VL que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 6.

[00380] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH que comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL que comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente.

[00381] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 8.

[00382] En algunas modalidades, las secuencias de CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de

VH están presentes en una estructura de VH humana.

[00383] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos el 80% (tal como, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, al menos 85%, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 85 % (tal como, por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos un 90 % (tal como, por ejemplo, 90 %, 95 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o el fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.

[00384] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos el 80% (tal como, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, al menos 85%, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 85 % (tal como, por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos un 90 % (tal como, por ejemplo, 90 %, 95 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o el fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8.

[00385] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos el 80% (tal como, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, al menos 85%, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al

menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8

[00386] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende la región variable de cadena pesada (VH) de la SEQ ID NO: 7. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno comprende la región variable de cadena ligera (VL) de la SEQ ID NO: 8.

[00387] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a ALPG/P humano.

[00388] En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno se une a ALPG/P humano con una K_D de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno se une a ALPG/P humano con una K_D de ≤ 5 x 10^{-7} M. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno se une a ALPG/P humano con una K_D de ≤ 1 x 10^{-7} M. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno se une a ALPG/P humano con una K_D de ≤ 5 x 10^{-8} M. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno se une a ALPG/P humano con una K_D de ≤ 2 x 10^{-8} M. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno se une a ALPG/P humano con una K_D de ≤ 1 x 10^{-8} M. En algunas modalidades, el anticuerpo ALPG/P o fragmento de unión al antígeno se une a ALPG/P humano con una K_D de ≤ 1 x 10^{-9} M.

Receptores quiméricos

[00389] En un aspecto, se proporcionan en la presente receptores quiméricos que se unen a mesotelina (MSLN), que comprenden una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 14, 202, 203, 204 o 205, CDR-H2 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 15, 206, 207, 208 o 209, y CDR -H3 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 16, 210 o 211.

[00390] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. En algunas modalidades, la secuencia de cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, la secuencia de cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

[00391] En algunas modalidades, el receptor quimérico de MSLN CDR-H3 tiene al menos

aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H3 de SEQ ID NO: 16, 210 o 211; la CDR-H2 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H2 de SEQ ID NO: 15, 206, 207, 208 o 209; la CDR-H1 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H1 de SEQ ID NO: 14, 202, 203, 204 o 205. En algunas modalidades, la CDR-H3 es una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 16, 210 o 211, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; la CDR-H2 es una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 15, 206, 207, 208 o 209, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; y la CDR-H1 es una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 14, 202, 203, 204 o 205, con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos.

[00392] En algunas modalidades, un receptor quimérico MSLN proporcionado en la presente comprende de una a tres CDR de un dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, un receptor quimérico MSLN proporcionado en la presente comprende de dos a tres CDR de un dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, un receptor quimérico MSLN proporcionado en la presente comprende tres CDR de un dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Kabat. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Chothia. En algunos aspectos, las CDR son CDR de AbM. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Contact. En algunos aspectos, las CDR son CDR de IMGT.

[00393] En algunas modalidades, un receptor quimérico MSLN proporcionado en la presente comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con una secuencia VH establecida en la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, un receptor quimérico MSLN proporcionado en la presente comprende una secuencia VH proporcionada en la SEQ ID NO: 17, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, se hace referencia en la presente a los dominios de unión al antígeno descritos en este párrafo como «variantes». En algunas modalidades, dichas variantes derivan de una secuencia proporcionada en la presente, por ejemplo, mediante maduración por afinidad, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o cualquier otro método conocido en la técnica o descrito en la presente. En algunas

modalidades, dichas variantes no derivan de una secuencia proporcionada en la presente y pueden, por ejemplo, aislarse *de novo* de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente para obtener anticuerpos o dominios de unión al antígeno.

[00394] En algunos aspectos, se proporcionan en la presente receptores quiméricos que se unen a mesotelina (MSLN), que comprenden una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 10, CDR-H2 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 11, y CDR-H3 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 12.

[00395] En algunos aspectos, el receptor quimérico MSLN comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. En algunas modalidades, la secuencia de cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[00396] En algunas modalidades, el receptor quimérico de MSLN CDR-H3 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H3 de SEQ ID NO: 12, 200 o 201; la CDR-H2 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H2 de SEQ ID NO: 11, 196, 197, 198 o 199; la CDR-H1 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H1 de SEQ ID NO: 10, 192, 193, 194 o 195. En algunas modalidades, la CDR-H3 es una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 12, 200 o 201, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; la CDR-H2 es una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 11, 196, 197, 198 o 199, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; y la CDR-H1 es una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 10, 192, 193, 194 o 195, con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos.

[00397] En algunas modalidades, un receptor quimérico MSLN proporcionado en la presente comprende de una a tres CDR de un dominio VHH como se establece en la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, un receptor quimérico MSLN proporcionado en la presente comprende de dos a tres CDR de un dominio VHH como se establece en la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende tres CDR de un dominio VHH como se establece en la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Kabat. En algunos aspectos, las CDR son CDR de

Chothia. En algunos aspectos, las CDR son CDR de AbM. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Contact. En algunos aspectos, las CDR son CDR de IMGT.

[00398] En algunas modalidades, un receptor quimérico MSLN proporcionado en la presente comprende una secuencia VHH que tiene al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con una secuencia VHH establecida en la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende una secuencia VHH proporcionada en la SEQ ID NO: 13, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, se hace referencia en la presente a los dominios de unión al antígeno descritos en este párrafo como «variantes». En algunas modalidades, dichas variantes derivan de una secuencia proporcionada en la presente, por ejemplo, mediante maduración por afinidad, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o cualquier otro método conocido en la técnica o descrito en la presente. En algunas modalidades, dichas variantes no derivan de una secuencia proporcionada en la presente y pueden, por ejemplo, aislarse *de novo* de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente para obtener anticuerpos o dominios de unión al antígeno.

[00399] En algunas modalidades, un receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR de VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de una de las SEQ ID NO: 13 o 17. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR de VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 85 % (tal como, por ejemplo, 85%, 90%, 95%, al menos 90%, al menos 95%) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de una de las SEQ ID NO: 13 o 17. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR de VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 90 % (tal como, por ejemplo, 90%, 95%, al menos 95%) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de una de las SEQ ID NO: 13 o 17. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR de VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 95

% de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de una de las SEQ ID NO: 13 o 17.

[00400] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR de VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR de VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 17.

[00401] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

(i) una región determinante de complementariedad de VH uno (CDR1) que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:10, 192, 193, 194 o 195;

(ii) una CDR2 de VH que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:11, 196, 197, 198 o 199; y

(iii) una CDR3 de VH que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:12, 200 o 201.

[00402] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

(i) una región determinante de complementariedad de VH uno (CDR1) que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:14, 202, 203, 204 o 205;

(ii) una CDR2 de VH que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:15, 206, 207, 208 o 209; y

(iii) una CDR3 de VH que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:16, 210

o 211.

[00403] En algunas modalidades, cada modificación de aminoácido, si la hay, es una sustitución de aminoácido conservadora. En algunas modalidades, cada modificación de aminoácido, si la hay, es una sustitución de aminoácido conservadora enumerada en la Tabla A1.

[00404] En algunas modalidades, la CDR1 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 10, 192, 193, 194 o 195. En algunas modalidades, la CDR2 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:11, 196, 197, 198 o 199. En algunas modalidades, la CDR3 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:12, 200 o 201. En algunas modalidades, la CDR1 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:14, 202, 203, 204 o 205. En algunas modalidades, la CDR2 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:15, 206, 207, 208 o 209. En algunas modalidades, la CDR3 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:16, 210 o 211. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una sustitución de aminoácido. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una sustitución de aminoácido conservadora. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una eliminación de aminoácido. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una adición de aminoácido.

[00405] En algunas modalidades, la CDR1 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO:10. En algunas modalidades, la CDR2 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO:11. En algunas modalidades, la CDR3 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO:12.

[00406] En algunas modalidades, la CDR1 de VH del receptor quimérico de MSLN

comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO:14. En algunas modalidades, la CDR2 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO:15. En algunas modalidades, la CDR3 de VH del receptor quimérico de MSLN comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO:16.

[00407] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

(i) una región determinante de complementariedad de VH uno (CDR1) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 10;

(ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 11; y

(iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 12.

[00408] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

(i) una región determinante de complementariedad de VH uno (CDR1) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 14;

(ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 15; y

(iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 16.

[00409] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 14, 15 y 16, respectivamente.

[00410] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de una de las SEQ ID NO: 13 o 17. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 17.

[00411] En algunas modalidades, las secuencias de CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH están presentes en una estructura de VH humana.

[00412] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95%) de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 13 o 17. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 85 % (tal como, por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 90 %, al menos 95%) de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 13 o 17. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90 % (tal como, por ejemplo, 90 %, 95 %, al menos 95%) de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 13 o 17. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 13 o 17.

[00413] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95%) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95%) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17.

[00414] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende la región variable de cadena pesada (VH) de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN comprende la región variable de cadena pesada (VH) de la SEQ ID NO: 17.

[00415] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN se une específicamente a MSLN humano.

[00416] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN se une a MSLN humano con una K_D de aproximadamente10^{-9} M a aproximadamente10^{-6} M. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN a MSLN humano con una K_D de ≤ 5 x 10^{-7} M. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN se une a MSLN humano con una K_D de ≤ 1 x 10^{-7} M. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN se une a MSLN humano con una K_D de ≤ 5 x 10^{-8} M. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN se une a MSLN humano con una K_D de ≤ 2 x 10^{-8} M. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN se

une a MSLN humano con una K_D de ≤ 1 x 10^{-8} M. En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN se une a MSLN humano con una K_D de ≤ 1 x 10^{-9} M.

[00417] En algunas modalidades, el receptor quimérico MSLN es un receptor de antígeno quimérico o un receptor cebador.

Receptores de antígenos quiméricos

[00418] En otro aspecto, se proporcionan en la presente receptores de antígenos quiméricos que comprenden un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN; NCBI Entrez Gene: 10232; UniProtKB/Swiss-Prot: Q13421). El CAR recombinante puede ser un CAR humano, que comprende secuencias completamente humanas, por ejemplo, secuencias humanas naturales.

[00419] En algunas modalidades, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno. El dominio de reconocimiento de antígeno de un receptor tal como un CAR puede unirse a uno o más componentes de señalización intracelular, tales como componentes de señalización que imitan la activación a través de un complejo de receptor de antígeno, tal como un complejo TCR, en el caso de un CAR, y/o señal a través de otro receptor de la superficie celular. Por tanto, en algunas modalidades, el componente de unión extracelular (por ejemplo, dominio de unión al ligando o de unión al antígeno) está unido a uno o más dominios de señalización transmembrana e intracelular. En algunas modalidades, el dominio transmembrana está fusionado con el dominio extracelular. En una modalidad, se usa un dominio transmembrana que está asociado naturalmente con uno de los dominios en el receptor, por ejemplo, CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana se selecciona o modifica mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de proteínas de membrana de superficie iguales o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

[00420] En algunos aspectos, el receptor de antígeno quimérico incluye una porción extracelular que comprende un dominio de unión al antígeno descrito en la presente y un dominio de señalización intracelular. En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento incluye un scFv, un VH o un anticuerpo VH de dominio simple y el dominio intracelular contiene un ITAM. En algunos aspectos, el dominio de señalización intracelular incluye un dominio de señalización de una cadena zeta de una cadena CD3-zeta (CD3). En algunas

modalidades, el receptor de antígeno quimérico incluye un dominio transmembrana que une el dominio extracelular y el dominio de señalización intracelular.

[00421] En algunos aspectos, el dominio transmembrana contiene una porción transmembrana de CD8a o CD28. El dominio extracelular y el transmembrana pueden estar unidos directa o indirectamente. En algunas modalidades, el dominio extracelular y el transmembrana están unidos mediante un espaciador, como cualquiera de los descritos en la presente. En algunas modalidades, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de células T, tal como entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización intracelular. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de células T es CD28 o 41BB.

CDR del receptor de antígeno quimérico, dominios VH, VL

[00422] En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno extracelular del receptor de antígeno quimérico comprende un anticuerpo MSLN o un fragmento de unión al antígeno de este.

[00423] En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno extracelular del receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. En algunas modalidades, la secuencia de cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

[00424] En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno extracelular del receptor de antígeno quimérico CDR-H3 tiene al menos aproximadamente 50%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con una CDR-H3 de SEQ ID NO: 16; la CDR-H2 tiene al menos aproximadamente 50%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con una CDR-H2 de SEQ ID NO: 15; la CDR-H1 tiene al menos aproximadamente 50%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con una CDR-H1 de SEQ ID NO: 14. En algunas modalidades, la CDR-H3 es una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 16, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; la CDR-H2 es una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 15, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; y la CDR-H1 es una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 14, con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos.

[00425] En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno extracelular del receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente comprende de una a tres CDR de un

dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende de dos a tres CDR de un dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende tres CDR de un dominio VH como se establece en la SEQ ID NO: 17. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Kabat. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Chothia. En algunos aspectos, las CDR son CDR de AbM. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Contact. En algunos aspectos, las CDR son CDR de IMGT.

[00426] En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno extracelular del receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente comprende una secuencia VH que tiene al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con una secuencia VH establecida en la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende una secuencia VH proporcionada en la SEQ ID NO: 17, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, se hace referencia en la presente a los dominios de unión al antígeno descritos en este párrafo como «variantes». En algunas modalidades, dichas variantes derivan de una secuencia proporcionada en la presente, por ejemplo, mediante maduración por afinidad, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o cualquier otro método conocido en la técnica o descrito en la presente. En algunas modalidades, dichas variantes no derivan de una secuencia proporcionada en la presente y pueden, por ejemplo, aislarse *de novo* de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente para obtener anticuerpos o dominios de unión al antígeno.

[00427] En algunos aspectos, el dominio de unión al antígeno extracelular del receptor de antígeno quimérico comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) de anticuerpo simple que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. En algunas modalidades, la secuencia de cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[00428] En algunas modalidades, el dominio de unión al antígeno extracelular del receptor de antígeno quimérico CDR-H3 tiene al menos aproximadamente 50%, 75%, 80%, 85%, 90%

o 95% de identidad con una CDR-H3 de SEQ ID NO: 12; la CDR-H2 tiene al menos aproximadamente 50%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con una CDR-H2 de SEQ ID NO: 11; la CDR-H1 tiene al menos aproximadamente 50%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad con una CDR-H1 de SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, la CDR-H3 es una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 12, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; la CDR-H2 es una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 11, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; y la CDR-H1 es una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 10, con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos.

[00429] En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno extracelular del receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente comprende de una a tres CDR de un dominio VHH como se establece en la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende de dos a tres CDR de un dominio VHH como se establece en la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende tres CDR de un dominio VHH como se establece en la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Kabat. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Chothia. En algunos aspectos, las CDR son CDR de AbM. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Contact. En algunos aspectos, las CDR son CDR de IMGT.

[00430] En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno extracelular del receptor de antígeno quimérico proporcionado en la presente comprende una secuencia VHH que tiene al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con una secuencia VHH establecida en la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende una secuencia VHH proporcionada en la SEQ ID NO: 13, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, se hace referencia en la presente a los dominios de unión al antígeno descritos en este párrafo como «variantes». En algunas modalidades, dichas variantes derivan de una secuencia proporcionada en la presente, por ejemplo, mediante maduración por afinidad, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o cualquier otro método conocido en la técnica o descrito en la presente. En algunas modalidades, dichas variantes no derivan de una

secuencia proporcionada en la presente y pueden, por ejemplo, aislarse *de novo* de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente para obtener anticuerpos o dominios de unión al antígeno.

[00431] La Tabla C proporciona secuencias CDR ilustrativas del dominio de unión al antígeno MSLN del VHH de SEQ ID NO: 13 y el VHH de SEQ ID NO: 17, de acuerdo con los esquemas de numeración indicados.

Tabla C

SEQ ID NO	Nombre	Esquema de numeración	Secuencia
10	CDR-H1	Chothia	GIDLSLY---
192		AbM	GIDLSLYRMR
193		Kabat	-----LYRMR
194		Contact	----SLYRMR
195		IMGT	GIDLSLYR--
11	CDR-H2	Chothia	-----TDDGT---------
196		AbM	---LITDDGTSY-------
197		Kabat	---LITDDGTSYYADSVKG
198		Contact	LVALITDDGTSY-------
199		IMGT	----ITDDGTS--------
12	CDR-H3	Chothia	--ETPLSPVNY
12		AbM	--ETPLSPVNY
12		Kabat	--ETPLSPVNY
200		Contact	NAETPLSPVN-
201		IMGT	NAETPLSPVNY
14	CDR-H1	Chothia	GGSISNSY---
202		AbM	GGSISNSYYWG
203		Kabat	-----NSYYWG
204		Contact	----SNSYYWG
205		IMGT	GGSISNSYY--
15	CDR-H2	Chothia	-----YHSGN---------
206		AbM	---SIYHSGNTY-------

207		Kabat	---SIYHSGNTYYNPSLKS
208		Contact	WIGSIYHSGNTY-------
209		IMGT	----IYHSGNT--------
16	CDR-H3	Chothia	--QDGVGATTTEEY
16		AbM	--QDGVGATTTEEY
16		Kabat	--QDGVGATTTEEY
210		Contact	VTQDGVGATTTEE-
211		IMGT	VTQDGVGATTTEEY

Dominio transmembrana CAR

[00432] El dominio transmembrana en algunas modalidades se deriva de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio en algunos aspectos deriva de cualquier proteína transmembrana o unida a la membrana. Las regiones transmembrana incluyen aquellas derivadas de (es decir, comprenden al menos la(s) región(es) transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137 y/o CD154. Alternativamente, el dominio transmembrana en algunas modalidades es sintético. En algunos aspectos, el dominio transmembrana sintético comprende residuos predominantemente hidrofóbicos tales como leucina y valina. En algunos aspectos, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. En algunas modalidades, el enlace se realiza mediante enlazadores, espaciadores y/o dominio(s) transmembrana.

[00433] En algunas modalidades, el dominio transmembrana del receptor, por ejemplo, el CAR, es un dominio transmembrana de CD28 humano o una variante de este, por ejemplo, un dominio transmembrana de 27 aminoácidos de un CD28 humano (N.º de registro: P10747.1).

[00434] En algunas modalidades, el CAR comprende un TMD CD8a. En algunas modalidades, el TMD de CD8a comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 27.

Bisagra CAR

[00435] En algunas modalidades, el CAR incluye además un espaciador, que puede ser o incluir al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina o variante o versión modificada de esta, tal como una región bisagra, por ejemplo, una bisagra CD8a, una región bisagra de IgG4, y/o una región CH1/CL y/o Fc. En algunas modalidades, la región o porción

constante es de una IgG humana, tal como IgG4 o IgG1. En algunos aspectos, la porción de la región constante sirve como región espaciadora entre el componente de reconocimiento de antígeno, por ejemplo, scFv, y el dominio transmembrana. El espaciador puede tener una longitud que proporcione una mayor capacidad de respuesta de la célula después de la unión al antígeno, en comparación con la ausencia del espaciador. En algunos ejemplos, el espaciador tiene una longitud de 12 aminoácidos o aproximadamente o no tiene más de 12 aminoácidos de longitud. Los espaciadores ilustrativos incluyen aquellos que tienen al menos aproximadamente 10 a 229 aminoácidos, aproximadamente 10 a 200 aminoácidos, aproximadamente 10 a 175 aminoácidos, aproximadamente 10 a 150 aminoácidos, aproximadamente 10 a 125 aminoácidos, aproximadamente 10 a 100 aminoácidos, aproximadamente 10 a 75 aminoácidos, aproximadamente 10 a 50 aminoácidos, aproximadamente 10 a 40 aminoácidos, aproximadamente 10 a 30 aminoácidos, aproximadamente 10 a 20 aminoácidos, o aproximadamente 10 a 15 aminoácidos, e incluyendo cualquier número entero entre los puntos finales de cualquiera de los intervalos enumerados. En algunas modalidades, una región espaciadora tiene aproximadamente 12 aminoácidos o menos, aproximadamente 119 aminoácidos o menos, o aproximadamente 229 aminoácidos o menos. Los espaciadores ilustrativos incluyen bisagra de CD8a, bisagra de IgG4 sola, bisagra de IgG4 unida a los dominios CH2 y CH3, o bisagra de IgG4 unida al dominio CH3. Los espaciadores ilustrativos incluyen, entre otros, los descritos en Hudecek et ál. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153 o número de publicación de solicitud de patente internacional WO2014031687. En algunas modalidades, la bisagra CAR comprende una bisagra CD8a. En algunas modalidades, la bisagra CD8a comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 26.

[00436] Entre los dominios de señalización intracelular se encuentran aquellos que imitan o se aproximan a una señal a través de un receptor de antígeno natural, una señal a través de dicho receptor en combinación con un receptor coestimulador y/o una señal a través de un receptor coestimulador solo. En algunas modalidades, un enlazador oligo o polipeptídico corto, por ejemplo, un enlazador de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, tal como uno que contiene glicinas y serinas, por ejemplo, doblete glicina-serina, está presente y forma un enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmática del receptor.

Dominio intracelular CAR

[00437] En algunas modalidades, tras la unión del CAR, el dominio citoplasmático o dominio de señalización intracelular del receptor activa al menos una de las funciones o respuestas efectoras normales de la célula inmunitaria, por ejemplo, células T diseñadas para expresar el receptor. Por ejemplo, en algunos contextos, el receptor induce una función de una célula T tal como actividad citolítica o actividad T colaboradora, tal como secreción de citocinas u otros factores. En algunas modalidades, se usa una porción truncada de un dominio de señalización intracelular de un componente receptor de antígeno o molécula coestimuladora en lugar de una cadena inmunoestimuladora intacta, por ejemplo, si transduce la señal de la función efectora. En algunas modalidades, el dominio o dominios de señalización intracelular incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de células T (TCR), y en algunos aspectos también aquellas de correceptores que en el contexto natural actúan junto con dicho receptor para iniciar la transducción de señales después del acoplamiento del receptor de antígeno, y/o cualquier derivado o variante de dichas moléculas, y/o cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

[00438] En algunos aspectos, el receptor incluye una secuencia de señalización citoplasmática primaria que regula la activación primaria del complejo TCR. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias incluyen aquellas derivadas de TCR o CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CDS, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En algunas modalidades, las moléculas de señalización citoplasmática en el CAR contienen un dominio de señalización citoplasmática, una porción de este, o una secuencia derivada de CD3 zeta.

[00439] En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización estimulador de CD3 zeta humano o una variante funcional de este, tal como un dominio citoplasmático de 112 AA de la isoforma 3 de CD3.zeta humano. (Nº de registro: P20963.2) o un dominio de señalización CD3 zeta como se describe en la patente estadounidense n.º 7,446,190 o la patente estadounidense n.º 8,911,993.

[00440] El receptor, por ejemplo, el CAR, puede incluir al menos uno o varios componentes de señalización intracelular. En algunas modalidades, el receptor incluye un componente

intracelular de un complejo de TCR, tal como una cadena CD3 de TCR que media la activación y citotoxicidad de las células T, por ejemplo, la cadena zeta de CD3. Por lo tanto, en algunos aspectos, el dominio extracelular está vinculado a uno o más módulos de señalización celular. En algunas modalidades, los módulos de señalización celular incluyen el dominio transmembrana de CD3, los dominios de señalización intracelular de CD3 y/u otros dominios transmembrana de CD. En algunas modalidades, el receptor, por ejemplo, CAR, incluye además una porción de una o más moléculas adicionales tales como receptor Fc gamma, CD8, CD4, CD25 o CD16. Por ejemplo, en algunos aspectos, el CAR incluye una molécula quimérica entre CD3-zeta o receptor Fc-gamma y CD8, CD4, CD25 o CD16. En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio de activación CD3-zeta que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 29.

[00441] En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio de señalización coestimulador intracelular de 41BB o variante funcional o porción de este, tal como un dominio citoplasmático de 42 aminoácidos de un 4-1BB humano (n.º de registro Q07011.1) o variante o porción funcional de este.

[00442] En algunas modalidades, el receptor abarca uno o más, por ejemplo, dos o más, dominios coestimuladores y un dominio de activación, por ejemplo, un dominio de activación primario, en la porción citoplasmática. Los receptores ilustrativos incluyen componentes intracelulares de CD3-zeta, CD28 y 4-1BB.En algunas modalidades, el receptor de antígeno quimérico contiene un dominio intracelular de una molécula coestimuladora de células T. En algunos aspectos, la molécula coestimuladora de células T es 4-1BB.

[00443] En algunas modalidades, el receptor incluye un dominio de señalización y/o una porción transmembrana de un receptor coestimulador, tal como CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 e ICOS. En algunos aspectos, el mismo receptor incluye tanto el componente activador como el coestimulador.

[00444] En determinadas modalidades, el dominio de señalización intracelular comprende un dominio transmembrana CD8a y un dominio de señalización unido a un dominio intracelular CD3 (por ejemplo, CD3-zeta). En algunas modalidades, el dominio de señalización intracelular comprende dominios coestimuladores 4-1BB (CD137, TNFRSF9), unidos a un dominio intracelular CD3 zeta. En algunas modalidades, el CAR comprende un dominio coestimulador 4-1BB. En algunas modalidades, el dominio coestimulador 4-1BB comprende la secuencia

como se establece en la SEQ ID NO: 28.

[00445] En algunas modalidades, el CAR comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 30, 31, 32 o 33. En algunas modalidades, el CAR comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 30.

[00446] En algunas modalidades, el CAR u otro receptor de antígeno incluye además un marcador, tal como un marcador de superficie celular, que puede usarse para confirmar la transducción o ingeniería de la célula para expresar el receptor, tal como una versión truncada de un receptor de superficie celular, como EGFR truncado (tEGFR). En algunos aspectos, el marcador incluye todo o parte (por ejemplo, forma truncada) de CD34, un receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR) o un receptor del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, tEGFR). En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica el marcador está unido operativamente a un polinucleótido que codifica una secuencia enlazadora, tal como una secuencia enlazadora escindible o una secuencia de salto ribosómico, por ejemplo, T2A. Ver WO2014031687. En algunas modalidades, la introducción de una construcción que codifica CAR y EGFRt separados por un interruptor de ribosoma T2A puede expresar dos proteínas de la misma construcción, de modo que EGFRt se puede usar como marcador para detectar células que expresan dicha construcción. En algunas modalidades, un marcador, y opcionalmente una secuencia enlazadora, puede ser cualquiera de los descritos en la solicitud de patente publicada nº WO2014031687. Por ejemplo, el marcador puede ser un EGFR truncado (tEGFR) que está, opcionalmente, unido a una secuencia enlazadora, tal como una secuencia de salto ribosómico T2A.

[00447] En algunas modalidades, el marcador es una molécula, por ejemplo, una proteína de la superficie celular, que no se encuentra de forma natural en las células T o que no se encuentra de forma natural en la superficie de las células T, o una porción de estas.

[00448] En algunas modalidades, la molécula es una molécula no propia, por ejemplo, una proteína no propia, es decir, una que no es reconocida como «propia» por el sistema inmunológico del hospedador al que las células serán transferidas adoptivamente.

[00449] En algunas modalidades, el marcador no cumple ninguna función terapéutica y/o no produce ningún efecto distinto del de usarse como marcador para ingeniería genética, por ejemplo, para seleccionar células diseñadas con éxito. En otras modalidades, el marcador puede ser una molécula terapéutica o una molécula que de otro modo ejerza algún efecto

deseado, tal como un ligando para una célula que se encontrará in vivo, tal como una molécula coestimuladora o de punto de control inmunológico para mejorar y/o amortiguar las respuestas de las células tras la transferencia adoptiva y el encuentro con el ligando.

[00450] El CAR puede comprender uno o más aminoácidos sintéticos modificados en lugar de uno o más aminoácidos naturales. Los aminoácidos modificados ilustrativos incluyen, entre otros, ácido aminociclohexanocarboxílico, norleucina, ácido α-amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometilcisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, (3-fenilserina (3-hidroxifenilalanina, fenilglicina, α-naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida del ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α-aminociclopentanocarboxílico, ácido α-aminociclohexanocarboxílico, ácido α-aminocicloheptanocarboxílico, ácido α-(2-amino-2-norbomano)-carboxílico, ácido α,γ-diaminobutírico, ácido α,γ-diaminopropiónico, homofenilalanina y α-tercbutilglicina.

[00451] Por ejemplo, en algunas modalidades, el CAR incluye un anticuerpo o fragmento de este, que incluye anticuerpos de cadena simple (sdAb, por ejemplo, que contienen solo la región VH), dominios VH y scFv, descritos en la presente, un espaciador tal como una bisagra de CD8a, un dominio transmembrana CD8a, un dominio de señalización intracelular 4-1BB y un dominio de señalización CD3 zeta. En algunas modalidades, el CAR incluye un anticuerpo o fragmento, incluidos sdAb y scFv descritos en la presente, un espaciador como una bisagra de CD8a, un dominio transmembrana CD8a, un dominio de señalización intracelular 4-1BB y un dominio de señalización CD3 zeta.

Anticuerpos MSLN y fragmentos de unión al antígeno

[00452] En algunos aspectos, en la presente se proporcionan anticuerpos MSLN o fragmentos de unión al antígeno de estos. En algunas modalidades, el resto de unión al antígeno MSLN se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un nanocuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo o un minicuerpo, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fab, un fragmento variable de cadena simple (scFv), y un anticuerpo de dominio único (sdAb), o un fragmento funcional de este. En algunas modalidades, el resto de unión al antígeno comprende un scFv. El resto de unión al antígeno puede incluir secuencias de aminoácidos

naturales o puede diseñarse o modificarse para proporcionar propiedades deseadas y/o mejoradas, por ejemplo, mayor afinidad de unión.

[00453] En algunos aspectos, se proporcionan en la presente anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen a mesotelina (MSLN), que comprenden un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 10, CDR-H2 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 11, y CDR-H3 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 12.

[00454] En algunos aspectos, un anticuerpo MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) de anticuerpo de dominio simple que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3. En algunas modalidades, la secuencia de cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[00455] En algunas modalidades, el anticuerpo MSLN o fragmento de unión al antígeno CDR-H3 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H3 de SEQ ID NO: 12, 200 o 201; la CDR-H2 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H2 de SEQ ID NO: 11, 196, 197, 198 o 199; la CDR-H1 tiene al menos aproximadamente un 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad con una CDR-H1 de SEQ ID NO: 10, 192, 193, 194 o 195. En algunas modalidades, la CDR-H3 es una CDR-H3 de la SEQ ID NO: 12, 200 o 201, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; la CDR-H2 es una CDR-H2 de la SEQ ID NO: 11, 196, 197, 198 o 199, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos; y la CDR-H1 es una CDR-H1 de la SEQ ID NO: 10, 192, 193, 194 o 195, con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos.

[00456] En algunas modalidades, un anticuerpo MSLN o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende de una a tres CDR de un dominio VHH como se establece en la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende de dos a tres CDR de un dominio VHH como se establece en la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende tres CDR de un dominio VHH como se establece en

la SEQ ID NO: 13. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Kabat. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Chothia. En algunos aspectos, las CDR son CDR de AbM. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Contact. En algunos aspectos, las CDR son CDR de IMGT.

[00457] En algunas modalidades, un anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende una secuencia VHH que tiene al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con una secuencia VHH establecida en la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno proporcionado en la presente comprende una secuencia VHH proporcionada en la SEQ ID NO: 13, con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En determinadas modalidades, se hace referencia en la presente a los dominios de unión al antígeno descritos en este párrafo como «variantes». En algunas modalidades, tales variantes se derivan de una secuencia proporcionada en la presente, por ejemplo, mediante maduración por afinidad, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o cualquier otro método conocido en la técnica o descrito en la presente. En algunas modalidades, tales variantes no se derivan de una secuencia proporcionada en la presente y pueden, por ejemplo, aislarse *de novo* de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente para obtener anticuerpos o dominios de unión al antígeno.

[00458] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR de VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR de VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 85 % (tal como, por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 90 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR de VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 90 % (tal como, por ejemplo, 90%, 95 %, al menos 95 %) de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la

SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) en la que el conjunto completo de CDR de VH 1, 2 y 3 (combinadas) tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las CDR 1, 2 y 3 de la SEQ ID NO: 13.

[00459] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

(i) una región determinante de complementariedad de VH uno (CDR1) que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:10, 192, 193, 194 o 195;

(ii) una CDR2 de VH que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:11, 196, 197, 198 o 199; y

(iii) una CDR3 de VH que comprende una secuencia que tiene como máximo dos (por ejemplo, una, dos, cero) modificaciones de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:12, 200 o 201.

[00460] En algunas modalidades, cada modificación de aminoácido, si la hay, es una sustitución de aminoácido conservadora. En algunas modalidades, cada modificación de aminoácido, si la hay, es una sustitución de aminoácido conservadora enumerada en la Tabla A1.

[00461] En algunas modalidades, la CDR1 de VH comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácido con respecto a la SEQ ID NO: 10, 192, 193, 194 o 195. En algunas modalidades, la CDR2 de VH comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:11, 196, 197, 198 o 199. En algunas modalidades, la CDR3 de VH comprende una secuencia que tiene como máximo una modificación de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO:12, 200 o 201. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una sustitución de aminoácido. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una sustitución de aminoácido conservadora. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una eliminación de aminoácido. En algunas modalidades, como máximo una modificación de aminoácido es una adición de aminoácido.

[00462] En algunas modalidades, la CDR1 de VH comprende una secuencia establecida en

la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, la CDR2 de VH comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11. En algunas modalidades, la CDR3 de VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

[00463] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende:

(i) una región determinante de complementariedad de VH uno (CDR1) que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 10;

(ii) una CDR2 de VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 11; y

(iii) una CDR3 de VH que comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 12.

[00464] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR1 de VH, una CDR2 de VH y una CDR3 de VH que comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente.

[00465] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende las CDR1, CDR2 y CDR3 de la SEQ ID NO: 13.

[00466] En algunas modalidades, las secuencias de CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH están presentes en una estructura de VH humana.

[00467] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95%) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 85 % (tal como, por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 90 %, al menos 95%) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90 % (tal como, por ejemplo, 90 %, 95 %, al menos 95%) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:

13.

[00468] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 80 % (tal como, por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95%) de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13.

[00469] En algunas modalidades, el anticuerpo MSLN o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a MSLN humano.

[00470] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno se une a MSLN humano con una K_D de aproximadamente 10^{-9} M a aproximadamente 10^{-6} M. En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno se une a MSLN humano con una K_D de ≤ 5 x 10^{-7} M. En algunas modalidades, el anticuerpo MSLN o fragmento de unión al antígeno se une a MSLN humano con una K_D de ≤ 1 x 10^{-7} M. En algunas modalidades, el anticuerpo MSLN o fragmento de unión al antígeno se une a MSLN humano con una K_D de ≤ 5 x 10^{-8} M. En algunas modalidades, el anticuerpo MSLN o fragmento de unión al antígeno se une a MSLN humano con una K_D de ≤ 2 x 10^{-8} M. En algunas modalidades, el anticuerpo MSLN o fragmento de unión al antígeno se une a MSLN humano con una K_D de ≤ 1 x 10^{-8} M. En algunas modalidades, el anticuerpo MSLN o fragmento de unión al antígeno se une a MSLN humano con una K_D de ≤ 1 x 10^{-9} M.

[00471] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo de dominio simple.

[00472] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo de dominio simple humano.

[00473] En algunas modalidades, el anticuerpo de MSLN o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo de dominio simple aislado. En algunas modalidades, el anticuerpo MSLN o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a MSLN humano aislado.

Ácidos nucleicos recombinantes y vectores

[00474] En un aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina, de células germinales (ALPG/P); un segundo polipéptido quimérico que comprende un CAR que comprende un

segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN); y una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en: una secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, una secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; y una secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00475] En otro aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a fosfatasa alcalina, de células placentarias/germinales (ALPG/P), donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2, CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4, CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, y CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6; un segundo polipéptido quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR); y una primera secuencia de ácido nucleico con una longitud de al menos 15 nucleótidos, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico con una longitud de al menos 15 nucleótidos, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementario a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00476] En otro aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador, un segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR- H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16; y una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00477] En otro aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador, un segundo polipéptido quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR- H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12; y una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la

segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00478] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias que se muestran en las SEQ ID NO: 156-165.

Moléculas de interferencia de ARN

[00479] El receptor de muerte de la superficie celular Fas (FAS) es un miembro de la superfamilia del receptor de TNF inductor de apoptosis. La proteína tirosina fosfatasa no receptora de tipo 2 (PTPN2) es una fosfatasa que regula el interferón y muchas otras vías de señalización. El cuadro de grupo de alta movilidad asociado a la selección de timocitos (TOX) es un factor de transcripción que regula la diferenciación de las células T agotadas.

[00480] Como se usa en la presente, «gen diana» se refiere a una secuencia de ácido nucleico en una célula, donde la expresión de la secuencia puede modularse específica y eficazmente usando las moléculas de ácido nucleico recombinantes y los métodos descritos en la presente. En determinadas modalidades, el gen diana puede estar implicado en el crecimiento (proliferación), mantenimiento (supervivencia) y/o comportamiento inmunológico de las células inmunitarias de un individuo. En algunas modalidades, el gen diana es FAS. En algunas modalidades, el gen diana es PTPN2. En algunas modalidades, el gen diana es TOX. En algunas modalidades, se modula más de un gen diana usando una molécula de ácido nucleico recombinante y los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, al menos dos genes diana se modulan usando las moléculas de ácido nucleico recombinantes y los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante es un ARNhc. En algunas modalidades, los genes diana son al menos FAS y PTPN2. En algunas modalidades, los genes diana son al menos FAS y TOX.

[00481] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39.

[00482] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende una secuencia

de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica la proteína tirosina fosfatasa humana no receptora de tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[00483] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la caja de grupo de alta movilidad asociada a la selección de timocitos humanos (TOX) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00484] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39 y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica la proteína tirosina fosfatasa humana no receptora de tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[00485] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39 y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la caja del grupo de alta movilidad asociada a la selección de timocitos humanos (TOX) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00486] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica la proteína tirosina fosfatasa humana no receptora de tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40 y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la caja del grupo de alta movilidad asociada a la selección de timocitos humanos (TOX) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00487] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada

del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42-56. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 45. En algunas modalidades, el ácido nucleico es capaz de reducir la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[00488] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72-84. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82. En algunas modalidades, el ácido nucleico es capaz de reducir la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[00489] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98-111. En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104. En algunas modalidades, el ácido nucleico es capaz de reducir la expresión de TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[00490] En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico tiene al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud.

[00491] En algunas modalidades, el ácido nucleico es una molécula de ARN de interferencia (ARNi). Las moléculas de ARNi ilustrativas incluyen ARN en horquilla corta (ARNhc), un ARN interferente pequeño (ARNip), un ARN bicatenario (ARNdc) o un oligonucleótido antisentido. En algunas modalidades, el ácido nucleico es un ARN en horquilla corta (ARNhc), un ARN interferente pequeño (ARNip), un ARN bicatenario (ARNdc) o un oligonucleótido antisentido. En algunas modalidades, el ácido nucleico es un ARNhc.

[00492] Los ácidos ribonucleicos en horquilla(ARNhc) monocatenarios son dúplex cortos en los que las cadenas sentido y antisentido están unidas por un bucle en horquilla. Consisten en una estructura de tallo-bucle que se puede transcribir en células a partir de un promotor de ARN polimerasa II o ARN polimerasa III en una construcción de plásmido. Una vez expresados, los ARNhc se procesan en especies de ARNi. Se sabe que la expresión de ARNhc a partir de un plásmido es relativamente estable, lo que proporciona grandes ventajas

sobre, por ejemplo, el uso de ARNip sintéticos. Las unidades de expresión de ARNhc se pueden incorporar en una variedad de plásmidos, liposomas, vectores virales y otros vehículos para su administración e integración en una célula diana. La expresión de ARNhc de un plásmido se puede integrar de forma estable para la expresión constitutiva. Los ARNhc se sintetizan en el núcleo de las células, además se procesan y transportan al citoplasma y luego se incorporan al complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para su actividad. Los ARNhc se convierten en moléculas activas de ARNip (que son capaces de unirse, secuestrar y/o prevenir la traducción de transcripciones de ARNm codificadas por genes diana).

[00493] La familia de proteínas Argonaute es el componente principal de RISC. Dentro de la familia de proteínas Argonaute, solo Ago2 contiene actividad endonucleasa que es capaz de escindir y liberar la cadena pasajera de la porción del tallo de la molécula de ARNhc. Los tres miembros restantes de la familia Argonaute, Ago1, Ago3 y Ago4, que no tienen actividad endonucleasa identificable, también se ensamblan en RISC y se cree que funcionan de manera independiente de la escisión. Por lo tanto, RISC se puede caracterizar por tener vías dependientes e independientes de la escisión.

[00494] El ARNi (p. ej., ARN antisentido, ARNip, microARN, ARNhc, etc.) se describen en las publicaciones internacionales números WO2018232356A1, WO2019084552A1, WO2019226998A1, WO2020014235A1, WO2020123871A1, y WO2020186219A1, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia para todos los propósitos.

[00495] La estructura del oligonucleótido antisentido y las modificaciones químicas se describen en la publicación internacional PCT n.º WO20/132521, que se incorpora a la presente como referencia.

[00496] Las moléculas de ARNdc y ARNhc y los métodos de uso y producción se describen en la patente de EE.UU. n.º 8.829.264; Patente de EE.UU. n.º 9.556.431; y la patente de EE.UU. n.º 8.252.526, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia

[00497] Las moléculas de ARNip y los métodos de uso y producción se describen en la patente estadounidense n.º 7.361.752 y la solicitud de patente estadounidense n.º US20050048647, ambas incorporadas en la presente como referencia.

[00498] Los métodos y composiciones adicionales para la interferencia de ARN, tales como ARNhc, ARNip, ARNdc y oligonucleótidos antisentido, se conocen generalmente en la técnica y se describen con más detalle en la patente de EE.UU. n.º 7.361.752; Patente de EE.UU. n.º

8.829.264; Patente de EE.UU. n.º 9.556.431; Patente de EE.UU. n.º 8.252.526, Publicación PCT internacional n.º WO00/44895; Publicación Internacional PCT n.° WO01/36646; Publicación Internacional PCT n.º WO99/32619; publicación internacional PCT n.° WO00/01846; Publicación Internacional PCT n.° WO01/29058; y Publicación Internacional PCT n.° WO00/44914; Publicación Internacional PCT n.° WO04/030634; cada uno de los cuales se incorpora a la presente como referencia.

[00499] Las secuencias (o construcciones) de ácido nucleico que pueden usarse para codificar las moléculas de ARNi, tales como un ARNhc descrito en la presente, pueden comprender un promotor, que está unido (o conectado) operativamente, directa o indirectamente, a una secuencia que codifica las moléculas de ARNi. Dichos promotores pueden seleccionarse basándose en la célula hospedadora y el efecto buscado. Entre los ejemplos no taxativos de promotores adecuados se encuentran los promotores constitutivos e inducibles, como los promotores basados en EF1α o ARN polimerasa II inducible (pol II). Entre los ejemplos no taxativos de promotores adecuados se encuentran además el promotor inducible o reprimible por tetraciclina, los promotores basados en ARN polimerasa I o III, los promotores virales dependientes de pol II, como el promotor de CMV-IE, y los promotores de pol III U6 y H1. También se puede utilizar el promotor del bacteriófago T7 (en cuyo caso se apreciará que la polimerasa T7 también debe estar presente). Las secuencias de ácido nucleico no necesitan restringirse al uso de un único promotor, especialmente porque las secuencias de ácido nucleico pueden comprender dos o más ARNhc (es decir, una combinación de efectores), incluidas, entre otras, moléculas de ARNhc incorporadas. Cada promotor incorporado puede controlar uno o cualquier combinación de los componentes de la molécula de ARNhc.

[00500] En determinadas modalidades, el promotor puede ser preferentemente activo en las células diana, por ejemplo, puede ser deseable expresar preferentemente al menos un ácido nucleico recombinante en células inmunitarias utilizando un promotor específico de células inmunitarias. La introducción de tales construcciones en células huésped puede efectuarse en condiciones en las que los dos o más ácidos nucleicos recombinantes que están contenidos dentro del transcrito precursor de ácido nucleico recombinante residan inicialmente dentro de un único transcrito primario, de manera que las moléculas de ARN separadas (por ejemplo, donde cada ARNhc comprende su propia estructura de tallo-bucle) se eliminan posteriormente

de dicha transcripción precursora mediante una ribonucleasa endógena. Los ácidos nucleicos recombinantes maduros resultantes (p. ej., ARNhc) pueden luego inducir la degradación y/o la represión de la traducción de los transcritos de ARNm del gen diana producidos en la célula. Alternativamente, cada una de las estructuras de tallo-bucle precursoras puede producirse como parte de una transcripción separada, en cuyo caso cada secuencia de ácido nucleico recombinante incluirá preferiblemente sus propias secuencias promotoras y terminadoras de la transcripción. Además, los múltiples transcritos precursores de ácidos nucleicos recombinantes pueden residir dentro de un único transcrito primario.

[00501] Las estructuras de tallo-bucle de los ácidos nucleicos recombinantes de ARNhc descritos en la presente pueden tener una longitud de aproximadamente 40 a 100 nucleótidos o, preferiblemente, de aproximadamente 50 a 75 nucleótidos de longitud. La región del tallo puede tener una longitud de aproximadamente 15-45 nucleótidos (o más), o de aproximadamente 20-30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la región del tallo tiene 22 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la región del tallo tiene 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 28 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 nucleótidos de longitud.

[00502] El tallo puede comprender un dúplex perfectamente complementario (excepto para cualquier cola 3'); sin embargo, pueden estar presentes protuberancias o bucles interiores en cualquiera de los brazos del tallo. El número de tales protuberancias y bucles interiores asimétricos es preferiblemente pequeño (por ejemplo, 1, 2 o 3) y tiene un tamaño de aproximadamente 3 nucleótidos o menos. La porción de bucle terminal puede comprender aproximadamente 4 o más nucleótidos, pero preferiblemente no más de aproximadamente 25. La porción de bucle tendrá preferiblemente un tamaño de 6-15 nucleótidos.

[00503] Como se describe en la presente, las regiones de tallo de los ARNhc comprenden cadenas pasajeras y cadenas guía, por lo que las cadenas guía contienen secuencias complementarias a la transcripción de ARNm diana codificado por el o los genes diana. Preferiblemente, el contenido de G-C y la coincidencia de la cadena guía y la cadena pasajera se diseñan cuidadosamente para una actividad de desenrollado de la cadena termodinámicamente favorable con o sin escisión por endonucleasa. Además, la especificidad de la cadena guía se confirma preferiblemente mediante una búsqueda BLAST (www.ncbi.nim.nih.qov/BLAST).

[00504] La invención establece que el nivel de expresión de múltiples genes diana puede ser modulada usando los métodos y los ácidos nucleicos recombinantes descritos en la presente. Por ejemplo, la invención proporciona que un primer conjunto de ácidos nucleicos recombinantes puede diseñarse para incluir una secuencia (una cadena guía) que está diseñada para reducir el nivel de expresión de un primer gen diana, mientras que un segundo conjunto de ácidos nucleicos recombinantes puede diseñarse para incluir una secuencia (una cadena guía) que está diseñada para reducir el nivel de expresión de un segundo gen diana. Los diferentes conjuntos de ácidos nucleicos recombinantes pueden expresarse y residir dentro de los mismos transcritos preliminares o separados. En determinadas modalidades, dicho enfoque múltiple, es decir, el uso de los ácidos nucleicos recombinantes descritos en la presente para modular el nivel de expresión de dos o más genes diana, puede tener un efecto terapéutico mejorado en un paciente. Por ejemplo, si a un paciente se le proporcionan células que expresan las moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en la presente para tratar, prevenir o mejorar los efectos del cáncer, puede ser deseable proporcionar al paciente dos o más tipos de moléculas de ácido nucleico recombinantes, que están diseñados para reducir el nivel de expresión de múltiples genes implicados en la activación o represión de las células inmunitarias.

[00505] La(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante descritas en la presente pueden ser capaces de reducir la expresión del gen diana en una célula en al menos más de aproximadamente un 50 % en comparación con una célula de control que no comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante. Por ejemplo, la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante (por ejemplo, ARNhc) pueden ser capaces de reducir la expresión de un gen diana seleccionado del grupo que consiste en FAS, PTPN2 y TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, o más en comparación con una célula de control que no comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante. La(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante pueden ser capaces de reducir la expresión de un gen diana seleccionado del grupo que consiste en FAS, PTPN2 y TOX en la célula inmunitaria en al menos entre aproximadamente 50-100%, 50-99%, 50 -95 %, 50-90 %, 50-85 %, 50-80 %, 50-75 %, 50-70 %, 50-65 %, 50-60 %, 50-55 %, o en comparación con una célula de control que no comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante. En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante es

capaz de reducir la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% en comparación con una célula de control que no comprende las(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante. En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante es capaz de reducir la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% en comparación con una célula de control que no comprende las(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante. En algunas modalidades, la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante es capaz de reducir la expresión de TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% en comparación con una célula de control que no comprende las(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante.

[00506] La(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante pueden sintetizarse químicamente o transcribirse in vitro y pueden incluir además una o más modificaciones de la cadena principal de fosfato-azúcar o de los residuos de nucleósidos.

[00507] Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos en las células, tales como transporte mediado por lípidos, transporte mediado por productos químicos, tal como fosfato cálcico, y similares. Por tanto, la construcción de molécula(s) de ácido nucleico recombinante puede introducirse junto con componentes que realicen una o más de las siguientes actividades: mejorar la absorción de ARN por la célula, promover la hibridación de las cadenas dúplex para ARNhc, estabilizar las cadenas de ARNhc hibridadas, o de lo contrario, aumentar la inhibición del gen diana.

Elementos adicionales

[00508] En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden además un brazo de reparación dirigido por homología 5' y/o un brazo de reparación dirigido por homología 3' complementario a un sitio de inserción en un cromosoma de la célula hospedadora. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden el brazo de reparación dirigido por homología 5' y el brazo de reparación dirigido por homología 3'. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes se incorporan en un casete de expresión o un vector de expresión. En algunas modalidades, el casete de expresión o el vector de expresión comprende además un promotor constitutivo corriente arriba de uno o más ácidos nucleicos recombinantes.

[00509] En algunas modalidades, el receptor cebador, CAR, el primer ácido nucleico y el

segundo ácido nucleico se incorporan en un único casete de expresión o un único vector de expresión. En algunas modalidades, el receptor cebado, CAR, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico se incorporan en dos o más casetes de expresión o vectores de expresión. En algunas modalidades, uno o más vectores de expresión son un vector no viral.

[00510] Una o más secuencias de ácido nucleico de interferencia (por ejemplo, uno o más ARNhc) pueden codificarse en las regiones intrón del inserto de ácido nucleico recombinante, plantilla de ADN, casete de expresión simple o un vector de expresión simple que también codifica el receptor cebador y/o el CAR. Por ejemplo, si la plantilla de ADN incluye promotores, tales como promotores EF1α o inducibles descritos en la presente, para impulsar la expresión del CAR o del receptor cebador, una o más secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, secuencias de ARNhc) pueden codificarse en la región intrónica del promotor. En algunas modalidades, una o más secuencias de ácido nucleico están codificadas en al menos una región de intrón del inserto de ácido nucleico recombinante o plantilla de ADN. En algunas modalidades, una o más secuencias de ácido nucleico están codificadas en al menos una región de intrón EF1α del inserto de ácido nucleico recombinante o plantilla de ADN.

[00511] En algunas modalidades, la presente divulgación contempla insertos de plantilla de ADN de ácido nucleico recombinante que comprenden uno o más transgenes que codifican los receptores cebadores y/o CAR como se describe en la presente. En algunas modalidades, el inserto de plantilla de ADN codifica un transgén de receptor cebador. En algunas modalidades, el inserto de plantilla de ADN codifica un transgén de receptor de antígeno quimérico. En algunas modalidades, el inserto de plantilla de ADN codifica un primer ácido nucleico complementario a al menos 15 nucleótidos de una secuencia de ARNm de FAS humano, y un segundo ácido nucleico complementario a al menos 15 nucleótidos de una secuencia de ARNm de PTPN2 o TOX humano. En algunas modalidades, el inserto de plantilla de ADN comprende un transgén de receptor cebador y un transgén de receptor de antígeno quimérico. En algunas modalidades, el inserto de plantilla de ADN comprende un transgén de receptor cebador, un transgén de receptor de antígeno quimérico, un primer ácido nucleico complementario a al menos 15 nucleótidos de una secuencia de ARNm de FAS humano y un segundo ácido nucleico complementario a al menos 15 nucleótidos de una secuencia de ARNm de PTPN2 o TOX humano. En algunas modalidades, el inserto de plantilla de ADN comprende un transgén de receptor cebador, un transgén de receptor de

antígeno quimérico, un primer ácido nucleico complementario a al menos 15 nucleótidos de una secuencia de ARNm de FAS humano y un segundo ácido nucleico complementario a al menos 15 nucleótidos de una secuencia de ARNm de PTPN2 humano.

[00512] En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes están codificados en un único inserto de plantilla de ADN. En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes están codificados en múltiples insertos de plantilla de ADN. Por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos recombinantes pueden codificarse en dos, tres o cuatro insertos de plantilla de ADN.

[00513] El inserto de plantilla de ADN también puede comprender un péptido autoescindible. Los ejemplos de péptidos autoescindibles incluyen, entre otros, péptidos 2A virales autoescindibles, por ejemplo, un péptido teschovirus-1 (P2A) porcino, un péptido del virus Thesea asigna (T2A), un péptido de virus A de la rinitis equina (E2A), o un péptido del virus de la fiebre aftosa (F2A). Los péptidos 2A autoescindibles permiten la expresión de múltiples productos génicos a partir de una única construcción. (Véase, por ejemplo, Chang et ál. "Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells," *MAbs* 7(2): 403-412 (2015)).

[00514] El inserto de plantilla de ADN también puede comprender un elemento WPRE. Los elementos WPRE se describen generalmente en Higashimoto, T., et ál. Gene Ther 14, 1298–1304 (2007); y Zufferey, R., et ál. J Virol. 1999 Apr;73(4):2886-92., ambos incorporados a la presente como referencia.

[00515] El inserto de plantilla de ADN también puede comprender una cola poliA de SV40.

Células recombinantes

[00516] Los transgenes que expresan el receptor cebador y el sistema CAR pueden introducirse en células, tales como una célula T, usando, por ejemplo, una técnica de sitio específico. Con la integración específica del sitio de los transgenes (por ejemplo, receptor cebador y CAR), los transgenes pueden dirigirse a un locus de puerto seguro o TRAC. Ejemplos de técnicas específicas de sitio para la integración en los loci de puerto seguro incluyen, de modo no taxativo, ingeniería dependiente de homología usando nucleasas e inserción dirigida independiente de homología usando Cas9.

[00517] Las células recombinantes diseñadas tienen aplicaciones en inmunooncología. El receptor cebador y el CAR, por ejemplo, pueden seleccionarse para dirigirse a diferentes

antígenos tumorales específicos. Ejemplos de cánceres que pueden atacarse eficazmente utilizando dichas células son los cánceres de la sangre o los cánceres sólidos. En algunas modalidades, la terapia con células inmunitarias se puede utilizar para tratar tumores sólidos.

[00518] En la presente se proporciona una célula modificada, donde la célula está modificada para tener una expresión reducida de un gen FAS y/o una función reducida de un producto del gen FAS con respecto a una célula no modificada correspondiente, opcionalmente donde la célula modificada es una célula hematopoyética. En algunos aspectos, la célula modificada se modifica adicionalmente para tener una expresión reducida de al menos un segundo gen y/o una función reducida de un producto de al menos un segundo gen con respecto a una célula no modificada correspondiente.

[00519] También se proporciona en la presente una célula modificada por ingeniería genética, donde la célula modificada por ingeniería genética se modifica para tener una expresión reducida de un gen FAS y/o una función reducida de un producto del gen FAS en relación con una célula modificada por ingeniería genética correspondiente, opcionalmente donde la célula modificada por ingeniería genética se diseña para expresar un receptor inmunitario heterólogo. En algunos aspectos, la célula modificada se modifica adicionalmente para tener una expresión reducida de al menos un segundo gen y/o una función reducida de un producto de al menos un segundo gen con respecto a una célula no modificada correspondiente.

[00520] También se proporciona en la presente una célula modificada, donde la célula se modifica para tener: (a) expresión reducida de un gen FAS y/o función reducida de un producto del gen FAS; y (b) expresión reducida de al menos un segundo gen y/o función reducida de un producto de al menos un segundo gen; donde la expresión reducida de cada gen es relativa a una célula no modificada correspondiente, opcionalmente donde la célula modificada es una célula hematopoyética.

[00521] En algunos aspectos, la modificación para reducir la expresión comprende modificar genéticamente el genoma de la célula para alterar el gen FAS y opcionalmente al menos un segundo gen. En algunos aspectos, la ingeniería genética comprende edición mediada por nucleasas, opcionalmente donde la edición mediada por nucleasas comprende edición mediada por CRISPR/Cas9.

[00522] En algunos aspectos, la modificación para reducir la expresión comprende el

direccionamiento mediado por ARNi del gen FAS y opcionalmente al menos un segundo gen, opcionalmente donde el direccionamiento mediado por ARNi comprende la desactivación mediada por ARN de horquilla corta (ARNhc). En algunos aspectos, el direccionamiento mediado por ARNi comprende diseñar la célula para que exprese un polinucleótido de ARN capaz de mediar la desactivación del gen FAS y opcionalmente al menos un segundo gen.

[00523] En algunos aspectos, la célula modificada comprende una célula hematopoyética. En algunos aspectos, la célula hematopoyética comprende una célula madre hematopoyética. En algunos aspectos, la célula hematopoyética comprende una célula inmunitaria. En algunos aspectos, la célula inmunitaria comprende una célula inmunitaria adaptativa, una célula inmunitaria innata, una célula T, una célula NK y un macrófago.

[00524] En algunos aspectos, la célula modificada comprende una célula modificada genéticamente. En algunos aspectos, la célula modificada genéticamente se diseña para expresar un receptor heterólogo. En algunos aspectos, el receptor heterólogo comprende un receptor inmunológico. En algunos aspectos, el receptor inmunológico heterólogo comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor de células T o un receptor de células NK. En algunos aspectos, la célula modificada genéticamente comprende una célula T o una célula capaz de diferenciarse en una célula T, y donde el receptor heterólogo se inserta en un locus de TCR endógeno, opcionalmente el locus del receptor alfa de células T (TRAC). En algunos aspectos, el receptor heterólogo comprende uno o más dominios de unión al antígeno, opcionalmente donde uno o más dominios de unión al antígeno son capaces de unirse a un antígeno tumoral o un antígeno asociado con el cáncer.

[00525] En algunos aspectos, la expresión y/o función reducida del gen FAS o su producto de expresión mejora al menos una propiedad de la célula modificada con respecto a la célula no modificada correspondiente.

[00526] En algunos aspectos, cuando la célula modificada se modifica adicionalmente para tener expresión y/o función reducida de al menos un segundo gen, la expresión y/o función reducida del gen FAS o su producto de expresión y la expresión y/o función reducida de al menos un segundo gen o su producto de expresión mejora al menos una propiedad de la célula modificada con respecto a una célula correspondiente modificada para reducir únicamente la expresión y/o la función del gen FAS.

[00527] En algunos aspectos, cuando la célula modificada se modifica adicionalmente para

tener expresión y/o función reducida de al menos un segundo gen, la expresión y/o función reducida del gen FAS o su producto de expresión y la expresión y/o función reducida de al menos un segundo gen o su producto de expresión mejora al menos una propiedad de la célula modificada con respecto a una célula correspondiente modificada para reducir únicamente la expresión y/o la función de al menos un segundo gen.

[00528] En algunos aspectos, al menos una propiedad comprende una capacidad proliferativa mejorada. En algunos aspectos, al menos una propiedad comprende una protección mejorada contra la apoptosis mediada por FAS. En algunos aspectos, la célula modificada comprende una célula inmunitaria y al menos una propiedad comprende una función mejorada de la célula efectora inmunitaria. En algunos aspectos, la función mejorada de las células efectoras inmunitarias comprende una mayor expresión, producción y/o secreción relativa de las moléculas efectoras. En algunos aspectos, la célula inmunitaria comprende una célula T y la molécula efectora comprende una o más moléculas seleccionadas del grupo que consiste en: IFNγ, TNF-alfa, granzima B y FASL.

[00529] En algunos aspectos, la célula modificada está diseñada para expresar un antígeno de superficie heterólogo, opcionalmente donde el antígeno de superficie heterólogo es capaz de mediar el agotamiento dirigido de la célula modificada diseñada con respecto a una célula modificada correspondiente no diseñada para expresar el antígeno de superficie heterólogo.

[00530] También se proporciona en la presente un método para estimular una respuesta inmunológica en un sujeto, donde el método comprende administrarle al sujeto cualquiera de las células modificadas como se describe en la presente. También se proporciona en la presente un método para tratar el cáncer en un sujeto, donde el método comprende administrarle al sujeto cualquiera de las células modificadas como se describe en la presente. En algunos aspectos, la célula modificada es autóloga con referencia al sujeto. En algunos aspectos, la célula modificada es alogénica con referencia al sujeto.

[00531] También se proporcionan en la presente células inmunitarias recombinantes que comprenden uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador; un segundo polipéptido quimérico que comprende un CAR; y una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en: una secuencia de ácido nucleico complementaria a los

nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, una secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; y una secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00532] En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00533] También se proporcionan en la presente células inmunitarias recombinantes que comprenden uno o más ácidos nucleicos recombinantes insertados de forma no viral en una región diana del genoma de la célula, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican el receptor cebador, CAR, una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementario a un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41 como se describe en la presente. También se proporcionan en la presente células inmunitarias recombinantes que comprenden el receptor cebador que se une específicamente a la fosfatasa alcalina de células placentarias/germinales (ALPG/P), el receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN, una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a una ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementario a un ARNm que codifica TOX humano que comprende la

secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00534] Una célula que comprende un inserto de plantilla de ADN en un locus diana o sitio de puerto seguro como se describe en la presente divulgación puede denominarse célula modificada genéticamente. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es cualquier célula que puede dar lugar a una célula inmunitaria pluripotente. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria primaria. En algunas modalidades, la célula inmunitaria puede ser una célula madre pluripotente inducida (iPSC) o una célula madre pluripotente humana (HSPC). En algunas modalidades, la célula inmunitaria comprende células hematopoyéticas primarias o células madre hematopoyéticas primarias. En algunas modalidades, esa célula modificada es una célula madre, una célula humana, una célula primaria, una célula hematopoyética, una célula inmunitaria adaptativa, una célula inmunitaria innata, una célula asesina natural (NK), una célula T, una célula CD8+, una célula CD4+ o una célula T progenitora. En algunas modalidades, las células inmunitarias son células T. En algunas modalidades, las células T son células T reguladoras, células T efectoras o células T sin tratamiento previo. En algunas modalidades, las células T son células T $CD8^+$. En algunas modalidades, las células T son células T $CD4^+$. En algunas modalidades, las células T son células T $CD4^+CD8^+$.

[00535] En algunas modalidades, la célula manipulada genéticamente es una célula madre, una célula humana, una célula primaria, una célula hematopoyética, una célula madre hematopoyética, una célula inmunitaria adaptativa, una célula inmunitaria innata, una célula T o una célula T progenitora. Los ejemplos no limitantes de células inmunitarias que se contemplan en la presente divulgación incluyen células T, células B, células asesinas naturales (NK), células NKT/iNKT, macrófagos, células mieloides y células dendríticas. Los ejemplos no limitantes de células madre que se contemplan en la presente divulgación incluyen células madre pluripotentes (PSC), células madre embrionarias (ESC), células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre embrionarias derivadas de embriones obtenidas mediante transferencia nuclear (ntES; transferencia nuclear ES), células madre de la línea germinal masculina (células GS), células germinales embrionarias (células EG), células madre hematopoyéticas/progenitoras (HSPC), células madre somáticas (células madre adultas), hemangioblastos, células madre neurales, células madre mesenquimales y células madre de otras células (incluidos osteocitos, condrocitos, miocitos, miocitos cardíacos, neuronas,

células tendinosas, adipocitos, pancrecitos, hepatocitos, nefrocitos y células foliculares, etc.). En algunas modalidades, las células manipuladas genéticamente son una célula T, células NK, iPSC y HSPC. En algunas modalidades, las células manipuladas genéticamente utilizadas en la presente divulgación son líneas celulares humanas cultivadas *in vitro* (por ejemplo, líneas celulares deliberadamente inmortalizadas, líneas celulares cancerosas, etc.).

[00536] También se proporcionan en la presente poblaciones de células que comprenden una pluralidad de células inmunitarias. En algunas modalidades, el genoma de al menos el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más de las células comprende el receptor cebador, CAR, y el primer y segundo ácidos nucleicos como se describe en la presente.

Método de tratamiento del cáncer

[00537] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para tratar una afección relacionada con el sistema inmunológico (por ejemplo, cáncer) en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P, un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN, una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00538] En otro aspecto, la invención proporciona métodos para mejorar una respuesta inmunológica en un individuo que comprende administrarle al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P, un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN, una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la

SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00539] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante es una molécula de ARNhc. En algunas modalidades, el ARNhc se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ARNhc de FAS, una molécula de ARNhc de PTPN2 y una molécula de ARNhc de TOX. En algunas modalidades, la célula comprende al menos una molécula de ARNhc de FAS. En algunas modalidades, la célula comprende al menos una molécula de ARNhc de PTPN2. En algunas modalidades, la célula comprende al menos una molécula de ARNhc de TOX. En algunas modalidades, la célula comprende al menos una molécula de ARNhc de FAS y una molécula de ARNhc de PTPN2. En algunas modalidades, la célula comprende al menos una molécula de ARNhc de FAS y una molécula de ARNhc de TOX. En algunas modalidades, la célula comprende al menos una molécula de ARNhc de PTPN2 y una molécula de ARNhc de TOX. En otro aspecto, la invención proporciona métodos para mejorar una respuesta inmune en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de una composición que comprende una célula que comprende al menos una molécula de ARNhc, donde la molécula de ARNhc se selecciona del grupo que consiste en una molécula de ARNhc de FAS, una molécula de ARNhc de PTPN2 y una molécula de ARNhc de TOX.

[00540] En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente son útiles para el tratamiento de una afección relacionada con el sistema inmunológico en un individuo. En una modalidad, el individuo es un ser humano.

[00541] En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente (tales como métodos para mejorar una respuesta inmune) son útiles para el tratamiento del cáncer y, de este modo, un individuo que recibe el sistema descrito en la presente tiene cáncer. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer sólido. En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer líquido. En algunas modalidades, el cáncer es inmunoevasivo. En algunas modalidades, el cáncer es inmunosensible. En modalidades particulares, el cáncer es cáncer de ovario, cáncer de Falopio, cáncer peritoneal primario, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer de cuello uterino

o cáncer de páncreas. En modalidades particulares, el cáncer es cáncer de ovario.

[00542] En algunas modalidades, el tratamiento da como resultado una disminución en el volumen o tamaño del cáncer. En algunas modalidades, el tratamiento es eficaz para reducir el volumen del cáncer en comparación con el volumen del cáncer antes de la administración del anticuerpo. En algunas modalidades, el tratamiento da como resultado una disminución en la tasa de crecimiento del cáncer. En algunas modalidades, el tratamiento es eficaz para reducir la tasa de crecimiento del cáncer en comparación con la tasa de crecimiento del cáncer antes de la administración del anticuerpo. En algunas modalidades, el tratamiento es eficaz para eliminar el cáncer.

[00543] En algunas modalidades, MSLN y ALPG o ALPP se expresan a un nivel más alto en el cáncer en comparación con una célula no cancerosa. Los niveles de MSLN, ALPG y ALPP pueden evaluarse mediante cualquier técnica conocida en el campo, incluidos, entre otros, ensayos de proteínas o ensayos nucleicos tales como FACS, transferencia Western, ELISA, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, radioinmunoensayo, dot blot, métodos de inmunodetección, HPLC, resonancia de plasmones superficiales, espectroscopia óptica, espectrometría de masas, HPLC, qPCR, RT-qPCR, qPCR multiplex o RT-qPCR, RNA-seq, análisis de micromatrices, SAGE, técnica MassARRAY y FISH, y combinaciones de estos.

Método de modulación inmunitaria

[00544] Los métodos de administración de una célula que comprende un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P, un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN, una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41 como se describe en la presente puede generar la modulación de una respuesta inmunológica. La modulación puede ser un

aumento o disminución de una respuesta inmunológica. En algunas modalidades, la modulación es un aumento de una respuesta inmunológica.

[00545] En un aspecto, la administración de una célula que comprende un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P y un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN como se describe en la presente puede dar como resultado la inducción de moléculas proinflamatorias, tales como citocinas o quimiocinas. Generalmente, las moléculas proinflamatorias inducidas están presentes en niveles mayores que los logrados con el control de isotipos. Estas moléculas proinflamatorias, a su vez, dan como resultado la activación de la inmunidad antitumoral, que incluye, entre otras, activación de células T, proliferación de células T, diferenciación de células T, activación de macrófagos similares a M1 y activación de células NK. Por lo tanto, la administración de un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P y un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN puede inducir múltiples mecanismos inmunes antitumorales que conducen a la destrucción del tumor.

[00546] En otro aspecto, se proporcionan en la presente métodos para aumentar una respuesta inmunológica en un individuo que comprenden administrarle al individuo una cantidad eficaz de una célula que comprende un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P y un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN. En algunas modalidades, el método para aumentar una respuesta inmunológica en un sujeto comprende administrarle al sujeto una célula que comprende un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P y un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN.

[00547] En algunas modalidades, la célula está presente en una composición farmacéutica que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[00548] En todos y cada uno de los aspectos del aumento de una respuesta inmunológica como se describe en la presente, cualquier aumento, disminución o alteración de un aspecto de característica(s) o función(es) se compara con una célula que no comprende una composición que comprende un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P y un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN.

[00549] Incrementar una respuesta inmunológica puede ser tanto mejorar una respuesta

inmunológica como inducir una respuesta inmunológica. Por ejemplo, aumentar una respuesta inmunológica abarca tanto el comienzo como el inicio de una respuesta inmunológica, o el aumento o amplificación de una respuesta inmunológica en curso o existente. En algunas modalidades, el tratamiento induce una respuesta inmunológica. En algunas modalidades, la respuesta inmune inducida es una respuesta inmune adaptiva. En algunas modalidades, la respuesta inmune inducida es una respuesta inmune innata. En algunas modalidades, el tratamiento potencia una respuesta inmunológica. En algunas modalidades, la respuesta inmunológica potenciada es una respuesta inmunológica adaptativa. En algunas modalidades, la respuesta inmunológica potenciada es una respuesta inmunológica innata. En algunas modalidades, el tratamiento aumenta una respuesta inmunológica. En algunas modalidades, la respuesta inmunológica aumentada es una respuesta inmunológica adaptativa. En algunas modalidades, la respuesta inmunológica aumentada es una respuesta inmunológica innata. En algunas modalidades, la respuesta inmunológica comienza o se inicia mediante la administración de una célula que comprende un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P y un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN. En algunas modalidades, la respuesta inmunológica se potencia mediante la administración de una célula que comprende un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P y un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN.

[00550] En otro aspecto, la presente solicitud proporciona métodos para editar genéticamente una célula con un sistema que comprende un receptor cebador que se une específicamente a ALPG/P, un receptor de antígeno quimérico que se une específicamente a MSLN, una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, complementaria a un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 41, que da como resultado la modulación de la función inmunitaria de la célula. La modulación puede ser aumentar una respuesta inmunológica. En algunas modalidades, la modulación es un aumento de la función inmunitaria. En algunas modalidades, la modulación de la función

conduce a la expresión de un CAR de MSLN. En algunas modalidades, la modulación de la función conduce a la activación de una célula que comprende el sistema.

[00551] En algunas modalidades, la célula es una célula asesina natural (NK), una célula T, una célula T CD8+, una célula T CD4+, una célula T primaria o un progenitor de células T.

[00552] En algunas modalidades, la modulación de la función de las células que comprenden el receptor cebador y el sistema CAR como se describe en la presente conduce a un aumento en la capacidad de las células para estimular las células T tanto nativas como activadas, por ejemplo, aumentando la secreción de citocinas o quimiocinas por las células que expresan el receptor cebador y el sistema CAR. En algunas modalidades, la modulación de la función mejora o aumenta la capacidad de las células para producir citocinas, quimiocinas, CAR o receptores coestimuladores o activadores. En algunas modalidades, la modulación aumenta la función estimuladora de las células T de las células que expresan el receptor cebador y el sistema CAR, incluyendo, por ejemplo, la capacidad de las células para activar la señalización del receptor de células T (TCR), la proliferación de células T, o la producción de citocinas de células T.

[00553] En algunas modalidades, la respuesta inmunológica aumentada es la secreción de citocinas y quimiocinas. En algunas modalidades, el receptor cebador y el sistema CAR inducen una mayor expresión de al menos una citocina o quimiocina en una célula en comparación con una célula de control de isotipo. En algunas modalidades, al menos una citocina o quimiocina se selecciona del grupo que consiste en: IL-2 e IFNγ. En algunas modalidades, la citocina o quimiocina es IL-2. En algunas modalidades, la citocina o quimiocina es IFNγ. En algunas modalidades, la secreción de citocinas o quimiocinas aumenta entre aproximadamente 1-100 veces 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, o 90-100 veces en comparación con una célula no tratada o una célula tratada con un anticuerpo de control de isotipo. En algunas modalidades, la quimiocina es IL-2 y la secreción aumenta entre aproximadamente 1-100 veces, 1 vez, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1-10 veces, 10-20 veces, 20-30 veces, 30-40 veces, 40-50 veces, 50-60 veces, 60-70 veces, 70-80 veces, 80-90 veces o 90-100 veces en comparación con una célula no tratada o una célula tratada con un anticuerpo de control de isotipo. En algunas modalidades, la citocina es IFNγ y la secreción aumenta entre

aproximadamente 1-100 veces, 1 vez, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 1-10 veces, 10-20 veces, 20-30 veces, 30-40 veces, 40-50 veces, 50-60 veces, 60-70 veces, 70-80 veces, 80-90 veces o 90-100 veces en comparación con una célula no tratada o una célula tratada con un anticuerpo de control de isotipo.

[00554] En algunas modalidades, la respuesta inmunológica potenciada es el reclutamiento y activación de células inmunitarias antitumorales.

[00555] En algunas modalidades, la célula que expresa el receptor cebador y el sistema CAR induce una respuesta inmunológica de memoria en comparación con una célula de control de isotipo. En general, una respuesta inmunológica de memoria es una respuesta inmunológica protectora ante una exposición posterior a patógenos o antígenos que el sistema inmunológico encontró previamente. Las respuestas inmunológicas de memoria ilustrativas incluyen la respuesta inmunológica después de una infección o vacunación con un antígeno. En general, las respuestas inmunológicas de memoria están mediadas por linfocitos como las células T o las células B. En algunas modalidades, la respuesta inmunológica de memoria es una respuesta inmunológica protectora contra el cáncer, incluido el crecimiento, la proliferación o la metástasis de células cancerosas. En algunas modalidades, la respuesta inmunológica de memoria inhibe, previene o reduce el crecimiento, la proliferación o la metástasis de células cancerosas.

Métodos para reducir la expresión génica

[00556] Otro aspecto de la invención proporciona un método para atenuar la expresión de un gen diana en células de mamífero, que comprende introducir en las células de mamífero un ácido nucleico recombinante complementario al ARNm del gen diana, tal como un ácido ribonucleico en horquilla monocatenario (ARNhm), ARNip, ARNbc u oligonucleótido antisentido. En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante complementario al ARNm del gen diana es un ARNhc. En algunas modalidades, el ARNhc comprende secuencias autocomplementarias de 19 a 100 nucleótidos que forman una región dúplex, secuencias autocomplementarias que se hibridan en condiciones intracelulares con un transcrito de ARNm del gen diana. En algunas modalidades, el ARNhc comprende secuencias autocomplementarias de 22 nt. En algunas modalidades, el ARNhc: (i) es un sustrato para la escisión por una enzima RNasaIII para producir un producto de ARN bicatenario, (ii) no

produce una destrucción general independiente de la secuencia de las células de mamífero, y (iii) reduce la expresión de dicho gen diana de una manera dependiente de la secuencia de dichas regiones complementarias. En algunas modalidades, el gen diana es FAS. En algunas modalidades, el gen diana es FAS humano. En algunas modalidades, el gen diana es PTPN2. En algunas modalidades, el gen diana es PTPN2 humano. En algunas modalidades, el gen diana es TOX. En algunas modalidades, el gen diana es TOX humano.

[00557] La célula inmunitaria que comprende el ácido nucleico recombinante puede tener una expresión reducida o disminuida de un gen diana seleccionado del grupo que consiste en FAS, PTPN2 y TOX. En algunas modalidades, la célula inmunitaria tiene una expresión reducida de FAS, PTPN2 y/o TOX de entre aproximadamente 50-100 %, 50-99 %, 50-95 %, 50-90 %, 50-85 %, 50-80 %, 50-75 %, 50-70 %, 50-65 %, 50-60 %, 50-55 %, en comparación con una célula de control que no comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante. En algunas modalidades, la célula inmunitaria tiene una expresión reducida de FAS en la célula inmunitaria de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, en comparación con una célula de control que no comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante. En algunas modalidades, la célula inmunitaria tiene una expresión reducida de PTPN2 en la célula inmunitaria de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, en comparación con una célula de control que no comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante. En algunas modalidades, la célula inmunitaria tiene una expresión reducida de TOX en la célula inmunitaria de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, en comparación con una célula de control que no comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico recombinante.

[00558] En algunas modalidades, la expresión de FAS en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico. En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico es capaz de reducir la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico. En algunas modalidades, la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00559] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico es capaz de reducir la expresión de TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico. En algunas modalidades, la expresión de TOX en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00560] En algunas modalidades, la expresión de FAS, PTPN2 y/o TOX se determina mediante un ensayo de ácido nucleico o un ensayo de proteínas. En algunas modalidades, el ensayo de ácido nucleico comprende al menos uno de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), RT-qPCR, micromatriz, matriz de genes o RNAseq.

Métodos de edición de células

[00561] Las expresiones «ingeniería genética», «edición de genes» o «edición del genoma», tal como se utilizan en la presente, se refieren a un tipo de manipulación genética en la que se inserta, reemplaza o elimina ADN del genoma utilizando nucleasas manipuladas artificialmente o «tijeras moleculares». Es una herramienta útil para dilucidar la función y el efecto de genes o proteínas específicas de secuencia o para alterar el comportamiento celular (por ejemplo, con fines terapéuticos).

[00562] Las herramientas de edición del genoma actualmente disponibles incluyen nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN) para incorporar genes en loci de puerto seguro (por ejemplo, el locus de puerto seguro del sitio de integración de virus adenoasociado 1 (AAVS1)). El sistema DICE (intercambio de casete de integrasa dual) que utiliza la integrasa phiC31 y la integrasa Bxb1 es una herramienta para la integración de dianas. Además, se pueden utilizar técnicas de repetición palindrómica corta/Cas9 agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas9) para la inserción de genes dirigida.

[00563] Los enfoques de edición de genes específicos de un sitio pueden incluir mecanismos dependientes de homología o mecanismos independientes de homología.

[00564] Todos los métodos conocidos en la técnica para la inserción dirigida de secuencias genéticas se contemplan en los métodos descritos en la presente para insertar construcciones en dianas genéticas o loci de puerto seguro.

[00565] En la presente se proporcionan métodos para insertar secuencias de nucleótidos de más de aproximadamente 5 kilobases de longitud en el genoma de una célula, en ausencia de un vector viral. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos de más de aproximadamente 5 kilobases de longitud se puede insertar en el genoma de una célula inmunitaria primaria, en ausencia de un vector viral.

[00566] La integración de ácidos nucleicos grandes, por ejemplo, ácidos nucleicos de más de 5 kilobases de tamaño, en las células, puede verse limitada por una baja eficiencia de integración, efectos fuera de la diana y/o pérdida de viabilidad celular. En la presente se describen métodos y composiciones para lograr la integración de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de más de aproximadamente 5 kilobases de tamaño, en el genoma de una célula. En algunos métodos se aumenta la eficiencia de la integración, se reducen los efectos fuera de la diana y/o se reduce la pérdida de viabilidad celular.

[00567] El plásmido se puede introducir en una célula inmunitaria con una nucleasa, como un sistema asociado a CRISPR (Cas). La nucleasa se puede introducir en un formato de ribonucleoproteína con un ARN guía (ARNg) que se dirige a un sitio específico del genoma de la célula inmunitaria. La nucleasa corta el ADN genómico en este sitio específico. El sitio específico puede ser una porción del genoma que codifica un receptor endógeno de células inmunitarias. Por lo tanto, cortar el genoma en este sitio hará que la célula inmunitaria ya no exprese un receptor endógeno de célula inmunitaria.

[00568] El plásmido puede incluir brazos de reparación dirigidos por homología 5' y 3' complementarios a secuencias en un sitio específico del genoma de la célula inmunitaria. Las secuencias complementarias están a ambos lados del sitio cortado por la nucleasa, lo que permite que el plásmido se incorpore en un sitio de inserción específico en el genoma de la célula inmunitaria. Una vez incorporado el plásmido, la célula expresará el receptor cebador. Sin embargo, como se explicó, el diseño del casete transgénico garantiza que los receptores del sistema de circuito administrados de forma no viral no expresen CAR hasta que el receptor cebador se una a su ligando afín y libere el factor de transcripción escindible.

[00569] Inicialmente, se activa una célula T. La célula T puede obtenerse de un paciente. Por tanto, la presente divulgación proporciona métodos en los que se recolectan células inmunitarias, tales como células T, de un paciente. Luego, el plásmido que codifica el CAR y

el receptor cebador se introducen en una célula T. Ventajosamente, los plásmidos de la presente divulgación se pueden introducir mediante electroporación. Cuando se introduce el plásmido mediante electroporación, también se puede introducir la nucleasa. Al utilizar electroporación, los métodos de la presente divulgación evitan el uso de vectores virales para introducir transgenes, lo cual es un cuello de botella conocido en la manipulación genética de células inmunitarias. Luego, las células T se expanden y se cultivan conjuntamente para crear una cantidad suficiente de células inmunitarias manipuladas genéticamente para usarlas como tratamiento terapéutico.

[00570] Los métodos para editar el genoma de una célula pueden incluir a) proporcionar un complejo de plantilla de ADN-complejo de ribonucleoproteína (RNP) Cas9 que comprende: (i) el RNP, donde el RNP comprende un dominio de nucleasa Cas9 y un ARN guía, donde el ARN guía específicamente se hibrida con una región diana del genoma de la célula, y donde el dominio de nucleasa Cas9 escinde la región diana para crear un sitio de inserción en el genoma de la célula; y (ii) una plantilla de ADN bicatenario o monocatenario, donde el tamaño de la plantilla de ADN es mayor que aproximadamente 200 nucleótidos, donde los extremos 5' y 3' de la plantilla de ADN comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean el sitio de inserción, y donde la relación molar de RNP a plantilla de ADN en el complejo es de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 100:1; y b) introducir el complejo de plantilla de ADN-RNP en la célula.

[00571] En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente proporcionan una eficacia de administración del complejo de plantilla de ADN-RNP de al menos aproximadamente 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %. , 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, 99,5%, 99% o superior. En algunos casos, la eficiencia se determina con respecto a células que son viables después de introducir la plantilla de ADN-RNP en la célula. En algunos casos, la eficiencia se determina con respecto a la cantidad total de células (viables o no viables) en las que se introduce la plantilla de ADN-RNP en la célula.

[00572] Como otro ejemplo, la eficacia de la administración se puede determinar cuantificando la cantidad de células con edición genómica en una población de células (en comparación con el total de células o el total de células viables obtenidas después de la etapa de introducción). Se pueden utilizar varios métodos para cuantificar la edición del genoma. Estos métodos incluyen, entre otros, el uso de una nucleasa específica de desajuste, como la endonucleasa I

T7; secuenciación de uno o más loci diana (por ejemplo, mediante secuenciación de Sanger de fragmentos de amplificación de locus diana clonados); y secuenciación profunda de alto rendimiento.

[00573] En algunas modalidades, la pérdida de viabilidad celular se reduce en comparación con la pérdida de viabilidad celular después de la introducción de ADN desnudo en una célula o la introducción de ADN en una célula usando un vector viral. La reducción puede ser una reducción de al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier porcentaje entre estos porcentajes. En algunas modalidades, los efectos de la integración fuera de la diana se reducen en comparación con la integración fuera de la diana después de la introducción de ADN desnudo en una célula o la introducción de ADN en una célula usando un vector viral. La reducción puede ser una reducción de al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier porcentaje entre estos porcentajes.

[00574] En algunos casos, los métodos descritos en la presente proporcionan una alta viabilidad celular de las células en las que se ha introducido la plantilla de ADN-RNP. En algunos casos, la viabilidad de las células a las que se les ha introducido la plantilla de ADN-RNP es al menos aproximadamente 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60 %, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%, 99,5%, 99% o superior. En algunos casos, la viabilidad de las células en las que se ha introducido la plantilla de ADN-RNP es de aproximadamente 20 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 35 % a aproximadamente 85 % o 90 % o más, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 85 % o 90 % o más, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 85 % o 90 % o más, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 85 % o 90 % o más, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 85 % o 90 % o más, o de aproximadamente 70 % a aproximadamente 85 % o 90 % o más.

[00575] En los métodos proporcionados en la presente, la relación molar de RNP a plantilla de ADN puede ser de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 100:1. Por ejemplo, la relación molar puede ser de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, de 5:1 a aproximadamente 20:1; 5:1 a aproximadamente 25:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 12:1; de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 20:1, o de aproximadamente 8:1 a

aproximadamente 25:1.

[00576] En algunas modalidades, la plantilla de ADN está a una concentración de aproximadamente 2.5 pM a aproximadamente 25 pM. Por ejemplo, la concentración de la plantilla de ADN puede ser aproximadamente 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23, 23.5, 24, 24.5, 25 pM o cualquier concentración entre estas concentraciones.

[00577] En algunas modalidades, el tamaño o la longitud de la plantilla de ADN es mayor que aproximadamente 4.5 kb, 5.0 kb, 5.1 kb, 5.2 kb, 5.3 kb, 5.4 kb, 5.5 kb, 5.6 kb, 5.7 kb, 5.8 kb, 5.9 kb, 6.0 kb, 6.1 kb, 6.2 kb, 6.3 kb, 6.4 kb, 6.5 kb, 6.6 kb, 6.7 kb, 6.8 kb, 6.9 kb, 7.0 kb, 7.1 kb, 7.2 kb, 7.3 kb, 7.4 kb, 7.5 kb, 7.6 kb, 7.7 kb, 7.8 kb, 7.9 kb, 8.0 kb, 8.1 kb, 8.2 kb, 8.3 kb, 8.4 kb, 8.5 kb, 8.6 kb, 8.7 kb, 8.8 kb, 8.9 kb, 9.0 kb, 9.1 kb, 9.2 kb, 9.3 kb, 9.4 kb, 9.5 kb, 9.6 kb, 9.7 kb, 9.8 kb, 9.9 kb o 10 kb o cualquier tamaño de plantilla de ADN entre estos tamaños. Por ejemplo, el tamaño de la plantilla de ADN puede ser de aproximadamente 4.5 kb a aproximadamente 10 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 10 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 9 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 8 kb, de aproximadamente 5 kb a aproximadamente 7 kb, aproximadamente 5 kb a aproximadamente 6 kb, aproximadamente 6 kb a aproximadamente 10 kb, aproximadamente 6 kb a aproximadamente 9 kb, aproximadamente 6 kb a aproximadamente 8 kb, aproximadamente 6 kb a aproximadamente 7 kb, aproximadamente 7 kb a aproximadamente 10 kb, de aproximadamente 7 kb a aproximadamente 9 kb, de aproximadamente 7 kb a aproximadamente 8 kb, de aproximadamente 8 kb a aproximadamente 10 kb, de aproximadamente 8 kb a aproximadamente 9 kb, o de aproximadamente 9 kb a aproximadamente 10 kb.

[00578] En algunas modalidades, la cantidad de plantilla de ADN es de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 µg. Por ejemplo, la cantidad de plantilla de ADN puede ser de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 5 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 6 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 7 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 8 µg, de aproximadamente 1 µg a

aproximadamente 9 µg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, la cantidad de plantilla de ADN es de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 3 µg, de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 5 µg, de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 6 µg, de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 7 µg, de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 8 µg, de aproximadamente 2 µg a aproximadamente 9 µg, o de 2 µg a aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, la cantidad de plantilla de ADN es de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 4 µg, de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 5 µg, de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 6 µg, de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 7 µg, aproximadamente 3 µg a aproximadamente 8 µg, aproximadamente 3 µg a aproximadamente 9 µg, o aproximadamente 3 µg a aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, la cantidad de plantilla de ADN es de aproximadamente 4 µg a aproximadamente 5 µg, de aproximadamente 4 µg a aproximadamente 6 µg, de aproximadamente 4 µg a aproximadamente 7 µg, de aproximadamente 4 µg a aproximadamente 8 µg, de aproximadamente 4 µg a aproximadamente 9 µg, o de aproximadamente 4 µg a aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, la cantidad de plantilla de ADN es de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 6 µg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 7 µg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 8 µg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 9 µg, o de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, la cantidad de plantilla de ADN es de aproximadamente 6 µg a aproximadamente 7 µg, de aproximadamente 6 µg a aproximadamente 8 µg, de aproximadamente 6 µg a aproximadamente 9 µg, o de aproximadamente 6 µg a aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, la cantidad de plantilla de ADN es de aproximadamente 7 µg a aproximadamente 8 µg, de aproximadamente 7 µg a aproximadamente 9 µg, o de aproximadamente 7 µg a aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, la cantidad de plantilla de ADN es de aproximadamente 8 µg a aproximadamente 9 µg, o de aproximadamente 8 µg a aproximadamente 10 µg. En algunas modalidades, la cantidad de plantilla de ADN es de aproximadamente 9 µg a aproximadamente 10 µg.

[00579] En algunos casos, el tamaño de la plantilla de ADN es lo suficientemente grande y en

cantidad suficiente para ser letal como el ADN desnudo. En algunas modalidades, la plantilla de ADN codifica una proteína heteróloga o un fragmento de esta. En algunas modalidades, la plantilla de ADN codifica al menos un gen. En algunas modalidades, la plantilla de ADN codifica al menos dos genes. En algunas modalidades, la plantilla de ADN codifica uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más genes.

[00580] En algunas modalidades, la plantilla de ADN incluye secuencias reguladoras, por ejemplo, una secuencia promotora y/o una secuencia potenciadora para regular la expresión de la proteína heteróloga o fragmento de esta después de la inserción en el genoma de una célula.

[00581] En algunos casos, la plantilla de ADN es una plantilla de ADN lineal. En algunos casos, la plantilla de ADN es una plantilla de ADN monocatenario. En algunos casos, la plantilla de ADN monocatenario es una plantilla de ADN monocatenario puro. Como se usa en la presente, por «ADN monocatenario puro» se entiende el ADN monocatenario que carece sustancialmente de la otra cadena de ADN o la cadena opuesta. Por «carece sustancialmente» se entiende que al ADN monocatenario puro le falta al menos 100 veces más de una cadena que de otra cadena de ADN.

[00582] En algunos casos, el complejo de plantilla de ADN-RNP se forma incubando el RNP con la plantilla de ADN durante menos de aproximadamente un minuto a aproximadamente treinta minutos, a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C. Por ejemplo, el RNP se puede incubar con la plantilla de ADN durante aproximadamente 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 20 segundos, 25 segundos, 30 segundos, 35 segundos, 40 segundos, 45 segundos, 50 segundos, 55 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos, 11 minutos, 12 minutos, 13 minutos, 14 minutos, 15 minutos, 16 minutos, 17 minutos, 18 minutos, 19 minutos , 20 minutos, 21 minutos, 22 minutos, 23 minutos, 24 minutos, 25 minutos, 26 minutos, 27 minutos, 28 minutos, 29 minutos o 30 minutos o cualquier cantidad de tiempo entre estos tiempos, a una temperatura de aproximadamente 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C o 25 °C. En otro ejemplo, el RNP se puede incubar con la plantilla de ADN durante menos de aproximadamente un minuto a aproximadamente un minuto, durante menos de aproximadamente un minuto a aproximadamente 5 minutos, durante menos de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos, durante aproximadamente 5

minutos a 10 minutos, durante aproximadamente 5 minutos a 15 minutos, durante aproximadamente 10 a aproximadamente 15 minutos, durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, o durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C. En algunas modalidades, el complejo de plantilla de ADN-RNP y la célula se mezclan antes de introducir el complejo de plantilla de ADN-RNP en la célula.

[00583] En algunas modalidades, la introducción del complejo de plantilla de ADN-RNP comprende electroporación. Los métodos, composiciones y dispositivos para electroporar células para introducir un complejo de plantilla de ADN-RNP pueden incluir los descritos en los ejemplos de la presente. Los métodos, composiciones y dispositivos adicionales o alternativos para electroporar células para introducir un complejo de plantilla de ADN-RNP pueden incluir los descritos en el documento WO/2006/001614 o Kim, J. A. et ál. Biosens. Bioelectron. 23, 1353–1360 (2008). Los métodos, composiciones y dispositivos adicionales o alternativos para electroporar células para introducir un complejo de plantilla de ADN-RNP pueden incluir los descritos en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.° 2006/0094095; 2005/0064596; o 2006/0087522. Los métodos, composiciones y dispositivos adicionales o alternativos para electroporar células para introducir un complejo de plantilla de ADN-RNP pueden incluir los descritos en Li, L.H. *et al*. Cancer Res. Treat. 1, 341–350 (2002); patente estadounidense n.°: 6,773,669; 7,186,559; 7,771,984; 7,991,559; 6485961; 7029916; y publicación de solicitud de patente estadounidense n.° 2014/0017213; y 2012/0088842, los cuales se incorporan a la presente mediante referencia. Los métodos, composiciones y dispositivos adicionales o alternativos para electroporar células para introducir un complejo de plantilla de ADN-RNP pueden incluir los descritos en Geng, T. *et ál*.. J. Control Release 144, 91–100 (2010); y Wang, J., *et ál*. Lab. Chip 10, 2057–2061 (2010), los cuales se incorporan a la presente mediante referencia.

[00584] En algunas modalidades, la proteína Cas9 puede estar en una forma de endonucleasa activa, de modo que cuando se une al ácido nucleico diana como parte de un complejo con un ARN guía o parte de un complejo con una plantilla de ADN, se introduce una rotura de doble cadena en el ácido nucleico diana. La rotura de doble cadena puede ser reparada por NHEJ para introducir mutaciones aleatorias, o HDR para introducir mutaciones específicas. Se pueden utilizar varias nucleasas Cas9 en los métodos descritos en la

presente. Por ejemplo, se puede utilizar una nucleasa Cas9 que requiere un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) NGG inmediatamente en 3' de la región a la que se dirige el ARN guía. Estas nucleasas Cas9 pueden dirigirse a cualquier región de un genoma que contenga una secuencia NGG. Como otro ejemplo, las proteínas Cas9 con requisitos de motivos PAM ortogonales se pueden utilizar para apuntar a secuencias que no tienen una secuencia NGG PAM adyacente. Las proteínas Cas9 ilustrativas con especificidades de secuencia PAM ortogonal incluyen, entre otras, CFP1, las descritas en Nature Methods 10, 1116–1121 (2013), y las descritas en Zetsche *et ál.*, Cell, Volume 163, tomo 3, p759–771, 22 de octubre de 2015, ambos incorporados a la presente mediante referencia.

[00585] En algunos casos, la proteína Cas9 es una nickasa, de modo que cuando se une al ácido nucleico diana como parte de un complejo con un ARN guía, se introduce una rotura o muesca de una sola cadena en el ácido nucleico diana. Un par de nickasas Cas9, cada una unida a un ARN guía estructuralmente diferente, pueden dirigirse a dos sitios proximales de una región genómica diana y de este modo introducir un par de roturas monocatenarias proximales en la región genómica diana. Los pares de nickasas pueden proporcionar una mayor especificidad porque es probable que los efectos fuera de la diana den lugar a muescas únicas, que generalmente se reparan sin lesión mediante mecanismos de reparación por escisión de base. Las nickasas Cas9 ilustrativas incluyen nucleasas Cas9 que tienen una mutación D10A o H840A.

[00586] En algunas modalidades, la RNP comprende una nucleasa Cas9. En algunas modalidades, la RNP comprende una nickasa Cas9. En algunas modalidades, el complejo de plantilla de ADN-RNP comprende al menos dos complejos de RNP estructuralmente diferentes. En algunas modalidades, al menos dos complejos de RNP estructuralmente diferentes contienen dominios de nucleasa Cas9 estructuralmente diferentes. En algunas modalidades, al menos dos complejos de RNP estructuralmente diferentes contienen ARN guía estructuralmente diferentes. En algunas modalidades, donde al menos dos complejos de RNP estructuralmente diferentes contienen ARN guía estructuralmente diferentes, cada uno de los complejos de RNP estructuralmente diferentes comprende una nickasa Cas9, y los ARN guía estructuralmente diferentes se hibridan con cadenas opuestas de la región diana.

[00587] En algunos casos, se introduce en la célula una pluralidad de plantillas de RNP-ADN que comprenden complejos de ribonucleoproteínas estructuralmente diferentes. Por ejemplo,

una proteína Cas9 puede formar complejos con una pluralidad (p. ej., 2, 3, 4, 5 o más, p. ej., 2-10, 5-100, 20-100) de ARN guía estructuralmente diferentes para dirigir la inserción de una plantilla de ADN en una pluralidad de regiones genómicas diana estructuralmente diferentes.

[00588] En los métodos y composiciones proporcionados en la presente, las células incluyen, entre otras, células eucariotas, células procarotas, células animales, células vegetales, células fúngicas y similares. Opcionalmente, la célula es una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana. La célula puede ser in vitro, ex vivo o in vivo. La célula también puede ser una célula primaria, una célula germinal, una célula madre o una célula precursora. La célula precursora puede ser, por ejemplo, una célula madre pluripotente o una célula madre hematopoyética. En algunas modalidades, la célula es una célula hematopoyética primaria o una célula madre hematopoyética primaria. En algunas modalidades, la célula hematopoyética primaria es una célula inmunitaria. En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula T. En algunas modalidades, la célula T es una célula T reguladora, una célula T efectora o una célula T sin tratamiento previo. En algunas modalidades, la célula T es una célula T $CD4^+$. En algunas modalidades, la célula T es una célula T $CD8^+$. En algunas modalidades, la célula T es una célula T $CD4^+CD8^+$ En algunas modalidades, la célula T es una célula T $CD4^-CD8^-$ También se proporcionan poblaciones de cualquiera de las células modificadas por cualquiera de los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, los métodos comprenden además expandir la población de células modificadas.

[00589] En algunos casos, las células se extraen de un sujeto, se modifican utilizando cualquiera de los métodos descritos en la presente y se administran al paciente. En otros casos, cualquiera de las construcciones descritas en la presente se administra al paciente *in vivo*. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 9737604 y Zhang et ál. “Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy,” *NPG Asia Materials* Volumen 9, página e441 (2017), ambos incorporados a la presente mediante referencia.

[00590] En algunas modalidades, el complejo de plantilla de ADN-RNP se introduce en aproximadamente 1 $x10^5$ a aproximadamente 2 $x10^6$ células. Por ejemplo, el complejo de plantilla de ADN-RNP se puede introducir en aproximadamente 1 x 10^5 a aproximadamente 5 x 10^5 células, aproximadamente 1 x 10^5 a aproximadamente 1 x 10^6, 1 x 10^5 a aproximadamente 1.5 x 10^6, 1 x 10^5 a aproximadamente 2 x 10^6, aproximadamente 1 x 10^6 a

aproximadamente 1.5 x 10^6 células o aproximadamente 1 x 10^6 a aproximadamente 2 x 10^6.

[00591] En algunos casos, los métodos y composiciones descritos en la presente se pueden usar para la generación, modificación, uso o control de células T recombinantes, tales como células T receptoras de antígenos quiméricos (células CAR T). Estas células CAR T se pueden usar para tratar o prevenir el cáncer, una enfermedad infecciosa o una enfermedad autoinmune en un sujeto. Por ejemplo, en algunas modalidades, se insertan o activan uno o más productos génicos en una célula T para expresar una proteína heteróloga (por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor cebador).

[00592] Ingeniería genética (p. ej., edición del genoma, edición mediada por nucleasas, edición mediada por CRISPR/Cas9, etc.), ingeniería de expresión de receptores heterólogos (p. ej., CAR y/o TCR) y ARNi (p.ej., ARN antisentido, ARNip, microARN, RNAhm, etc.) se describen en las publicaciones internacionales n.° WO2018232356A1, WO2019084552A1, WO2019226998A1, WO2020014235A1, WO2020123871A1 y WO2020186219A1, cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante referencia para todos los fines.

Sitios de inserción

[00593] Los métodos para editar el genoma de una célula T, específicamente, incluyen un método para editar el genoma de una célula T humana que comprende insertar una secuencia o construcción de ácido nucleico en una región diana en el exón 1 del gen de la subunidad TCR-α (TRAC) en la célula T humana. En algunas modalidades, la región diana está en el exón 1 del dominio constante del gen TRAC. En otras modalidades, la región diana está en el exón 1, exón 2 o exón 3, antes del inicio de la secuencia que codifica el dominio transmembrana de TCR-α.

[00594] Los métodos para editar el genoma de una célula T también incluyen un método para editar el genoma de una célula T humana que comprende insertar una secuencia o construcción de ácido nucleico en una región diana en el exón 1 del gen de la subunidad TCR-β (TRBC) en la célula T humana. En algunas modalidades, la región diana está en el exón 1 del gen TRBC1 o TRBC2.

[00595] Los métodos para editar el genoma de una célula T, específicamente, incluyen un método para editar el genoma de una célula T humana que comprende insertar una secuencia o construcción de ácido nucleico en una región diana de un sitio de puerto seguro genómico (GSH).

[00596] Los métodos para editar el genoma de una célula T también incluyen un método para editar el genoma de una célula T humana que comprende insertar una secuencia o construcción de ácido nucleico en una región diana GS94 (locus chr11:128340000-128350000).

[00597] En algunas modalidades, la región diana es el locus GS94.

[0001] Las terapias de edición génica incluyen, por ejemplo, integración de vectores e integración específica de sitio. La integración específica de sitio es una alternativa prometedora a la integración aleatoria de vectores virales, ya que mitiga los riesgos de mutagénesis por inserción u oncogénesis por inserción (Kolb *et ál.* Trends Biotechnol. 2005 23:399-406; Porteus *et ál.* Nat Biotechnol. 2005 23:967-973; Paques *et ál.* Curr Gen Ther. 2007 7:49-66). Sin embargo, la integración específica del sitio continúa enfrentando desafíos tales como baja eficiencia de activación, riesgo de oncogénesis de inserción, expresión inestable y/o anómala de genes adyacentes o del transgén, baja accesibilidad (por ejemplo, dentro de 20 kB de genes adyacentes), etc. Estos desafíos pueden abordarse, en parte, mediante la identificación y el uso de loci de puerto seguro o sitios de puerto seguro (SHS), que son sitios en los que se pueden incorporar genes o elementos genéticos sin alterar la expresión o regulación de genes adyacentes.

[00598] El más utilizado de los supuestos sitios de puerto seguro para humanos es el sitio AAVS1 en el cromosoma 19q, que inicialmente se identificó como un sitio para la inserción recurrente de virus adenoasociados. Se han identificado otros posibles SHS sobre la base de la homología, con sitios identificados por primera vez en otras especies (por ejemplo, el homólogo humano del locus murino permisivo Rosa26) o entre el creciente número de genes humanos que parecen no esenciales en algunas circunstancias. Un supuesto SHS de este tipo es el gen del receptor de quimiocina CCR5, que, cuando se altera, confiere resistencia a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Se han identificado SHS genómicos potenciales adicionales en humanos y otros tipos de células sobre la base del mapeo del sitio de integración viral o análisis de trampas genéticas, al igual que el locus Rosa26 murino original. Los tres SHS principales, AAVS1, CCR5 y Rosa26, están muy cerca de muchos genes codificadores de proteínas y elementos reguladores. (Véase Sadelain, M., et ál. (2012). Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. Nature reviews Cancer, 12(1), 51-58, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan a la presente mediante referencia

en su totalidad).

[00599] El AAVS1 (también conocido como locus PPP1R12C) en el cromosoma 19 humano es un SHS conocido por albergar transgenes (por ejemplo, transgenes de ADN) con función esperada. Está en la posición 19q13.42. Tiene una estructura de cromatina abierta y es competente para la transcripción. El locus SHS canónico para AAVS1 es chr19: 55,625,241–55,629,351. *Véase* Pellenz *et ál.* “New Human Chromosomal Sites with "Safe Harbor" Potential for Targeted Transgene Insertion.” Human gene therapy vol. 30,7 (2019): 814-828, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan a la presente mediante referencia. A continuación, se proporciona un ejemplo de ARNg diana y secuencia diana de AAVS1:

- secuencia ARNg de AAVS1: ggggccactagggacaggatGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT (SEQ ID NO: 212)
- secuencia diana de AAVS1: ggggccactagggacaggat (SEQ ID NO: 213)

[00600] CCR5, que se encuentra en el cromosoma 3 en la posición 3p21.31, codifica el correceptor principal del VIH-1. La alteración en este sitio en el gen CCR5 ha sido beneficiosa en la terapia contra el VIH/SIDA e impulsó el desarrollo de nucleasas con dedos de zinc que se dirigen a su tercer exón. El locus SHS canónico para CCR5 es chr3: 46,414,443–46,414,942. *Véase* Pellenz et ál. “New Human Chromosomal Sites with "Safe Harbor" Potential for Targeted Transgene Insertion.” Human gene therapy tomo 30,7 (2019): 814-828, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan a la presente mediante referencia.

[00601] El locus Rosa26 de ratón es particularmente útil para la modificación genética, ya que puede atacarse con alta eficiencia y se expresa en la mayoría de los tipos de células analizados. Irion et ál. 2007 ("Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells." Nature biotechnology 25.12 (2007): 1477-1482, cuya divulgación pertinente se incorpora a la presente mediante referencia) identificaron el homólogo humano, ROSA26 humano, en el cromosoma 3 (posición 3p25.3). El locus SHS canónico para Rosa26 humano (hRosa26) es chr3: 9,415,082–9,414,043. *Véase* Pellenz et ál. “New Human Chromosomal Sites with "Safe Harbor" Potential for Targeted Transgene Insertion.” Human gene therapy tomo 30,7 (2019): 814-828, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan a la presente mediante referencia.

[00602] Se proporcionan ejemplos adicionales de sitios de puerto seguro en Pellenz et ál.

"New Human Chromosomal Sites with "Safe Harbor" Potential for Targeted Transgene Insertion." Human gene therapy tomo 30,7 (2019): 814-828, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan a la presente mediante referencia. En la Tabla D se proporcionan ejemplos de sitios de integración adicionales.

[00603] En algunas modalidades, los sitios de puerto seguro permiten una alta expresión del transgén (suficiente para permitir la funcionalidad del transgén o el tratamiento de una enfermedad de interés) y una expresión estable del transgén durante varios días, semanas o meses. En algunas modalidades, la desactivación del gen en el locus de puerto seguro confiere un beneficio a la función de la célula, o el gen en el locus de puerto seguro no tiene una función conocida dentro de la célula. En algunas modalidades, el locus de puerto seguro da como resultado una expresión transgénica estable *in vitro* con o sin estimulación de CD3/CD28, una escisión fuera de la diana insignificante detectada por iGuide-Seq o CRISPR-Seq, menos escisión fuera de la diana en relación con otros loci detectados por iGuide-Seq o CRISPR-Seq, citotoxicidad insignificante independiente de transgén, expresión de citocinas insignificante independiente de transgén, expresión de receptor de antígeno quimérico insignificante independiente de transgén, desregulación o silenciamiento insignificante de genes cercanos y posicionamiento fuera de un gen relacionado con el cáncer.

[00604] Como se usa, un «gen cercano» puede referirse a un gen que está dentro de aproximadamente 100 kB, aproximadamente 125 kB, aproximadamente 150 kB, aproximadamente 175 kB, aproximadamente 200 kB, aproximadamente 225 kB, aproximadamente 250 kB, aproximadamente 275 kB, aproximadamente 300 kB, aproximadamente 325 kB, aproximadamente 350 kB, aproximadamente 375 kB, aproximadamente 400 kB, aproximadamente 425 kB, aproximadamente 450 kB, aproximadamente 475 kB, aproximadamente 500 kB, aproximadamente 525 kB, aproximadamente 550 kB lejos del locus de puerto seguro (sitio de integración).

[00605] En algunas modalidades, la presente divulgación contempla inserciones que comprenden uno o más transgenes. El transgén puede codificar una proteína terapéutica, un anticuerpo, un péptido o cualquier otro gen de interés. La integración del transgén puede dar como resultado, por ejemplo, propiedades terapéuticas mejoradas. Estas propiedades terapéuticas mejoradas, como se usan en la presente, se refieren a una propiedad terapéutica mejorada de una célula en comparación con una célula inmunitaria típica del mismo tipo de

célula normal. Por ejemplo, una célula T que tiene «propiedades terapéuticas mejoradas» tiene un resultado de tratamiento potenciado, mejorado y/o aumentado en comparación con una célula T típica, sin modificar y/o de origen natural. Las propiedades terapéuticas de las células inmunitarias pueden incluir, entre otras, trasplante, transporte, localización, viabilidad, autorrenovación, persistencia, control y regulación de la respuesta inmune, supervivencia y citotoxicidad celular. Las propiedades terapéuticas de las células inmunitarias también se manifiestan por: expresión de receptores dirigidos a antígenos; presentación de HLA o falta de este; tolerancia al microambiente intratumoral; inducción de células inmunitarias espectadoras y regulación inmune; especificidad diana mejorada con reducción; resistencia a tratamientos como la quimioterapia.

[00606] Como se utiliza en la presente, la expresión «tamaño de inserción» se refiere a la longitud de la secuencia de nucleótidos que se integra (inserta) en el locus diana o sitio de puerto seguro. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción comprende al menos aproximadamente 4.5 kilopares de bases (kb) a aproximadamente 10 kilopares de bases (kb). En algunas modalidades, el tamaño de la inserción comprende pares de bases de aproximadamente 5000 nucleótidos o más. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción comprende hasta 4.5, 4.8, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 kbp (kilopares de bases) o los tamaños intermedios. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es mayor que 4.5, 4.8, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 kbp o los tamaños intermedios. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción está dentro del intervalo de 4.5-15 kpb o es cualquier número en ese intervalo. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción está dentro del intervalo de 4,8-8,3 kpb o es cualquier número en ese intervalo. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción está dentro del intervalo de 5-8,3 kpb o es cualquier número en ese intervalo. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción está dentro del intervalo de 5-15 kpb o es cualquier número en ese intervalo. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción está dentro del intervalo de 4,5-20 kpb o es cualquier número en ese intervalo. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 5-10 kpb. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 4.5-10, 5-10, 6-10, 7-10, 8-10, 9-10 kbp. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 4.5-11, 6-11, 7-11, 8-11, 9-11 o 10-11 kbp. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 4.5-12, 6-12, 7-12, 8-12, 9-12, 10-12 o 11-12 kbp. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de

4.5-13, 6-13, 7-13, 8-13, 9-13, 10-13, 11-13 o 12-13 kbp. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 4.5-14, 6-14, 7-14, 8-14, 9-14, 10-14, 11-14, 12-14 o 13-14 kbp. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 4.5-15, 6-15, 7-15, 8-15, 9-15, 10-15, 11-15, 12-15, 13-15 o 14-15 kbp. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 4.5-16, 6-16, 7-16, 8-16, 9-16, 10-16, 11-16, 12-16, 13-16, 14-16 o 15-16 kbp. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 4.5-17, 6-17, 7-17, 8-17, 9-17, 10-17, 11-17, 12-17, 13-17, o 14-17, 15-17 o 16-17 kbp. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 4.5-18, 6-18, 7-18, 8-18, 9-18, 10-18, 11-18, 12-18, 13-18, 14-18, 15-18, 16-18 o 17-18 kbp. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 4.5-19, 6-19, 7-19, 8-19, 9-19, 10-19, 11-19, 12-19, 13-19, 14-19, 15-19, 16-19, 17-19 o 18-19 kbp. En algunas modalidades, el tamaño de la inserción es de 4.5-20, 6-20, 7-20, 8-20, 9-20, 10-20, 11-20, 12-20, 13-20, 14-20, 15-20, 16-20, 17-20, 18-20 o 19-20 kbp.

[00607] Las inserciones de la presente divulgación se refieren a moléculas de ácido nucleico o polinucleótidos insertados en un locus diana o sitio de puerto seguro. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos es una molécula de ADN, por ejemplo, ADN genómico, o comprende desoxirribonucleótidos. En algunas modalidades, la inserción comprende un fragmento más pequeño de ADN, tal como un ADN plástido, ADN mitocondrial o ADN aislado en forma de un plásmido, un fósmido, un cósmido, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), y/o cualquier otro segmento subgenómico de ADN. En algunas modalidades, la inserción es una molécula de ARN o comprende ribonucleótidos. Los nucleótidos en la inserción se contemplan como nucleótidos de origen natural, nucleótidos de origen no natural y nucleótidos modificados. Los nucleótidos pueden modificarse química o bioquímicamente, o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleotídicas. Los polinucleótidos pueden tener cualquier conformación topológica, incluidas conformaciones monocatenarias, bicatenarias, parcialmente dúplex, triplex, en horquilla, circulares y otras conformaciones tridimensionales contempladas en la técnica.

[00608] Las inserciones pueden tener regiones codificantes y/o no codificantes. La inserción puede comprender una secuencia no codificante (por ejemplo, elementos de control, por

ejemplo, una secuencia promotora). En algunas modalidades, la inserción codifica factores de transcripción. En algunas modalidades, la inserción codifica receptores de unión al antígeno tales como receptores únicos, receptores de células T (TCR), receptores cebadores, CAR, mAb, etc. En algunas modalidades, la inserción es una secuencia humana. En algunas modalidades, la inserción es quimérica. En algunas modalidades, la inserción es un casete terapéutico de múltiples genes/múltiples módulos. Un casete terapéutico de múltiples genes/múltiples módulos se refiere a una inserción o casete que tiene uno o más de un receptor (por ejemplo, receptores sintéticos), otras secuencias codificantes de proteínas exógenas, ARN no codificantes, elementos reguladores de la transcripción y/o secuencias de aisladores, etc.

[00609] En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico se inserta en el genoma de la célula T mediante administración no viral. En métodos de administración no viral, el ácido nucleico puede ser ADN desnudo o en un plásmido o vector no viral. Las técnicas de administración no viral pueden ser técnicas de integración específicas del sitio, como se describe en la presente o como se conoce por los expertos en la técnica. Ejemplos de técnicas específicas del sitio para la integración en los loci de puerto seguro incluyen, de modo no taxativo, ingeniería dependiente de homología usando nucleasas e inserción dirigida independiente de homología usando Cas9 u otras endonucleasas CRISPR.

[00610] En algunas modalidades, la inserción se integra en un sitio de puerto seguro introduciendo en la célula manipulada genéticamente (a) una nucleasa dirigida que escinde una región diana en el sitio de puerto seguro para crear el sitio de inserción; y (b) la secuencia de ácido nucleico (inserción), donde la inserción se incorpora en el sitio de inserción mediante, por ejemplo, HDR. Ejemplos de técnicas de administración no virales que pueden usarse en los métodos de la presente divulgación se proporcionan en las solicitudes estadounidenses n.° 16/568.116 y 16/622.843, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad.

[00611] En la **Tabla D** se proporcionan ejemplos de sitios de integración contemplados.

Tabla D: secuencias de ARNgu

ID de ARNgu	**SEQ ID NO:**	**Secuencia de ARNgu**	**ARNgu coor inicio GRCH38**	**Loci diana de ARNgu**	**Sitio de integración**	**Mediana (% modificado), resumida de 2**

						donantes, 2 conjuntos de cebadores
ARNgu_1	214	GCACCTGAATACCACGCCTG	chr16:88811818	APRT	APRT	79.28
ARNgu_2	215	CGCCTGCGATGTAGTCGATG	chr16:88811551	APRT	APRT	78.60
ARNgu_3	216	CAGGACGGGCGAGATGTCCC	chr16:88811640	APRT	APRT	85.25
ARNgu_4	217	CTGAATCTTTGGAGTACCTG	chr15:44715425	B2M	B2M	78.51
ARNgu_5	218	GGCCACGGAGCGAGACATCT	chr15:44711550	B2M	B2M	94.75
ARNgu_6	219	AAGTCAACTTCAATGTCGGA	chr15:44715515	B2M	B2M	70.97
ARNgu_7	220	GCTTGGAGGCCTGATCAGCG	chr19:361411111	CAPNS1	CAPNS1	89.34
ARNgu_8	221	CTTATCTCTTCGCAGCGAGG	chr19:361422301	CAPNS1	CAPNS1	91.09
ARNgu_9	222	CACACATTACTCCAACATTG	chr19:361422676	CAPNS1	CAPNS1	71.98
ARNgu	223	TTCCGCAA	chr3:10574	CBLB	CBLB	91.55

_10		AATAGAGCCCCA	6019			
ARNgu_11	224	TGCACAGAACTATCGTACCA	chr3:105751622	CBLB	CBLB	91.43
ARNgu_12	225	GCAATAAGACTCTTTAAAGA	chr3:105853470	CBLB	CBLB	76.18
ARNgu_13	226	CAAAGAGATTACGAATGCCT	chr1:116754658	CD2	CD2	89.80
ARNgu_14	227	CAAGGCACCCCAGGTTTCCA	chr1:116754663	CD2	CD2	92.70
ARNgu_15	228	TTACGAATGCCTTGGAAACC	chr1:116754666	CD2	CD2	92.82
ARNgu_16	229	CAGAGACGCATCTGACCCTC	chr11:118315540	CD3E	CD3E	90.96
ARNgu_17	230	CATGCAGTTCTCACACACTG	chr11:118313715	CD3E	CD3E	87.47
ARNgu_18	231	GTGTGAGAACTGCATGGAGA	chr11:118313715	CD3E	CD3E	86.65
ARNgu_19	232	TCTCATTTCAGGAAACCACT	chr11:118349748	CD3G	CD3G	87.24
ARNgu_20	233	AGTCATACACCTTAAC	chr11:118349754	CD3G	CD3G	87.99

		CAAG				
ARNgu_21	234	TTCAAGGAAACCAGTTGAGG	chr11:118352458	CD3G	CD3G	86.55
ARNgu_22	235	GAGCCTTGCCTGGAAATCTG	chr11:61118177	CD5	CD5	84.03
ARNgu_23	236	AAGCGTCAAAAGTCTGCCAG	chr11:61118324	CD5	CD5	89.19
ARNgu_24	237	CGTTCCAACTCGAAGTGCCA	chr11:61118121	CD5	CD5	83.11
ARNgu_25	238	GAGCGACTGGGACACGGTGA	chr9:136866246	EDF1	EDF1	88.84
ARNgu_26	239	GCTGCGCAAGAAGGGCCCTA	chr9:136866211	EDF1	EDF1	91.04
ARNgu_27	240	TTGTTCTGGCCAGCAGCCCC	chr9:136863433	EDF1	EDF1	85.98
ARNgu_28	241	CTTCCAGAGCCACATCATCG	chr19:48965791	FTL	FTL	93.10
ARNgu_29	242	GGGACTCACCAGAGAGAGGT	chr19:48965601	FTL	FTL	88.86
ARNgu_30	243	CGGTCGAAATAGAAGCCCTA	chr19:48965770	FTL	FTL	93.14

ARNgu_31	244	AAAAGGATATTGTGCAACTG	chr10:87933015	PTEN	PTEN	92.37
ARNgu_32	245	TGTGCATATTTATTACATCG	chr10:87933183	PTEN	PTEN	90.64
ARNgu_33	246	TTTGTGAAGATCTTGACCAA	chr10:87933087	PTEN	PTEN	85.36
ARNgu_34	247	TGTCATGCTGAACCGCATTG	chr18:12830972	PTPN2	PTPN2	87.94
ARNgu_35	248	CCACTCTATGAGGATAGTCA	chr18:12859219	PTPN2	PTPN2	92.45
ARNgu_36	249	TTGACATAGAAGAGGCACAA	chr18:12836828	PTPN2	PTPN2	93.96
ARNgu_37	250	GAGTACTACACTCAGCAGCA	chr12:6952098	PTPN6	PTPN6	89.61
ARNgu_38	251	TCACGCACAAGAAACGTCCA	chr12:6954872	PTPN6	PTPN6	82.74
ARNgu_39	252	AGGTCTCGGTGAAACCACCT	chr12:6951610	PTPN6	PTPN6	91.27
ARNgu_40	253	AGCATTATCCAAAGAGTCCG	chr1:198696873	PTPRC	PTPRC	88.88
ARNgu	254	ATATTAATT	chr1:19869	PTPRC	PTPRC	88.95

_41		CTTACCAGTGG	2370			
ARNgu_42	255	AGCTTTAAATCAAGGTTCAT	chr1:198756176	PTPRC	PTPRC	96.89
ARNgu_43	256	ATCCCGAGCCCTAAGGTGCA	chr11:67436325	PTPRCAP	PTPRCAP	84.08
ARNgu_44	257	GGCAGCGCGGAGGACAGCGT	chr11:67436285	PTPRCAP	PTPRCAP	97.74
ARNgu_45	258	CTCAGGGGGCTACTACCACC	chr11:67436170	PTPRCAP	PTPRCAP	91.50
ARNgu_46	259	GTCACCGACGAGACCAGAAG	chr5:82277810	RPS23	RPS23	79.40
ARNgu_47	260	GTCGTGGACTTCGTACTGCT	chr5:82277843	RPS23	RPS23	83.07
ARNgu_48	261	TAATTTTTAGGCAAGTGTCG	chr5:82277860	RPS23	RPS23	61.94
ARNgu_49	262	TTAGCTGTTAGACTTGAATA	chr14:519938810	RTRAF	RTRAF	85.50
ARNgu_50	263	CGAGAGCCGTCAACTTGCGT	chr14:519896652	RTRAF	RTRAF	85.64
ARNgu_51	264	CGGCTTCAACTGCAAA	chr14:519896700	RTRAF	RTRAF	88.77

		GGTG				
ARNgu_52	265	TATGAAAAAGCAGAGCGACT	chr15:43793025	SERF2	SERF2	89.61
ARNgu_53	266	TCTGGCGGGCGAGCTCACGC	chr15:43792989	SERF2	SERF2	86.73
ARNgu_54	267	CTCACGCTGGTTACCGCCTA	chr15:43792977	SERF2	SERF2	80.57
ARNgu_55	268	AAAGATTACGAACTTCCCTG	chr12:46207559	SLC38A1	SLC38A1	92.24
ARNgu_56	269	GTTAAAAACAGACATGCCTA	chr12:46229232	SLC38A1	SLC38A1	91.51
ARNgu_57	270	ATGCCTAAGGAGGTTGTACC	chr12:46229246	SLC38A1	SLC38A1	79.48
ARNgu_58	271	CTCCAGGTATCCCATCGAAA	chr18:47869418	SMAD2	SMAD2	79.53
ARNgu_59	272	CACCAAATACGATAGATCAG	chr18:47870532	SMAD2	SMAD2	86.61
ARNgu_60	273	TGGCGGCGTGAATGGCAAGA	chr18:47896729	SMAD2	SMAD2	82.91
ARNgu_61	274	TAGGATGGTAGCACACAACC	chr16:11255478	SOCS1	SOCS1	92.25

ARNgu_62	275	CAGCAGCAGAGCCCCGACGG	chr16:11255432	SOCS1	SOCS1	83.79
ARNgu_63	276	CGGCGTGCGAACGGAATGTG	chr16:11255296	SOCS1	SOCS1	84.24
ARNgu_64	277	TATAGACGCTGCCCGACGTC	chr15:40038895	SRP14	SRP14	95.12
ARNgu_65	278	TCCAAAGAAGGGTACTGTGG	chr15:40038368	SRP14	SRP14	92.14
sgRNA_66	279	ACAGTACCCTTCTTTGGAAT	chr15:40038358	SRP14	SRP14	65.82
sgRNA_67	280	GCGACGGGCGCATCTACGTG	chr12:120469572	SRSF9	SRSF9	83.68
sgRNA_68	281	CCCGACCTCCATAAGTCCTG	chr12:120465700	SRSF9	SRSF9	92.56
sgRNA_69	282	GGGGTCCTCGAAGCGCACGA	chr12:120469426	SRSF9	SRSF9	89.94
sgRNA_70	283	TGCTCTGTTTAGAAGATGAC	chr5:32591641	SUB1	SUB1	79.36
sgRNA_71	284	ATATTCTTTTCTAGTTAAAG	chr5:32591566	SUB1	SUB1	70.93
sgRNA	285	CCTGTAAA	chr5:32591	SUB1	SUB1	93.66

_72		GAAACAAA AGAC	614			
sgRNA _73	286	TGGAGAAA GACGTAAC TTCG	chr4:10523 4315	TET2	TET2	83.53
sgRNA _74	287	TCTGCCCT GAGGTATG CGAT	chr4:10523 4747	TET2	TET2	90.97
sgRNA _75	288	ATTCCGCT TGGTGAAA ACGA	chr4:10523 5656	TET2	TET2	89.62
sgRNA _76	289	CAGGCACA ATAGAAAC AACG	chr3:11429 5571	TIGIT	TIGIT	92.65
sgRNA _77	290	CCATTTGT AATGCTGA CTTG	chr3:11429 5700	TIGIT	TIGIT	60.75
sgRNA _78	291	CTGGGTCA CTTGTGCC GTGG	chr3:11429 5634	TIGIT	TIGIT	87.99
sgRNA _79	292	GTCAGGGT TCTGGATA TCTG	chr14:2254 7508	TRAC	TRAC	98.20
sgRNA _80	293	TGGATTTA GAGTCTCT CAGC	chr14:2254 7541	TRAC	TRAC	88.15
sgRNA _81	294	CTGCGGCT GTGGTCCA GCTG	chr14:2255 0661	TRAC	TRAC	94.77
sgRNA _82	295	ACAAAACT GTGCTAGA	chr14:2254 7658	TRAC	TRAC	87.86

		CATG				
sgRNA_83	296	TTCTTCCCCAGCCCAGGTAA	chr14:22547778	TRAC	TRAC	89.85
sgRNA_84	297	CGTCATGAGCAGATTAAACC	chr14:22550625	TRAC	TRAC	95.81
sgRNA_85	298	GAGAGCGCCTGCGACCCGAG	chr19:58544980	TRIM28	TRIM28	89.44
sgRNA_86	299	CCAGCGGGTGAAGTACACCA	chr19:58544869	TRIM28	TRIM28	94.79
sgRNA_87	300	GGAGCGCTTTTCGCCGCCAG	chr19:58544839	TRIM28	TRIM28	91.81
sgRNA_88	301	TGAGGCCTGGACCTTATGCA	chr10:33134193	chr10:33130000-33140000	desert_1 (GS88)	69.44
sgRNA_89	302	CCTGGTGGAGTGAACCATGA	chr10:33132917	chr10:33130000-33140000	desert_1 (GS89)	95.25
sgRNA_90	303	CAAGCACTTAGGTTCCCCTG	chr10:33134633	chr10:33130000-33140000	desert_1 (GS90)	91.13
sgRNA_91	304	GGTCTCCCTACAATTCAGCG	chr10:72294568	chr10:72290000-7230000	desert_2 (GS91)	92.02

				0		
sgRNA_92	305	CACAGCGCGTGACTGCAATG	chr10:72298268	chr10:72290000-72300000	desert_2 (GS92)	90.22
sgRNA_93	306	TCTGGGGCACCAATTCTAGG	chr10:72292786	chr10:72290000-72300000	desert_2 (GS93)	86.35
sgRNA_94	307	GAGCCATGCTTGGCTTACGA	chr11:128342576	chr11:128340000-128350000	desert_3 (GS94)	91.24
ARNsg_95	308	GTACAAGTACTTATCTCATG	chr11:128343592	chr11:128340000-128350000	desert_3 (GS95)	89.02
sgRNA_96	309	GAGATAACAACATAACAACA	chr11:128347170	chr11:128340000-128350000	desert_3 (GS96)	96.47
sgRNA_97	310	CATATTCCATAGTCTTTGGG	chr11:65425000	chr11:65425000-65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS97)	88.54
sgRNA_98	311	CTGCCCCTTAGCAACTTAGG	chr11:65425507	chr11:65425000-65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS98)	92.76

sgRNA_99	312	TGTTTAAAAATATGTTGACA	chr11:65426264	chr11:65425000-65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS99)	90.76
sgRNA_100	313	CCAGGAATGGAAACTCACGC	chr15:92830315	chr15:92830000-92840000	desert_5 (GS100)	87.84
sgRNA_101	314	GAGGCCGCTGAATTAACCCG	chr15:92831850	chr15:92830000-92840000	desert_5 (GS101)	85.32
sgRNA_102	315	ATACACGCACACTTGCAGAA	chr15:92831131	chr15:92830000-92840000	desert_5 (GS102)	99.92
sgRNA_103	316	GAGCAGACAGAAACCCAGGG	chr16:11225670	chr16:11220000-11230000	desert_6 (GS103)	87.92
sgRNA_104	317	TGAGTCTCCAAACAGAACAG	chr16:11226284	chr16:11220000-11230000	desert_6 (GS104)	88.53
sgRNA_105	318	TAATATCACTGACTTCACGG	chr16:11225029	chr16:11220000-11230000	desert_6 (GS105)	87.65
sgRNA_106	319	TACACACAATGTAAGC	chr2:87467461	chr2:87460000-	desert_7 (GS106)	71.79

		AGCA		87470000		
sgRNA_107	320	GGGAGCTCAATTCGAAACCA	chr2:87468809	chr2:87460000-87470000	desert_7 (GS107)	65.89
sgRNA_108	321	TTGGACAGGTGAGACAGTCG	chr2:87467001	chr2:87460000-87470000	desert_7 (GS108)	72.64
sgRNA_109	322	AAGCTCACTCAGATAGTGTG	chr3:186511316	chr3:186510000-186520000	desert_8 (GS109)	76.89
sgRNA_110	323	CAGGAGAACCACCTTACACG	chr3:186515260	chr3:186510000-186520000	desert_8 (GS110)	86.31
sgRNA_111	324	GGACAGACCCTGATTCACAA	chr3:186519655	chr3:186510000-186520000	desert_8 (GS111)	85.47
sgRNA_112	325	ACATGGCAGTCTATGAACAG	chr3:59451154	chr3:59450000-59460000	desert_9 (GS112)	87.77
sgRNA_113	326	CCTATAGAGAGTACTACTTG	chr3:59456416	chr3:59450000-59460000	desert_9 (GS113)	79.33
sgRNA	327	CCAACCGG	chr3:59457	chr3:594	desert_9	92.21

_114		GTCTTCATTACG	029	50000-59460000	(GS114)	
sgRNA_115	328	TCAAGCGTAGAGTTCCGAGT	chr8:127993006	chr8:127980000-128000000	desert_10 (GS115)	93.07
sgRNA_116	329	TCATGCAATTATGGACCCAG	chr8:127994663	chr8:127980000-128000000	desert_10 (GS116)	89.40
sgRNA_117	330	CGGGAAAGTGACTGGCCATG	chr8:127996766	chr8:127980000-128000000	desert_10 (GS117)	87.45
sgRNA_118	331	TGAGATTGAAATCAAATCGG	chr9:7974159	chr9:7970000-7980000	desert_11 (GS118)	84.84
sgRNA_119	332	TATGCAATATTCATCACGCG	chr9:7977914	chr9:7970000-7980000	desert_11 (GS119)	85.44
sgRNA_120	333	AATGTGTTAAATCAAATGCA	chr9:7976895	chr9:7970000-7980000	desert_11 (GS120)	83.48

<u>Edición CRISPR-Cas</u>

[00612] Un ejemplo eficaz de edición de genes es el enfoque CRISPR-Cas (por ejemplo, CRISPR-Cas9). Este enfoque incorpora el uso de un polinucleótido guía (por ejemplo, ácido ribonucleico guía o ARNg) y una endonucleasa cas (por ejemplo, endonucleasa Cas9).

[00613] Como se usa en la presente, un polipéptido denominado «endonucleasa Cas» o que tiene «actividad endonucleasa Cas» se refiere a un polipéptido relacionado con CRISPR (Cas)

codificado por un gen Cas, donde un polipéptido Cas es una secuencia de ADN diana que puede escindirse cuando está operativamente unido a uno o más polinucleótidos guía (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8,697,359). También se incluyen en esta definición variantes de la endonucleasa Cas que conservan la actividad de la endonucleasa dependiente del polinucleótido guía. La endonucleasa Cas utilizada en el método de inserción de ADN del donante detallado en la presente es una endonucleasa que introduce roturas de doble cadena en el ADN en el sitio diana (por ejemplo, dentro del locus diana o en el sitio de puerto seguro).

[00614] Tal como se utiliza en la presente, la expresión «polinucleótido guía» se refiere a una secuencia de polinucleótidos capaz de formar complejos con una endonucleasa Cas y permitir que la endonucleasa Cas reconozca y escinda un sitio diana de ADN. El polinucleótido guía puede ser una molécula única o una molécula doble. La secuencia de polinucleótidos guía puede ser una secuencia de ARN, una secuencia de ADN o una combinación de estas (secuencia de combinación de ARN-ADN). Un polinucleótido guía que comprende solo ácido ribonucleico también se conoce como «ARN guía». En algunas modalidades, se inserta una construcción donante de polinucleótidos en un locus de puerto seguro usando un ARN guía (ARNg) en combinación con una endonucleasa cas (por ejemplo, endonucleasa Cas9).

[00615] El polinucleótido guía incluye un primer dominio de secuencia de nucleótidos (también denominado dominio de direccionamiento variable o dominio VT) que es complementario a una secuencia de nucleótidos en el ADN diana, y un segundo nucleótido que interactúa con un polipéptido de endonucleasa Cas. Puede ser una molécula doble (también denominada polinucleótido guía bicatenario) que comprende un dominio de secuencia (denominado dominio de reconocimiento de endonucleasa Cas o dominio CER). El dominio CER de este polinucleótido guía de doble molécula comprende dos moléculas separadas que se hibridan a lo largo de la región complementaria. Las dos moléculas separadas pueden ser secuencias de ARN, secuencias de ADN y/o secuencias de combinación de ARN-ADN.

[00616] La edición del genoma mediante enfoques CRISPR-Cas se basa en la reparación de roturas de doble cadena (DSB) del ADN específicas del sitio inducidas por la endonucleasa Cas guiada por ARN (p. ej., endonucleasa Cas 9). La reparación dirigida por homología (HDR) de estos DSB permite la edición precisa del genoma mediante la introducción de cambios genómicos definidos, incluidas sustituciones de bases, inserciones y eliminaciones de secuencias. La edición del genoma CRISPR/Cas9 convencional basada en HDR implica la

transfección de células con Cas9, ARNg y ADN del donante que contienen brazos homólogos que coinciden con el locus genómico de interés.

[00617] HITI (inserción dirigida independiente de la homología) utiliza una estrategia independiente de homología basada en la unión de extremos no homólogos (NHEJ) y el método puede ser más eficiente que HDR. Los ARN guía (ARNg) se dirigen al sitio de inserción. Para HITI, los plásmidos donantes carecen de brazos de homología y la reparación de DSB no se produce a través de la vía HDR. La construcción de polinucleótido donante puede diseñarse para incluir sitios de escisión de Cas9 que flanquean el gen o secuencia que se va a insertar. Esto da como resultado la escisión de Cas9 tanto en el plásmido donante como en la secuencia diana genómica. Tanto la diana como el donante tienen extremos romos y la vía NHEJ utiliza el plásmido de ADN del donante linealizado, lo que resulta en la integración en el sitio DSB genómico. (Véase, por ejemplo, Suzuki, K., et ál. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. Nature, 540(7631), 144-149, cuyas divulgaciones pertinentes se incorporan a la presente en su totalidad).

[00618] Los expertos en la técnica conocen métodos para realizar la edición de genes utilizando enfoques CRISPR-Cas. (Véanse, por ejemplo, las solicitudes estadounidenses n.° US16/312,676, US15/303,722 y US15/628,533, cuyas divulgaciones se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad). Además, los usos de endonucleasas para insertar transgenes en loci de puerto seguro se describen, por ejemplo, en la solicitud estadounidense n.º 13/036,343, cuyas divulgaciones se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad.

[00619] Los ARN guía y/o ARNm (o ADN) que codifican una endonucleasa pueden unirse químicamente a uno o más restos o conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o absorción celular del oligonucleótido. Los ejemplos no taxativos de dichos restos incluyen restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, un tiocolesterol, una cadena alifática (por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, ácido adamantano acético, un resto palmitilo y un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-t-oxicolesterol. Véase la publicación de patente estadounidense n.º 20180127786, cuya divulgación se incorpora a la presente en su totalidad

mediante esta referencia.

Aplicaciones terapéuticas

[00620] Para aplicaciones terapéuticas, las células modificadas genéticamente, sus poblaciones o sus composiciones se administran a un sujeto, generalmente un mamífero, generalmente un ser humano, en una cantidad eficaz. Las células modificadas genéticamente pueden administrarse a un sujeto mediante infusión (por ejemplo, infusión continua durante un período de tiempo) u otros modos de administración conocidos por los expertos en la técnica.

[00621] Las células modificadas genéticamente proporcionadas en la presente no solo encuentran uso en terapia génica sino también en usos no farmacéuticos tales como, por ejemplo, producción de modelos animales y producción de líneas celulares recombinantes que expresan una proteína de interés.

[00622] Las células modificadas genéticamente de la presente divulgación pueden ser cualquier célula, generalmente una célula de mamífero, generalmente una célula humana, que haya sido modificada mediante la integración de un transgén en un locus de puerto seguro descrito en la presente. Se proporcionan células ilustrativas en la sección Células recombinantes.

[00623] Las células manipuladas genéticamente, composiciones y métodos de la presente divulgación son útiles para aplicaciones terapéuticas tales como la terapia con células CAR T y la terapia con células TCR T. En algunas modalidades, la inserción de una secuencia que codifica un transgén dentro de un locus de puerto seguro mantiene la expresión de TCR en relación con los casos en los que no hay inserción y permite la expresión del transgén mientras se mantiene la función de TCR.

[00624] En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto que necesita tratamiento administrando al sujeto una composición que comprende cualquiera de las células modificadas genéticamente descritas en la presente. En algunas modalidades, la administración de la composición de la célula modificada genéticamente da como resultado un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. Ese efecto puede ser la curación parcial o completa de la enfermedad y/o los efectos adversos resultantes de la enfermedad. En algunas modalidades, el tratamiento abarca cualquier tratamiento de una enfermedad en un sujeto (por ejemplo, mamífero, por ejemplo, humano). Además, el tratamiento puede estabilizar o reducir síntomas clínicos indeseables en sujetos (por ejemplo,

pacientes). Las células proporcionadas en la presente, poblaciones de estas, o composiciones de estas, pueden administrarse durante o después de la aparición de la enfermedad.

[00625] En determinadas modalidades, el sujeto tiene una enfermedad, afección y/o lesión que puede tratarse y/o mejorar mediante terapia celular. En algunas modalidades, el sujeto que necesita terapia celular es un sujeto que tiene una lesión, enfermedad o afección, lo que provoca la terapia celular (por ejemplo, terapia en la que se administra material celular al sujeto). Sin embargo, se contempla que es posible tratar, mejorar y/o reducir la gravedad de al menos un síntoma asociado con la lesión, enfermedad o afección.

Método de administración

[0100] Se puede administrar una cantidad eficaz de la célula inmunitaria que comprende el sistema para el tratamiento del cáncer. La dosis apropiada de la célula inmunitaria que comprende el sistema puede determinarse basándose en el tipo de cáncer que se va a tratar, el tipo de célula inmunitaria que comprende el sistema, la gravedad y el curso del cáncer, la condición clínica del individuo, la historia clínica del individuo y la respuesta al tratamiento, y el criterio del médico tratante.

Composiciones farmacéuticas

[00626] Las células recombinantes manipuladas genéticamente proporcionadas en la presente se pueden administrar como parte de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además de una o más de las células recombinantes, un excipiente, portador, amortiguador, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración, por ejemplo, vía oral, intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraperitoneal. La composición farmacéutica puede comprender uno o más excipientes farmacéuticos. Puede usarse cualquier excipiente farmacéutico adecuado, y un experto en la técnica es capaz de seleccionar excipientes farmacéuticos adecuados. Por consiguiente, los excipientes farmacéuticos proporcionados a continuación pretenden ser ilustrativos y no taxativos. Excipientes farmacéuticos adicionales incluyen, por ejemplo, los descritos en *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Rowe *et ál.* (Eds.) 6ª Ed. (2009), incorporado mediante referencia en su totalidad.

[00627] En la presente se contemplan diversos modos de administración de los agentes

terapéuticos adicionales. En algunas modalidades, se administra el agente terapéutico adicional mediante cualquier modo de administración adecuado.

[00628] Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente, en función de la afección que se va a tratar.

Kits y artículos de fabricación

[00629] La presente solicitud proporciona kits que comprenden uno cualquiera o más de los sistemas o composiciones celulares descritos en la presente junto con instrucciones de uso. Las instrucciones de uso pueden estar presentes en los kits como un prospecto, en el etiquetado del contenedor del kit o de sus componentes, o pueden estar en formato digital (por ejemplo, en un CD-ROM, a través de un enlace en Internet). Un kit puede incluir uno o más de un ácido nucleico dirigido al genoma, un polinucleótido que codifica un ácido nucleico dirigido al genoma, un polipéptido dirigido al sitio y/o un polinucleótido que codifica un polipéptido dirigido al sitio. También se contemplan componentes adicionales dentro de los kits, por ejemplo, amortiguador (tal como amortiguador de reconstitución, amortiguador estabilizante, amortiguador de dilución) y/o uno o más vectores de control.

[0101] En algunas modalidades, los kits contienen además un componente seleccionado de cualquiera de anticuerpos secundarios, reactivos para análisis inmunohistoquímicos, excipientes farmacéuticamente aceptables y manual de instrucciones y cualquier combinación de estos. En una modalidad específica, el kit comprende una composición farmacéutica que comprende una cualquiera o más de las composiciones de anticuerpos descritas en la presente, con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

[0102] La presente solicitud también proporciona artículos de fabricación que comprenden cualquiera de las composiciones o kits de anticuerpos descritos en la presente. Ejemplos de un artículo de fabricación incluyen viales (incluidos los viales sellados).

Modalidades adicionales

[00630] **Modalidad 1** Uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican:

un primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador;

un segundo polipéptido quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR); y

al menos una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde al menos una secuencia de ácido nucleico comprende uno o más de: (1) una primera secuencia

de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica el receptor de muerte de la superficie celular Fas humano (FAS) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, (2) una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica la proteína tirosina fosfatasa no receptora de tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; y (3) una tercera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la Caja de Grupo de Alta Movilidad asociada a la selección de timocitos humanos (TOX) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 2 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 1, donde el receptor cebador comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina de células germinales (ALPG/P).

Modalidad 3 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 2, donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,

CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,

CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, y

CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6.

Modalidad 4 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 3, donde el CAR comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la mesotelina (MSLN), y donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

Modalidad 5 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 4, donde al menos una secuencia de ácido nucleico comprende cada uno de: (1) la primera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39; y (2) la segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

Modalidad 6 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 1-3, donde el CAR comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN).

Modalidad 7 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 6, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

Modalidad 8 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 6, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

Modalidad 9 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican:

un primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a fosfatasa alcalina placentaria/células germinales (ALPG/P), donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena

ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,

CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,

CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, y

CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6;

un segundo polipéptido quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR);

una primera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y

una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 10 Uno o más ácido(s) nucleico(s) recombinante(s) de cualquiera de las modalidades 3-9, donde la primera secuencia de cadena VH del dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

Modalidad 11 Uno o más ácido(s) nucleico(s) recombinante(s) de cualquiera de las modalidades 3-10, donde la primera secuencia de cadena VL del dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.

Modalidad 12 Uno o más ácido(s) nucleico(s) recombinante(s) de cualquiera de las modalidades 3-11, donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

Modalidad 13 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 9-12, donde el CAR comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN).

Modalidad 14 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 13, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

Modalidad 15 Uno o más ácido(s) nucleico(s) recombinante(s) de cualquiera de las modalidades 4-8 y 13-14, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

Modalidad 16 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 13, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

Modalidad 17 Uno o más ácido(s) nucleico(s) recombinante(s) de cualquiera de las modalidades 4-8, 13 y 16, donde la segunda secuencia de cadena VHH de dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

Modalidad 18 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1 a 17, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

Modalidad 19 El ácido nucleico recombinante de una cualquiera de las modalidades 1 a 17, donde el ácido nucleico recombinante comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 168, 167 o 166.

Modalidad 20 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1 a 17, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 21 Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39.

Modalidad 22 Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica la proteína tirosina fosfatasa humana no receptora de tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

Modalidad 23 Un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la caja de grupo de alta movilidad asociada a la selección de timocitos humanos (TOX) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 24 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39 y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

Modalidad 25 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39 y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 26 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1 a 25, donde la primera y segunda secuencias de ácido nucleico tienen al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud.

Modalidad 27 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1 a 26, donde el primer y segundo ácidos nucleicos son un ARN de horquilla corto (ARNhc), un ARN de interferencia pequeño (ARNip), un ARN bicatenario (ARNbc) o un oligonucleótido antisentido.

Modalidad 28 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 27, donde el primer y segundo ácidos nucleicos son ARNhc.

Modalidad 29 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-28, donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que

consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42-71.

Modalidad 30 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 29, donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49.

Modalidad 31 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-30, donde el primer ácido nucleico reduce la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

Modalidad 32 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-31, donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72-97.

Modalidad 33 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 32, donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

Modalidad 34 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-33, donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71; y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72 a 97.

Modalidad 35 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-34, donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49 y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

Modalidad 36 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-35, donde el segundo ácido nucleico reduce la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

Modalidad 37 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-31, donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98-125.

Modalidad 38 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 37, donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104.

Modalidad 39 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-31 o 37-38,

donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71; y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98 a 125.

Modalidad 40 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 39, donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49 y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104.

Modalidad 41 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-31 o 37-40, donde el segundo ácido nucleico reduce la expresión de TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

Modalidad 42 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-41, donde la primera, segunda y/o tercera secuencia de ácido nucleico está codificada en al menos una región de intrón del ácido nucleico recombinante.

Modalidad 43 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican:

un primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador,

un segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio único que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12; y

una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y

una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 44 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 43, donde la secuencia de la cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

Modalidad 45 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican:

un primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador,

un segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16; y

una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y

una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 46 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 45, donde la VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

Modalidad 47 Uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican:

un primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina de células germinales (ALPG/P); y

un segundo polipéptido quimérico comprende un CAR que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN);

una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y

una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 48 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 43-47, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

Modalidad 49 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 43-48, donde el ácido nucleico recombinante comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 168, 167 o 166.

Modalidad 50 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 43-47, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

Modalidad 51 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 43 a 50, donde la primera y segunda secuencias de ácido nucleico tienen al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud.

Modalidad 52 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 43 a 51, donde el primer y segundo ácidos nucleicos son un ARN de horquilla corto (ARNhc), un ARN de interferencia pequeño (ARNip), un ARN bicatenario (ARNbc) o un oligonucleótido

antisentido.

Modalidad 53 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 52, donde el primer y segundo ácidos nucleicos son ARNhc.

Modalidad 54 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 43-53, donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42-71.

Modalidad 55 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 54, donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49.

Modalidad 56 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 43-55, donde el primer ácido nucleico reduce la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

Modalidad 57 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 43-56, donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72-97.

modalidad 58 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 57, donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

Modalidad 59 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 43-58, donde el segundo ácido nucleico reduce la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

Modalidad 60 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 43-56, donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98-125.

Modalidad 61 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 60, donde la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104.

Modalidad 62 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 43-56, 60 o 61, donde el segundo ácido nucleico reduce la expresión de TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

Modalidad 63 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 43-62, donde

la primera, segunda y/o tercera secuencia de ácido nucleico está codificada en al menos una región de intrón del ácido nucleico recombinante.

Modalidad 64 El ácido nucleico recombinante de las modalidades 1-63, donde el receptor cebador comprende, desde el extremo N al extremo C,

el primer dominio de unión al antígeno extracelular;

un primer dominio transmembrana que comprende uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando;

y un dominio intracelular que comprende un efector transcripcional humano o humanizado, donde la unión de ALPG/P por el primer dominio de unión al antígeno extracelular da como resultado la escisión en uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando.

Modalidad 65 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 64, donde el receptor cebador comprende además un primer dominio bisagra colocado entre el primer dominio de unión al antígeno extracelular y el primer dominio transmembrana.

Modalidad 66 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 65, donde el primer dominio bisagra comprende un dominio bisagra CD8α o un dominio bisagra CD8α truncado.

Modalidad 67 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 66, donde la primera bisagra comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 18.

Modalidad 68 El o los ácidos nucleicos recombinantes de las modalidades 1-67, donde el primer dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana Notch1.

Modalidad 69 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 68, donde el primer dominio transmembrana comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 19.

Modalidad 70 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 64-69, donde el dominio intracelular comprende un dominio HNF1a/p65 o un dominio Gal4/VP64.

Modalidad 71 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 70, donde el dominio intracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 23.

Modalidad 72 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 1-71, donde el receptor cebador comprende además una secuencia de parada de transferencia entre el primer dominio transmembrana y el dominio intracelular.

Modalidad 73 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 72, donde la secuencia de parada de transferencia comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 20.

Modalidad 74 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 1-73, donde el receptor cebador comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 24.

Modalidad 75 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 1 a 74, donde el CAR comprende, desde el extremo N al extremo C,

un segundo dominio de unión al antígeno extracelular;

un segundo dominio transmembrana;

un dominio coestimulador intracelular; y

un dominio de activación intracelular.

Modalidad 76 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 75, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a la mesotelina (MSLN), donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

Modalidad 77 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 76, donde la secuencia de la cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

Modalidad 78 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 75, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a la mesotelina (MSLN), donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

Modalidad 79 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 78, donde la secuencia de la cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

Modalidad 80 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 1-79, donde el CAR comprende un segundo dominio bisagra.

Modalidad 81 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 80, donde el segundo

dominio bisagra comprende un dominio bisagra CD8α o un dominio bisagra CD8α truncado.

Modalidad 82 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 75-81, donde el segundo dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana CD8α.

Modalidad 83 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 75-82, donde el dominio coestimulador intracelular comprende un dominio 4-1BB.

Modalidad 84 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 75-83, donde el dominio de activación intracelular comprende un dominio CD3ζ.

Modalidad 85 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 1-84, donde el CAR comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 30 o 31.

Modalidad 86 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 1-72, donde el receptor cebador y el CAR son capaces de unirse a una única célula diana si la célula diana expresa cada uno de ALPG/P y MSLN.

Modalidad 87 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 86, donde la célula diana es una célula humana.

Modalidad 88 El o los ácidos nucleicos recombinantes de la modalidad 86 u 87, donde la célula diana es una célula cancerosa.

Modalidad 89 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 88, donde la célula cancerosa es una célula cancerosa sólida o una célula cancerosa líquida.

Modalidad 90 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 88-89, donde la célula cancerosa es cáncer de ovario, cáncer de Falopio, cáncer peritoneal primario, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer de cuello uterino o cáncer de páncreas.

Modalidad 91 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 1-90, donde el ácido nucleico recombinante comprende dos o más fragmentos de ácido nucleico.

Modalidad 92 El o los ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 1-91, donde el ácido nucleico recombinante comprende además un promotor inducible unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el CAR.

Modalidad 93 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-92, donde el ácido nucleico recombinante comprende además un primer promotor constitutivo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

Modalidad 94 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades1-93, donde

el ácido nucleico recombinante comprende además un promotor inducible enlazado operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico y un promotor constitutivo enlazado operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

Modalidad 95 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-94, donde el ácido nucleico recombinante comprende además un segundo promotor constitutivo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario al FAS humano.

Modalidad 96 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-94, donde el ácido nucleico recombinante comprende además un segundo promotor constitutivo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo ácido nucleico complementario a PTPN2 o TOX humano.

Modalidad 97 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-96, donde el ácido nucleico recombinante comprende además un segundo promotor constitutivo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario a FAS humano o el segundo ácido nucleico complementario a PTPN2 o TOX humano.

Modalidad 98 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-97, donde el ácido nucleico recombinante comprende, en una dirección de 5' a 3',

el primer promotor constitutivo;

la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador;

el segundo promotor constitutivo;

la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario a FAS humano, PTPN2 humano o TOX humano;

el promotor inducible; y

la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

Modalidad 99 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-97, donde el ácido nucleico recombinante comprende, en una dirección de 5' a 3',

el primer promotor constitutivo;

la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador;

el segundo promotor constitutivo;

la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario a FAS humano;

la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo primer ácido nucleico complementario a PTPN2 o TOX humano;

el promotor inducible; y

la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

Modalidad 100 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-97, donde el ácido nucleico recombinante comprende, en una dirección de 5' a 3',

el promotor inducible;

la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico;

el segundo promotor constitutivo;

la secuencia de nucleótidos que codifica el primer ácido nucleico complementario a FAS humano;

la secuencia de nucleótidos que codifica el segundo primer ácido nucleico complementario a PTPN2 o TOX humano;

el primer promotor constitutivo; y

la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

Modalidad 101 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-100, donde la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 36.

Modalidad 102 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-101, donde la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 37 o 38.

Modalidad 103 El ácido nucleico recombinante de la modalidad de cualquiera de las modalidades 1-102, donde el ácido nucleico recombinante comprende además un brazo de reparación dirigido por homología 5' y un brazo de reparación dirigido por homología 3' complementario a un sitio de inserción en un cromosoma de la célula hospedadora.

Modalidad 104 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-103, donde el ácido nucleico recombinante comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido 2A autoescindible (P2A).

Modalidad 105 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-104,

donde P2A está en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

Modalidad 106 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-104, donde P2A está en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador.

Modalidad 107 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-106, donde el ácido nucleico recombinante comprende además un elemento regulador postraduccional (WPRE) del virus de la hepatitis de la marmota.

Modalidad 108 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 107, donde el WPRE está en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico y en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador o donde el WPRE está en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor cebador y en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el receptor de antígeno quimérico.

Modalidad 109 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-107, donde el ácido nucleico recombinante comprende además un elemento poliA de SV40.

Modalidad 110 El ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1 a 109, donde el ácido nucleico se incorpora en un casete de expresión o un vector de expresión.

Modalidad 111 El ácido nucleico recombinante de la modalidad 110, donde el vector de expresión es un vector no viral.

Modalidad 112 Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-111.

Modalidad 113 El vector de la modalidad 112, donde los extremos 5' y 3' del ácido nucleico recombinante comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en un genoma de una célula primaria.

Modalidad 114 El vector de la modalidad 113, donde el sitio de inserción está ubicado en un locus del receptor alfa constante de células T (TRAC) o un locus de puerto seguro genómico (GSH).

Modalidad 115 El vector de la modalidad 114, donde el locus GHS es un locus GS94.

Modalidad 116 Un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este que se une a fosfatasa alcalina de células placentarias/germinales (ALPG/P) que comprende una secuencia

de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,

CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,

CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5; y

CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6.

Modalidad 117 El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este de la modalidad 116, donde la secuencia de la cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

Modalidad 118 El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este de la Modalidad 116 o 117, donde la VL comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.

Modalidad 119 El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno de este de cualquiera de las modalidades 116-118, donde el dominio extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

Modalidad 120 Un receptor cebador que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a fosfatasa alcalina de células placentarias/germinales (ALPG/P), un dominio transmembrana que comprende uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando; y un dominio intracelular que comprende un efector transcripcional humano o humanizado, donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y un secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,

CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,

CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5; y

CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6.

Modalidad 121 El receptor cebador de la modalidad 120, donde la secuencia de la cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

Modalidad 122 El receptor cebador de la modalidad 120 o 121, donde la VL comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.

Modalidad 123 El receptor cebador de cualquiera de las modalidades 120-122, donde el dominio extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

Modalidad 124 Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

Modalidad 125 El receptor de antígeno quimérico de la modalidad 124, donde la secuencia de la cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

Modalidad 126 Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

Modalidad 127 El receptor de antígeno quimérico de la modalidad 126, donde la secuencia de la cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

Modalidad 128 Un sistema que comprende un primer polipéptido quimérico y un segundo polipéptido quimérico, donde

el primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a fosfatasa alcalina

placentaria/células germinales (ALPG/P), donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,

CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,

CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, y

CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6; y

el segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR).

Modalidad 129 El sistema de la modalidad 128, donde la secuencia de la cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

Modalidad 130 El sistema de la modalidad 128 o 129, donde la secuencia de la cadena VL comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.

Modalidad 131 El sistema de la modalidad 128, donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

Modalidad 132 El sistema de la modalidad 128, donde el CAR comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN).

Modalidad 133 El sistema de la modalidad 132, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

Modalidad 134 El sistema de la modalidad 133, donde el VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

Modalidad 135 El sistema de la modalidad 132, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de

cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

Modalidad 136 El sistema de la modalidad 135, donde la secuencia de la cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

Modalidad 137 Un sistema que comprende un primer polipéptido quimérico y un segundo polipéptido quimérico, donde

el primer polipéptido quimérico que comprende un receptor de cebado, y

el segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio único que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

Modalidad 138 El sistema de la modalidad 137, donde la secuencia de la cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

Modalidad 139 Un sistema que comprende un primer polipéptido quimérico y un segundo polipéptido quimérico, donde

el primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador, y

el segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

Modalidad 140 El sistema de la modalidad 138, donde el VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

Modalidad 141 Un sistema que comprende un primer polipéptido quimérico y un segundo polipéptido quimérico, donde

el primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina de células germinales (ALPG/P); y

el segundo polipéptido quimérico comprende un CAR que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN);

Modalidad 142 El sistema de cualquiera de las modalidades 128-141, donde el receptor cebador comprende, desde el extremo N hasta el extremo C,

el primer dominio de unión al antígeno extracelular;

un primer dominio transmembrana que comprende uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando; y

un dominio intracelular que comprende un efector transcripcional humano o humanizado, donde la unión de ALPG/P por el primer dominio de unión al antígeno extracelular da como resultado la escisión en uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando.

Modalidad 143 El sistema de la reivindicación 142, donde el receptor cebador comprende además un primer dominio bisagra colocado entre el primer dominio de unión al antígeno extracelular y el primer dominio transmembrana.

Modalidad 144 El sistema de la modalidad 142, donde el primer dominio bisagra comprende un dominio bisagra CD8α o un dominio bisagra CD8α truncado.

Modalidad 145 El sistema de la modalidad 144, donde la primera bisagra comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 18.

Modalidad 146 El sistema de cualquiera de las modalidades142-145, donde el primer dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana Notch1.

Modalidad 147 El sistema de la modalidad 146, donde el primer dominio transmembrana comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 19.

Modalidad 148 El sistema de cualquiera de las modalidades 142-147, donde el dominio intracelular comprende un dominio HNF1a/p65 o un dominio Gal4/VP64.

Modalidad 149 El sistema de la modalidad 148, donde el dominio intracelular comprende la

secuencia establecida en la SEQ ID NO: 23.

Modalidad 150 El sistema de cualquiera de las modalidades 128-149, donde el receptor cebador comprende además una secuencia de parada de transferencia entre el primer dominio transmembrana y el dominio intracelular.

Modalidad 151 El sistema de la modalidad 150, donde la secuencia de parada de transferencia comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 20.

Modalidad 152 El sistema de cualquiera de las modalidades 128-151, donde el receptor cebador comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 24.

Modalidad 153 El sistema de cualquiera de las modalidades 128-152, donde el CAR comprende, desde el extremo N al extremo C,

un segundo dominio de unión al antígeno extracelular;

un segundo dominio transmembrana;

un dominio coestimulador intracelular; y

un dominio de activación intracelular.

Modalidad 154 El sistema de la modalidad 153, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a la mesotelina (MSLN), donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

Modalidad 155 El sistema de la modalidad 154, donde la secuencia de la cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

Modalidad 156 El sistema de la modalidad 153, donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a la mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

Modalidad 157 El receptor de antígeno quimérico de la modalidad 156, donde la secuencia de la cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

modalidad 158 El sistema de cualquiera de las modalidades 128-157, donde el CAR comprende un segundo dominio bisagra.

Modalidad 159 El sistema de la modalidad 158, donde el primer dominio bisagra comprende un dominio bisagra CD8α o un dominio bisagra CD8α truncado.

Modalidad 160 El sistema de cualquiera de las modalidades 153-159, donde el segundo dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana CD8α.

Modalidad 161 El sistema de cualquiera de las modalidades 153-160, donde el dominio coestimulador intracelular comprende un dominio 4-1BB.

Modalidad 162 El sistema de cualquiera de las modalidades 153-161, donde el dominio de activación intracelular comprende un dominio CD3ζ.

Modalidad 163 El sistema de cualquiera de las modalidades 128-162, donde el CAR comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 30 o 31.

Modalidad 164 El sistema de cualquiera de las modalidades 128-163, donde el receptor cebador y el CAR son capaces de unirse a una misma célula diana si la célula diana expresa ALPG/P y MSLN.

Modalidad 165 El sistema de la modalidad 164, donde la célula diana es una célula humana.

Modalidad 166 El sistema de la modalidad 164 o 165, donde la célula diana es una célula cancerosa.

Modalidad 167 El sistema de cualquiera de las modalidades 166, donde la célula cancerosa es una célula cancerosa sólida o una célula cancerosa líquida.

Modalidad 168 El sistema de las modalidades 166 o 167, donde la célula cancerosa es cáncer de ovario, cáncer de Falopio, cáncer peritoneal primario, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer de cuello uterino o cáncer de páncreas.

Modalidad 169 Una célula inmunitaria que comprende:

al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes de cualquiera de las modalidades 1 a 111; y/o

el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, receptor cebador, CAR o sistema de cualquiera de las modalidades 116-168; y/o

el vector de cualquiera de las modalidades 112-114.

Modalidad 170 La célula de la modalidad 169, donde la célula inmunitaria es una célula inmunitaria humana primaria.

Modalidad 171 La célula de la modalidad 170, donde la célula inmunitaria es una célula inmunitaria humana primaria es una célula inmunitaria autóloga.

Modalidad 172 La célula de cualquiera de las modalidades 169-171, donde la célula inmunitaria primaria es una célula citolítica natural (NK), una célula T, una célula T CD8+, una célula T CD4+, una célula T primaria o un progenitor de célula T.

Modalidad 173 La célula de cualquiera de las modalidades 169-172, donde la célula inmunitaria primaria es una célula T primaria.

Modalidad 174 La célula de cualquiera de las modalidades 169-173, donde la célula inmunitaria primaria es una célula T humana primaria.

Modalidad 175 La célula de cualquiera de las modalidades 169-174, donde la célula inmunitaria primaria está libre de virus.

Modalidad 176 La célula de cualquiera de las modalidades 169-174, donde la célula inmunitaria es una célula inmunitaria autóloga.

Modalidad 177 La célula de cualquiera de las modalidades 169-174, donde la célula inmunitaria es una célula inmunitaria alogénica.

Modalidad 178 Una célula inmunitaria primaria que comprende al menos un ácido nucleico recombinante que comprende

un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a ALPG/P;

un receptor de antígeno quimérico que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a MSLN;

una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es:

complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o

complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que

comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41;

donde el ácido nucleico recombinante se inserta en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria primaria no comprende un vector viral para introducir el ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria primaria.

Modalidad 179 Una célula inmunitaria primaria que comprende al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82, insertado en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria primaria no comprende un vector viral para introducir uno o más ácidos nucleicos recombinantes en la célula inmunitaria primaria.

Modalidad 180 Una célula inmunitaria primaria que comprende al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104, insertado en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria primaria no comprende un vector viral para introducir el ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria primaria.

Modalidad 181 Una célula primaria viable, libre de virus que comprende un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido nucleico recombinante, donde la RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, y donde el ácido nucleico recombinante codifica:

un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a ALPG/P;

un receptor de antígeno quimérico que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a MSLN;

una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es:

complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o

complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que

comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41; y

donde los extremos 5' y 3' del ácido nucleico recombinante comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

Modalidad 182 Una célula primaria viable, libre de virus, que comprende un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido(s) nucleico(s) recombinante(s), donde el RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82, y donde los extremos 5' y 3' de uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

Modalidad 183 Una célula primaria viable, libre de virus, que comprende un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido(s) nucleico(s) recombinante(s), donde el RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104, y donde los extremos 5' y 3' de uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

Modalidad 184 La célula de cualquiera de las modalidades 169-183, donde la célula comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 168, 167 o 166.

Modalidad 185 La célula de cualquiera de las modalidades 169-184, donde el primer ácido nucleico reduce la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico.

Modalidad 186 La célula de la modalidad 184, donde la expresión de FAS en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico.

Modalidad 187 La célula de cualquiera de las modalidades 169-186, donde el segundo ácido

nucleico reduce la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

Modalidad 188 La célula de la modalidad 187, donde la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

Modalidad 189 La célula de cualquiera de las modalidades 169-186, donde el segundo ácido nucleico reduce la expresión de TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

Modalidad 190 La célula de la modalidad 189, donde la expresión de TOX en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

Modalidad 191 La célula de cualquiera de las modalidades 184-190, donde la expresión de FAS, PTPN2 y/o TOX se determina mediante un ensayo de ácido nucleico o un ensayo de proteínas.

Modalidad 192 La célula de la modalidad 191, donde el ensayo de ácido nucleico comprende al menos uno de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), RT-qPCR, micromatriz, matriz de genes o RNAseq.

Modalidad 193 La célula de la modalidad 191, donde el ensayo de proteínas comprende al menos uno de inmunotransferencia, clasificación de células activadas por fluorescencia, citometría de flujo, clasificación de células activadas magnéticamente o separación celular basada en afinidad.

Modalidad 194 Una población de células que comprende una pluralidad de células inmunes de cualquiera de las modalidades 169-193.

Modalidad 195 Una composición farmacéutica que comprende la célula inmunitaria de cualquiera de las modalidades 169 a 193 o la población de células de la modalidad 194, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Modalidad 196 Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico

recombinante de una cualquiera de las modalidades 1-111 o el vector de cualquiera de las modalidades 112-114, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Modalidad 197 Un método para editar una célula inmunitaria, que comprende:

proporcionar un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido nucleico recombinante, donde la RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde el ácido nucleico recombinante comprende el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1 a 111, y donde los extremos 5' y 3' del ácido nucleico recombinante comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria;

introducir de forma no viral el complejo de RNP-ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria, donde el ARN guía se hibrida específicamente con una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde el dominio de nucleasa escinde la región diana para crear el sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria; y

editar la célula inmunitaria mediante la inserción del ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1 a 111 en el sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria.

Modalidad 198 El método de la modalidad 197, donde la introducción no viral comprende electroporación.

Modalidad 199 El método de la modalidad 197 o 198, donde el dominio de nucleasa comprende una endonucleasa asociada a CRISPR (Cas), opcionalmente una nucleasa Cas9.

Modalidad 200 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 199, donde la región diana del genoma de la célula es un locus del receptor alfa constante de células T (TRAC) o un locus de puerto seguro genómico (GSH).

Modalidad 201 El método de la modalidad 200, donde el locus de GSH es el locus GS94.

Modalidad 202 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 201, donde el ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico recombinante bicatenario o un ácido nucleico recombinante monocatenario.

Modalidad 203 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 202, donde el ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico recombinante lineal o un ácido nucleico recombinante circular, opcionalmente donde el ácido nucleico recombinante circular es un plásmido.

Modalidad 204 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 203, donde la célula inmunitaria es una célula inmunitaria humana primaria.

Modalidad 205 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 204, donde la célula inmunitaria es una célula inmunitaria alogénica.

Modalidad 206 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 204, donde la célula inmunitaria es una célula inmunitaria autóloga.

Modalidad 207 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 206, donde la célula inmunitaria primaria es una célula citolítica natural (NK), una célula T, una célula T CD8+, una célula T CD4+, una célula T primaria o un progenitor de célula T.

Modalidad 208 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 207, donde la célula inmunitaria es una célula T primaria.

Modalidad 209 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 208, donde la célula inmunitaria es una célula T humana primaria.

Modalidad 210 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 209, donde la célula inmunitaria está libre de virus.

Modalidad 211 El método de cualquiera de las modalidades 197 a 210, que comprende además obtener la célula inmunitaria de un paciente e introducir el ácido nucleico recombinante in vitro.

Modalidad 212 Un método para tratar una enfermedad en un sujeto que comprende administrar la célula inmunitaria de cualquiera de las modalidades 169-194 o la composición farmacéutica de las modalidades 195 o 196 al sujeto.

Modalidad 213 El método de la modalidad 212, donde la enfermedad es cáncer.

Modalidad 214 El método de la modalidad 213, donde el cáncer es un cáncer sólido o un cáncer líquido.

Modalidad 215 El método de la modalidad 213 o 214, donde el cáncer es cáncer de ovario, cáncer de Falopio, cáncer peritoneal primario, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer de cuello uterino o cáncer de páncreas.

Modalidad 216 El método de cualquiera de las modalidades 213-215, donde la administración de la célula inmunitaria mejora una respuesta inmunológica en el sujeto.

Modalidad 217 El método de la modalidad 216, donde la respuesta inmunológica mejorada es una respuesta inmunológica adaptativa.

Modalidad 218 El método de la modalidad 216, donde la respuesta inmunológica mejorada es una respuesta inmunológica innata.

Modalidad 219 El método de cualquiera de las modalidades 213-218, donde la respuesta inmunológica mejorada es una expresión aumentada de al menos una citocina o quimiocina.

Modalidad 220 El método de la modalidad 219, donde al menos una citocina o quimiocina es IL-2 o IFNγ.

Modalidad 221 El método de cualquiera de las modalidades 212 - 215, que comprende además administrar una inmunoterapia al sujeto simultáneamente con la célula inmunitaria o posteriormente a la célula inmunitaria.

Modalidad 222 Un método para inhibir una célula diana en un sujeto que comprende administrar la célula inmunitaria de cualquiera de las modalidades 169-194 al sujeto, donde la célula inmunitaria inhibe la célula diana.

Modalidad 223 El método de la modalidad 222, donde la célula diana expresa ALPG/P y MSLN.

Modalidad 224 El método de la modalidad 222 o 223, donde la célula diana es una célula cancerosa.

Modalidad 225 Un método para inducir la expresión de un receptor de antígeno quimérico con un receptor cebador en una célula inmunitaria que comprende:

obtener una célula inmunitaria que comprende

el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-111; y/o

el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, receptor cebador, CAR o sistema de cualquiera de las modalidades 116-168; y/o

el vector de cualquiera de las modalidades 112-114; y

poner en contacto la célula inmunitaria con una célula diana que expresa ALPG/P y MSLN, donde la unión del receptor cebador a ALPG/P en la célula diana induce la activación del receptor cebador y la expresión del receptor de antígeno quimérico.

Modalidad 226 Un método para modular la actividad de una célula inmunitaria que comprende:

obtener una célula inmunitaria que comprende

el ácido nucleico recombinante de cualquiera de las modalidades 1-111; y/o

el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, receptor cebador, CAR o sistema de

cualquiera de las modalidades 116-168; y/o

el vector de cualquiera de las modalidades 112-114; y

poner en contacto la célula inmunitaria con una célula diana que expresa ALPG/P y MSLN, donde la unión del receptor cebador a ALPG/P en la célula diana induce la activación del receptor cebador y la expresión del receptor de antígeno quimérico y donde la unión del receptor de antígeno quimérico a MSLN en la célula diana modula la actividad de la célula inmunitaria.

Modalidad 227 El método de la modalidad 226, donde la modulación de la actividad de las células inmunitarias comprende mejorar una respuesta inmunitaria.

Modalidad 228 El método de la modalidad 227, donde la respuesta inmunológica mejorada es una respuesta inmunológica adaptativa.

Modalidad 229 El método de la modalidad 227, donde la respuesta inmunológica mejorada es una respuesta inmunológica innata.

Modalidad 230 El método de cualquiera de las modalidades 226-229, donde la actividad de las células inmunitarias es una expresión aumentada de al menos una citocina o quimiocina.

Modalidad 231 El método de la modalidad 230, donde al menos una citocina o quimiocina es IL-2 o lFNγ.

Modalidad 232 El método de cualquiera de las modalidades 197-231, donde la expresión de FAS en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico.

Modalidad 233 El método de cualquiera de las modalidades 197-232, donde la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

Modalidad 234 El método de cualquiera de las modalidades 197-232, donde la expresión de TOX en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

Modalidad 235 El método de cualquiera de las modalidades 232-234, donde la expresión de FAS, PTPN2 y/o TOX en la célula inmunitaria se determina mediante un ensayo de ácido

nucleico o un ensayo de proteínas.

Modalidad 236 El método de la modalidad 235, donde el ensayo de ácido nucleico comprende al menos uno de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), RT-qPCR, micromatriz, matriz de genes o RNAseq.

Modalidad 237 El método de la modalidad 235, donde el ensayo de proteínas comprende al menos uno de inmunotransferencia, clasificación de células activadas por fluorescencia, citometría de flujo, clasificación de células activadas magnéticamente o separación celular basada en afinidad.

[00631] En un aspecto, en la presente se proporcionan receptores cebadores que comprenden un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a fosfatasa alcalina de células placentarias/germinales (ALPG/P), un dominio transmembrana que comprende uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando; y un dominio intracelular que comprende un efector transcripcional humano o humanizado, donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y un secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,

CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,

CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5; y

CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6.

[00632] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

[00633] En algunas modalidades, la VL comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.

[00634] En algunas modalidades, el dominio extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

[00635] En otro aspecto, se proporcionan en la presente receptores de antígeno quimérico (CAR) que comprenden un dominio de unión al antígeno extracelular que se une

específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

[00636] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

[00637] En otro aspecto, se proporcionan en la presente receptores de antígeno quimérico (CAR) que comprenden un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

[00638] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[00639] En otro aspecto, en la presente se proporcionan sistemas que comprenden un primer polipéptido quimérico y un segundo polipéptido quimérico, donde el primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a fosfatasa alcalina placentaria/células germinales (ALPG/P), donde el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2,

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3,

CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4,

CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, y

CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6; y

[00640] el segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR).

[00641] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

[00642] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VL comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 8.

[00643] En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9.

[00644] En algunas modalidades, el CAR comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN).

[00645] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

[00646] En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

[00647] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

[00648] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[00649] En otro aspecto, en la presente se proporcionan sistemas que comprenden un

primer polipéptido quimérico y un segundo polipéptido quimérico, donde:

el primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador, y

el segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio único que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

[00650] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[00651] En otro aspecto, en la presente se proporcionan sistemas que comprenden un primer polipéptido quimérico y un segundo polipéptido quimérico, donde:

el primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador, y

el segundo polipéptido quimérico comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN), donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

[00652] En algunas modalidades, la VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

[00653] En otro aspecto, en la presente se proporcionan sistemas que comprenden un primer polipéptido quimérico y un segundo polipéptido quimérico, donde:

el primer polipéptido quimérico comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina de células germinales (ALPG/P); y

el segundo polipéptido quimérico comprende un CAR que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN).

[00654] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende, desde el extremo N hasta el extremo C,

el primer dominio de unión al antígeno extracelular;

un primer dominio transmembrana que comprende uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando; y

un dominio intracelular que comprende un efector transcripcional humano o humanizado, donde la unión de ALPG/P por el primer dominio de unión al antígeno extracelular da como resultado la escisión en uno o más sitios de escisión proteolítica inducibles por ligando.

[00655] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende además un primer dominio bisagra colocado entre el primer dominio de unión al antígeno extracelular y el primer dominio transmembrana.

[00656] En algunas modalidades, el primer dominio bisagra comprende un dominio bisagra CD8α o un dominio bisagra CD8α truncado.

[00657] En algunas modalidades, la primera bisagra comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 18.

[00658] En algunas modalidades, el primer dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana Notch1.

[00659] En algunas modalidades, el primer dominio transmembrana comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 19.

[00660] En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende un dominio HNF1a/p65 o un dominio Gal4/VP64.

[00661] En algunas modalidades, el dominio intracelular comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 23.

[00662] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende además una secuencia de terminación de transferencia entre el primer dominio transmembrana y el dominio intracelular.

[00663] En algunas modalidades, la secuencia de terminación de transferencia comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 20.

[00664] En algunas modalidades, el receptor cebador comprende una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 24.

[00665] En algunas modalidades, el CAR comprende, desde el extremo N hasta el extremo C,

un segundo dominio de unión al antígeno extracelular;

un segundo dominio transmembrana;

un dominio coestimulador intracelular; y

un dominio de activación intracelular.

[00666] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a la mesotelina (MSLN), donde el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 10,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 11, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

[00667] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[00668] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular se une específicamente a la mesotelina (MSLN), donde el dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde:

CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14,

CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y

CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

[00669] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17.

[00670] En algunas modalidades, el CAR comprende un segundo dominio bisagra.

[00671] En algunas modalidades, el segundo dominio bisagra comprende un dominio bisagra CD8α o un dominio bisagra CD8α truncado.

[00672] En algunas modalidades, el segundo dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana CD8α.

[00673] En algunas modalidades, el dominio coestimulador intracelular comprende un

dominio 4-1BB.

[00674] En algunas modalidades, el dominio de activación intracelular comprende un dominio CD3ζ.

[00675] En algunas modalidades, el CAR comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 30 o 31.

[00676] En algunas modalidades, el receptor cebador y el CAR son capaces de unirse a una misma célula diana si la célula diana expresa ALPG/P y MSLN.

[00677] En algunas modalidades, la célula diana es una célula humana.

[00678] En algunas modalidades, la célula diana es una célula cancerosa.

[00679] En algunas modalidades, la célula cancerosa es una célula cancerosa sólida o una célula cancerosa líquida.

[00680] En algunas modalidades, la célula cancerosa es cáncer de ovario, cáncer de Falopio, cáncer peritoneal primario, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer de cuello uterino o cáncer de páncreas.

[00681] En otro aspecto, se proporcionan en la presente anticuerpos aislados o fragmentos de unión al antígeno de estos que se unen a mesotelina (MSLN), que comprenden un anticuerpo de dominio simple que comprende una secuencia de cadena pesada variable (VHH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 10, CDR-H2 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 11, y CDR-H3 comprende la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 12.

[00682] En algunas modalidades, la secuencia de cadena VHH comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13.

[00683] En un aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39.

[00684] En un aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica la proteína tirosina fosfatasa humana no receptora tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la

SEQ ID NO: 40.

[00685] En un aspecto, se proporcionan en la presente ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la caja de grupo de alta movilidad asociada a la selección de timocitos humanos (TOX) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00686] En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico tiene al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud.

[00687] En algunas modalidades, el ácido nucleico es un ARN en horquilla corta (ARNhc), un ARN interferente pequeño (ARNip), un ARN bicatenario (ARNdc) o un oligonucleótido antisentido.

[00688] En algunas modalidades, el ácido nucleico es ARNhc.

[00689] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71.

[00690] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49.

[00691] En algunas modalidades, el ácido nucleico reduce la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[00692] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72 a 97.

[00693] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

[00694] En algunas modalidades, el ácido nucleico reduce la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[00695] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98 a 125.

[00696] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104.

[00697] En algunas modalidades, el ácido nucleico reduce la expresión de TOX en la célula

inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el ácido nucleico.

[00698] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a un primer antígeno y una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a un segundo antígeno, donde el primer antígeno y el segundo antígeno son distintos.

[00699] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende, en una dirección de 5' a 3', el CAR; el ácido nucleico como se describe en la presente; y el receptor cebador.

[00700] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende, en una dirección de 5' a 3', el receptor cebador; el ácido nucleico como se describe en la presente; y el CAR.

[00701] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante comprende además un brazo de reparación dirigido por homología 5' y/o un brazo de reparación dirigido por homología 3' complementario a un sitio de inserción en un cromosoma de la célula hospedadora.

[00702] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende el brazo de reparación dirigido por homología 5' y el brazo de reparación dirigido por homología 3'.

[00703] En algunas modalidades, el ácido nucleico recombinante se incorpora en un casete de expresión o un vector de expresión.

[00704] En algunas modalidades, el casete de expresión o el vector de expresión comprende además un promotor constitutivo corriente arriba del ácido nucleico recombinante.

[00705] En un aspecto, se proporcionan en la presente uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39 y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[00706] En un aspecto, se proporcionan en la presente uno o más ácidos nucleicos

recombinantes que comprenden un primer ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39; y un segundo ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00707] En algunas modalidades, el primer y segundo ácidos nucleicos son un ARNhc, un ARNip, un ARNbc o un oligonucleótido antisentido.

[00708] En algunas modalidades, los primeros y segundos ácidos nucleicos son ARNhc.

[00709] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71.

[00710] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49.

[00711] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico reduce la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico.

[00712] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72 a 97.

[00713] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

[00714] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico reduce la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00715] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71; y el segundo ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72 a 97.

[00716] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende la secuencia

establecida en la SEQ ID NO: 49 y el segundo ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

[00717] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98 a 125.

[00718] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104.

[00719] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico reduce la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00720] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71; y el segundo ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98 a 125.

[00721] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49 y el segundo ácido nucleico comprende la secuencia establecida en las SEQ ID NO: 99 o 104.

[00722] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende además un brazo de reparación dirigido por homología 5' y/o un brazo de reparación dirigido por homología 3' complementario a un sitio de inserción en un cromosoma de la célula hospedadora.

[00723] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico comprende el brazo de reparación dirigido por homología 5' y/o el brazo de reparación dirigido por homología 3'.

[00724] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico están codificados en un único ácido nucleico.

[00725] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende el brazo de reparación dirigido por homología 5' y el segundo ácido nucleico comprende el brazo de reparación dirigido por homología 3'.

[00726] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico están codificados en distintos ácidos nucleicos.

[00727] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende además una secuencia de

nucleótidos que codifica un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a un primer antígeno y una secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a un segundo antígeno, donde el primer antígeno y el segundo antígeno son distintos.

[00728] En algunas modalidades, el ácido nucleico comprende, en una dirección de 5' a 3': el CAR; el primer ácido nucleico; el segundo ácido nucleico; y el receptor cebador.

[00729] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico se incorpora en un casete de expresión o un vector de expresión.

[00730] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico se incorpora en un casete de expresión o un vector de expresión.

[00731] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico se incorporan en un único casete de expresión o un único vector de expresión.

[00732] En algunas modalidades, el casete de expresión o el vector de expresión comprende además un promotor constitutivo corriente arriba del primer ácido nucleico y/o corriente arriba del segundo ácido nucleico.

[00733] En algunas modalidades, el vector de expresión es un vector no viral.

[00734] En un aspecto, en la presente se proporcionan vectores de expresión que comprenden uno o más ácidos nucleicos recombinantes descritos en la presente.

[00735] En algunas modalidades, el vector de expresión es un vector no viral.

[00736] En algunas modalidades, los extremos 5' y 3' de uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden una o más secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en un genoma de una célula primaria.

[00737] En algunas modalidades, el sitio de inserción está ubicado en un locus del receptor alfa constante de células T (TRAC) o en un locus de puerto seguro genómico (GSH).

[00738] En algunas modalidades, el locus de GSH es el locus GS94.

[00739] En un aspecto, se proporcionan en la presente células inmunitarias que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la

SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; o complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00740] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[00741] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00742] En un aspecto, se proporcionan en la presente células inmunitarias que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[00743] En un aspecto, se proporcionan en la presente células inmunitarias que comprenden una primera secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la primera secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, y una segunda secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde la segunda secuencia de ácido nucleico es complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica TOX humano que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00744] En algunas modalidades, el primer y segundo ácidos nucleicos son un ARNhc, un ARNip, un ARNbc o un oligonucleótido antisentido.

[00745] En algunas modalidades, los primeros y segundos ácidos nucleicos son ARNhc.

[00746] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende una secuencia

seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71.

[00747] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49.

[00748] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72 a 97.

[00749] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

[00750] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71; y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72 a 97.

[00751] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49 y el segundo ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

[00752] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98 a 125.

[00753] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104.

[00754] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71; y el segundo ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 98 a 125.

[00755] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y el segundo ácido nucleico comprende la secuencia establecida en las SEQ ID NO: 99 o 104.

[00756] En algunas modalidades, el primer ácido nucleico reduce la expresión de FAS en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico.

[00757] En algunas modalidades, la expresión de FAS en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico.

[00758] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico reduce la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00759] En algunas modalidades, la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00760] En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico reduce la expresión de TOX en la célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00761] En algunas modalidades, la expresión de TOX en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00762] En algunas modalidades, la expresión de FAS, PTPN2 y/o TOX se determina mediante un ensayo de ácido nucleico o un ensayo de proteínas.

[00763] En algunas modalidades, el ensayo de ácido nucleico comprende al menos uno de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), RT-qPCR, micromatriz, matriz de genes o RNAseq.

[00764] En algunas modalidades, el ensayo de proteínas comprende al menos uno de inmunotransferencia, clasificación de células activadas por fluorescencia, citometría de flujo, clasificación de células activadas magnéticamente o separación celular basada en afinidad.

[00765] En algunas modalidades, la célula comprende además un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a un primer antígeno y un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a un segundo antígeno.

[00766] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria humana primaria.

[00767] En algunas modalidades, la célula inmunitaria primaria es una célula citolítica natural (NK), una célula T citolítica natural (NKT), una célula T, una célula T γδ, una célula T CD8+, una célula T CD4+, una célula T primaria, un progenitor de célula T o una célula madre pluripotente inducida (iPSC).

[00768] En algunas modalidades, la célula inmunitaria primaria es una célula T primaria.

[00769] En algunas modalidades, la célula inmunitaria primaria es una célula T primaria humana.

[00770] En algunas modalidades, la célula inmunitaria está libre de virus.

[00771] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria autóloga.

[00772] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria alogénica.

[00773] En un aspecto, se proporcionan en la presente células inmunitarias primarias que comprenden al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82, insertado en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria primaria no comprende un vector viral para introducir uno o más ácidos nucleicos recombinantes en la célula inmunitaria primaria.

[00774] En un aspecto, se proporcionan en la presente células inmunitarias primarias que comprenden al menos uno o más ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104, insertado en una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde la célula inmunitaria primaria no comprende un vector viral para introducir el ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria primaria.

[00775] En un aspecto, se proporcionan en la presente células primarias viables, libres de virus, que comprenden un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido(s) nucleico(s) recombinante(s), donde el RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82, y donde los extremos 5' y 3' de uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden secuencias de nucleótidos que son

homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

[00776] En un aspecto, se proporcionan en la presente células primarias viables, libres de virus, que comprenden un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido(s) nucleico(s) recombinante(s), donde el RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden un primer ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49; y un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 99 o 104, y donde los extremos 5' y 3' de uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula primaria.

[00777] En algunas modalidades, la célula comprende además un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a un primer antígeno y un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a un segundo antígeno, donde el primer antígeno y el segundo antígeno son distintos.

[00778] En un aspecto, en la presente se proporciona una población de células que comprende una pluralidad de células inmunitarias descritas en la presente.

[00779] En un aspecto, se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas que comprenden la célula inmunitaria descrita en la presente o la población de células descrita en la presente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[00780] En un aspecto, se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas que comprenden el ácido nucleico recombinante como se describe en la presente, uno o más ácidos nucleicos recombinantes como se describe en la presente, o el vector como se describe en la presente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[00781] En un aspecto, se proporcionan en la presente métodos para editar una célula inmunitaria, que comprenden: proporcionar un complejo de ribonucleoproteína (RNP)-ácido nucleico recombinante, donde la RNP comprende un dominio de nucleasa y un ARN guía, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden uno o más ácidos nucleicos recombinantes descritos en la presente, y donde los extremos 5' y 3' de uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden secuencias de nucleótidos que son homólogas a

secuencias genómicas que flanquean un sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria; introducir de forma no viral el complejo de RNP-ácido nucleico recombinante en la célula inmunitaria, donde el ARN guía se hibrida específicamente con una región diana del genoma de la célula inmunitaria primaria, y donde el dominio de nucleasa escinde la región diana para crear el sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria; y editar la célula inmunitaria mediante la inserción de uno o más ácidos nucleicos recombinantes descritos en la presente en el sitio de inserción en el genoma de la célula inmunitaria.

[00782] En algunas modalidades, la introducción no viral comprende electroporación.

[00783] En algunas modalidades, el dominio de nucleasa comprende una endonucleasa asociada a CRISPR (Cas), opcionalmente una nucleasa Cas9.

[00784] En algunas modalidades, la región diana del genoma de la célula es un locus del receptor alfa constante de células T (TRAC) o un locus de puerto seguro genómico (GSH).

[00785] En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes son uno o más ácidos nucleicos recombinantes bicatenarios o uno o más ácidos nucleicos recombinantes monocatenarios.

[00786] En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes son uno o más ácidos nucleicos recombinantes lineales o uno o más ácidos nucleicos recombinantes circulares, opcionalmente donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes circulares son un plásmido.

[00787] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria humana primaria.

[00788] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria autóloga.

[00789] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula inmunitaria alogénica.

[00790] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula citolítica natural (NK), una célula T citolítica natural (NKT), una célula T, una célula T γδ, una célula T CD8+, una célula T CD4+, una célula T primaria, un progenitor de célula T o una célula madre pluripotente inducida (iPSC).

[00791] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula T primaria.

[00792] En algunas modalidades, la célula inmunitaria es una célula T humana primaria.

[00793] En algunas modalidades, la célula inmunitaria está libre de virus.

[00794] En algunas modalidades, el método comprende además obtener la célula

inmunitaria de un paciente e introducir el ácido nucleico recombinante in vitro.

[00795] En un aspecto, se proporcionan en la presente métodos para tratar una enfermedad en un sujeto que comprenden administrar las células inmunitarias divulgadas en la presente o la composición farmacéutica divulgada en la presente al sujeto.

[00796] En algunas modalidades, la enfermedad es cáncer.

[00797] En algunas modalidades, el cáncer es un cáncer sólido o un cáncer líquido.

[00798] En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de ovario, cáncer de Falopio, cáncer peritoneal primario, cáncer de útero, mesotelioma, cáncer de cuello uterino o cáncer de páncreas.

[00799] En algunas modalidades, la administración de la(s) célula(s) mejora una respuesta inmunitaria.

[00800] En algunas modalidades, la respuesta inmunológica potenciada es una respuesta inmunológica adaptativa.

[00801] En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria mejorada es una respuesta inmunitaria innata.

[00802] En un aspecto, se proporcionan en la presente métodos para mejorar una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprenden administrar las células inmunitarias divulgadas en la presente o la composición farmacéutica divulgada en la presente al sujeto.

[00803] En algunas modalidades, la respuesta inmunológica potenciada es una respuesta inmunológica adaptativa.

[00804] En algunas modalidades, la respuesta inmunitaria mejorada es una respuesta inmunitaria innata.

[00805] En algunas modalidades, la expresión de FAS en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el primer ácido nucleico.

[00806] En algunas modalidades, la expresión de PTPN2 en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00807] En algunas modalidades, la expresión de TOX en la célula inmunitaria se reduce en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula de control que no comprende el segundo ácido nucleico.

[00808] En algunas modalidades, la expresión de FAS, PTPN2 y/o TOX en la célula inmunitaria se determina mediante un ensayo de ácido nucleico o un ensayo de proteínas.

[00809] En algunas modalidades, el ensayo de ácido nucleico comprende al menos uno de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), RT-qPCR, micromatriz, matriz de genes o RNAseq.

[00810] En algunas modalidades, el ensayo de proteínas comprende al menos uno de inmunotransferencia, clasificación de células activadas por fluorescencia, citometría de flujo, clasificación de células activadas magnéticamente o separación celular basada en afinidad.

[00811] En algunas modalidades, el método comprende además administrar una inmunoterapia al sujeto simultáneamente con la célula inmunitaria o posteriormente a la célula inmunitaria.

[00812] En un aspecto, en la presente se proporcionan células modificadas, donde la célula está modificada para tener una expresión reducida de un gen FAS y/o una función reducida de un producto del gen FAS con respecto a una célula no modificada correspondiente, opcionalmente donde la célula modificada es una célula hematopoyética.

[00813] En algunas modalidades, la célula modificada se modifica adicionalmente para tener una expresión reducida de al menos un segundo gen y/o una función reducida de un producto de al menos un segundo gen con respecto a una célula no modificada correspondiente.

[00814] En un aspecto, se proporcionan en la presente células modificadas por ingeniería genética, donde la célula modificada por ingeniería genética se modifica para tener una expresión reducida de un gen FAS y/o una función reducida de un producto del gen FAS en relación con una célula modificada por ingeniería genética correspondiente, opcionalmente donde la célula modificada por ingeniería genética se diseña para expresar un receptor inmunitario heterólogo.

[00815] En algunas modalidades, la célula modificada genéticamente se modifica adicionalmente para tener una expresión reducida de al menos un segundo gen y/o una función reducida de un producto de al menos un segundo gen con respecto a una célula no modificada genéticamente correspondiente.

[00816] En un aspecto, se proporcionan en la presente células modificadas, donde la célula se modifica para tener: (a) expresión reducida de un gen FAS y/o función reducida de un producto del gen FAS; y (b) expresión reducida de al menos un segundo gen y/o función

reducida de un producto de al menos un segundo gen; donde la expresión reducida de cada gen es relativa a una célula no modificada correspondiente, opcionalmente donde la célula modificada es una célula hematopoyética.

[00817] En algunas modalidades, la modificación para reducir la expresión comprende modificar genéticamente el genoma de la célula para alterar el gen FAS y opcionalmente al menos un segundo gen.

[00818] En algunas modalidades, la ingeniería genética comprende edición mediada por nucleasas, opcionalmente donde la edición mediada por nucleasas comprende edición mediada por CRISPR/Cas9.

[00819] En algunas modalidades, la modificación para reducir la expresión comprende el direccionamiento mediado por ARNi del gen FAS y opcionalmente al menos un segundo gen, opcionalmente donde el direccionamiento mediado por ARNi comprende la desactivación mediada por ARN de horquilla corta (ARNhc).

[00820] En algunas modalidades, el direccionamiento mediado por ARNi comprende diseñar la célula para que exprese un polinucleótido de ARN capaz de mediar la desactivación del gen FAS y opcionalmente al menos un segundo gen.

[00821] En algunas modalidades, la célula modificada comprende una célula hematopoyética.

[00822] En algunas modalidades, la célula hematopoyética comprende una célula madre hematopoyética.

[00823] En algunas modalidades, la célula hematopoyética comprende una célula inmunitaria.

[00824] En algunas modalidades, la célula inmunitaria comprende una célula inmunitaria adaptativa, una célula inmunitaria innata, una célula T, una célula NK y un macrófago.

[00825] En algunas modalidades, la célula modificada comprende una célula modificada genéticamente.

[00826] En algunas modalidades, la célula modificada genéticamente se diseña para expresar un receptor heterólogo.

[00827] En algunas modalidades, el receptor heterólogo comprende un receptor inmunológico.

[00828] En algunas modalidades, el receptor inmunológico heterólogo comprende un

receptor de antígeno quimérico (CAR), un receptor de células T o un receptor de células NK.

[00829] En algunas modalidades, la célula modificada genéticamente comprende una célula T o una célula capaz de diferenciarse en una célula T, y donde el receptor heterólogo se inserta en un locus de TCR endógeno, opcionalmente el locus del receptor alfa de células T (TRAC).

[00830] En algunas modalidades, el receptor heterólogo comprende uno o más dominios de unión al antígeno, opcionalmente donde uno o más dominios de unión al antígeno son capaces de unirse a un antígeno tumoral o un antígeno asociado con el cáncer.

[00831] En algunas modalidades, la expresión y/o función reducida del gen FAS o su producto de expresión mejora al menos una propiedad de la célula modificada con respecto a la célula no modificada correspondiente.

[00832] En algunas modalidades, cuando la célula modificada se modifica adicionalmente para tener expresión y/o función reducida de al menos un segundo gen, la expresión y/o función reducida del gen FAS o su producto de expresión y la expresión y/o función reducida de al menos un segundo gen o su producto de expresión mejora al menos una propiedad de la célula modificada con respecto a una célula correspondiente modificada para reducir únicamente la expresión y/o la función del gen FAS.

[00833] En algunas modalidades, cuando la célula modificada se modifica adicionalmente para tener expresión y/o función reducida de al menos un segundo gen, la expresión y/o función reducida del gen FAS o su producto de expresión y la expresión y/o función reducida de al menos un segundo gen o su producto de expresión mejora al menos una propiedad de la célula modificada con respecto a una célula correspondiente modificada para reducir únicamente la expresión y/o la función de al menos un segundo gen.

[00834] En algunas modalidades, al menos una propiedad comprende una capacidad proliferativa mejorada.

[00835] En algunas modalidades, al menos una propiedad comprende una protección mejorada contra la apoptosis mediada por FAS.

[00836] En algunas modalidades, la célula modificada comprende una célula inmunitaria y al menos una propiedad comprende una función mejorada de la célula efectora inmunitaria.

[00837] En algunas modalidades, la función mejorada de las células efectoras inmunitarias comprende una mayor expresión, producción y/o secreción relativa de las moléculas

efectoras.

[00838] En algunas modalidades, la célula inmunitaria comprende una célula T y la molécula efectora comprende una o más moléculas seleccionadas del grupo que consiste en: IFNγ, TNF-alfa, granzima B y FASL.

[00839] En algunas modalidades, la célula modificada está diseñada para expresar un antígeno de superficie heterólogo, opcionalmente donde el antígeno de superficie heterólogo es capaz de mediar el agotamiento dirigido de la célula modificada diseñada con respecto a una célula modificada correspondiente no diseñada para expresar el antígeno de superficie heterólogo.

[00840] En un aspecto, se proporcionan en la presente métodos para estimular una respuesta inmunológica en un sujeto, donde el método comprende administrarle al sujeto cualquiera de las células modificadas como se describe en la presente.

[00841] En un aspecto, se proporcionan en la presente métodos para tratar el cáncer en un sujeto, donde el método comprende administrarle al sujeto cualquiera de las células modificadas como se describe en la presente.

[00842] En algunas modalidades, la célula modificada es autóloga con referencia al sujeto.

[00843] En algunas modalidades, la célula modificada es alogénica con referencia al sujeto.

[00844] En un aspecto, en la presente se proporcionan uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican: un primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina de células germinales (ALPG/P); y un segundo polipéptido quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN).

[00845] En algunas modalidades, el primer dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, y una secuencia de cadena ligera variable (VL) que comprende tres secuencias de CDR de cadena ligera, CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, CDR-H2 comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 3, CDR-L1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID

NO: 4, CDR-L2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 6.

[00846] En algunas modalidades, el segundo dominio de unión al antígeno extracelular comprende una secuencia de cadena pesada variable (VH) que comprende tres secuencias de CDR de cadena pesada, CDR- H1, CDR-H2 y CDR-H3, donde: CDR-H1 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 14, CDR-H2 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 15, y CDR-H3 comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 16.

[00847] En un aspecto, se proporcionan en la presente uno o más ácidos nucleicos recombinantes, donde uno o más ácidos nucleicos recombinantes codifican al menos una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde al menos una secuencia de ácido nucleico comprende uno o más de: (1) una primera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica el receptor de muerte de la superficie de la célula Fas humana (FAS) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, (2) una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica la proteína tirosina fosfatasa no receptora de tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; y (3) una tercera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la Caja de Grupo de Alta Movilidad asociada a la selección de timocitos humanos (TOX) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00848] En algunas modalidades, una o más secuencias de ácido nucleico recombinante tienen al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos de longitud.

[00849] En algunas modalidades, donde una o más secuencias de ácido nucleico recombinante son un ARN de horquilla corta (ARNhc), un ARN interferente pequeño (ARNip), un ARN bicatenario (ARNbc) o un oligonucleótido antisentido.

[00850] En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos recombinantes comprenden la primera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica FAS humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39; y la segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica PTPN2 humana que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40.

[00851] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42-71.

[00852] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49.

[00853] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico reduce la expresión de FAS en una célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula inmunitaria de control que no comprende la primera secuencia de ácido nucleico.

[00854] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72-97.

[00855] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

[00856] En algunas modalidades, la segunda secuencia de ácido nucleico reduce la expresión de PTPN2 en una célula inmunitaria en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % en comparación con una célula inmunitaria de control que no comprende la segunda secuencia de ácido nucleico.

[00857] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 42 a 71; y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 72 a 97.

[00858] En algunas modalidades, la primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 49 y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 82.

[00859] En algunas modalidades, uno o más ácidos nucleicos comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 168, 167 y 166.

[00860] En algunas modalidades, la tercera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias establecidas en las SEQ ID

NO: 98-125.

[00861] En un aspecto, en la presente se proporcionan uno o más vectores de expresión que comprenden uno o más ácidos nucleicos recombinantes descritos en la presente.

[00862] En un aspecto, en la presente se proporcionan células que comprenden uno o más ácidos nucleicos recombinantes descritos en la presente.

[00863] En algunas modalidades, la célula es una célula inmunitaria humana primaria.

[00864] En un aspecto, se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más ácidos nucleicos recombinantes descritos en la presente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[00865] En un aspecto, se proporcionan en la presente métodos para inhibir una célula diana en un sujeto que comprende administrar una célula que comprende: un primer polipéptido quimérico que comprende un receptor cebador que comprende un primer dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a la fosfatasa alcalina de células placentarias/germinales (ALPG/P); y un segundo polipéptido quimérico que comprende un receptor de antígeno quimérico (CAR) donde el CAR comprende un segundo dominio de unión al antígeno extracelular que se une específicamente a mesotelina (MSLN).

[00866] En un aspecto, en la presente se proporcionan métodos para inhibir una célula diana en un sujeto que comprende administrar una célula que comprende al menos una secuencia de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos de longitud, donde al menos una secuencia de ácido nucleico comprende uno o más de: (1) una primera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1126 a 1364 de un ARNm que codifica el receptor de muerte de la superficie celular Fas humano (FAS) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 39, (2) una segunda secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 518 a 559 de un ARNm que codifica la proteína tirosina fosfatasa no receptora de tipo 2 (PTPN2) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 40; y (3) una tercera secuencia de ácido nucleico complementaria a los nucleótidos 1294 a 2141 de un ARNm que codifica la Caja de Grupo de Alta Movilidad asociada a la selección de timocitos humanos (TOX) que comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 41.

[00867] En algunas modalidades, la célula diana es una célula cancerosa, opcionalmente una célula cancerosa sólida o una célula cancerosa líquida.

[00868] En un aspecto, se proporcionan en la presente métodos para tratar una enfermedad

en un sujeto que comprenden administrar una célula descrita en la presente al sujeto.

EJEMPLOS

[00869] A continuación, figuran ejemplos de modalidades específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero, por supuesto, se deben permitir algunos errores y desviaciones experimentales.

[00870] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique algo diferente, métodos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, p. ej., T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, et ál., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2a edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18a edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3ª Ed.* (Plenum Press) tomos A y B (1992).

Ejemplo 1: Producción y caracterización in vitro de compuertas lógicas ALPG/P y MSLN

[00871] Materiales y métodos

[00872] Ingeniería de células T no virales para estudios in vitro.

[00873] Las células T se enriquecieron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas de Leukopaks (STEMCELL Technologies) de donantes normales utilizando Lymphoprep (STEMCELL Technologies) y el kit de aislamiento de células T humanas EasySep (STEMCELL Technologies). Posteriormente, las células T se activaron con CD3/CD28 Dynabeads en una proporción de cuentas a células de 1:1 (ThermoFisher, 40203D) en medio TexMACS (Miltenyi 130-197-196) suplementado con suero AB humano al 3% (Gemini Bio) y 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humanas (grado superior de Miltenyi) y se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO2 durante 48 horas antes de la electroporación.

[00874] CRISPR RNP se prepararon combinando ARNgu 120 µM (Synthego) dirigido a la secuencia de ADN GAGCCATGCTTGGCTTACGA (GS94, SEQ ID NO: 307), sNLS-SpCas9-

sNLS 62.5 µM (Aldevron) y amortiguador P3 (Lonza) en una proporción de volumen de 5:1:3:6 y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una cantidad optimizada de ADN plasmídico, determinada mediante experimentos de titulación de dosis (que oscilan entre 0.25 y 3 microgramos) se mezcló con 3.5 µl de RNP. Se contaron las células T, se les quitaron las cuentas, se centrifugaron a 90 X G durante 10 minutos y se resuspendieron a 10^6 células/14.5 µl de P3 con suplemento añadido (Lonza). Se añadieron 14.5 µl de suspensión de células T a la mezcla de ADN/RNP, se transfirieron a una placa de nucleocuvette de 384 pocillos Lonza y se pulsaron en un sistema Lonza HT Nucleofector con código EH-115. Se dejó que las células reposaran durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de transferirlas a placas de 96 pocillos (Sarstedt) en medio TexMACS suplementado con 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana (calidad premium Miltenyi).

[00875] La expresión del transgén se detectó mediante tinción con anticuerpo anti-Myc (clon 9B11 de Cell Signaling Technology) y anticuerpo anti-Flag (sistemas RnD, clon 1042E) y se analizó en un citómetro de flujo Attune NxT. Otros anticuerpos utilizados fueron IR cercano reparable vivo/muerto (Thermo Fisher), anticuerpo TCRalfa/beta (clon IP26 de BioLegend), anticuerpo CD4 (clon RPA-T4 de BioLegend), anticuerpo CD8 (clon SK1 de BioLegend).

[00876] FLAG-tag MSLN CAR 1: bisagra VH-CD8a humana anti-MSLN-dominio coestimulador CD8a-TMD-4-1BB-dominio de activación CD3z.

[00877] FLAG-tag MSLN CAR 3: bisagra VHH-CD8a humana anti-MSLN-dominio coestimulador CD8a-TMD-4-1BB-dominio de activación CD3z.

[00878] Receptor cebador Myc-tag ALPG/P: bisagra anti-ALPG/P scFv-CD8a-dominio de activación Notch1 TMD-Notch1 STS-HNF1aDBD-p65.

[00879] Estimulación de células T

[00880] Se diseñaron células T de dos donantes para expresar un sistema de compuerta lógica de dos aglutinantes de MSLN diferentes en combinación de formato CAR con un receptor cebador ALPG/P utilizando el proceso de fabricación del método in vitro. LG1 es MSLN CAR1 en combinación con el receptor cebador ALPG/P y LG3 es MSLN CAR3 en combinación con un receptor cebador ALPG/P. Las células T se congelaron y se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día del ensayo, se contaron las células T que expresaban LG1 o LG3

y se sembraron 2e4 células T totales por pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos en 200 uL de medio sin IL-7 ni IL-15. Las células T modificadas se sembraron solas (condición de «células T en reposo») o con Dynabeads anti-CD3/anti-CD28 en una proporción de perlas:célula de 1:5 (condición de «estimulación + TCR») en duplicados técnicos. Las placas preparadas con células T se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g antes de la incubación a 37 °C durante 24 horas. Después del cocultivo de 24 horas, las células T se tiñen para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizan mediante citometría de flujo en un Attune NxT.

[00881] Ensayo in vitro de muerte dependiente de antígeno dual

[00882] Se diseñaron células T de dos donantes para expresar LG1 o LG3 (o controles CAR constitutivos compatibles) utilizando el proceso de fabricación no viral y se congelaron y conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas y las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día del ensayo, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo. Para cada donante, todas las poblaciones de células T diseñadas se normalizaron al% de KI más bajo dentro de ese donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones diseñadas que estaban por encima del% de KI más bajo. Después de la normalización, las células T se resuspendieron en medio sin IL-7 e IL-15 y se diluyeron en serie antes de agregarlas a placas de ensayo de paredes blancas y fondo plano de 96 pocillos. La dilución en serie de células T da como resultado las siguientes proporciones de cocultivo efector KI+:diana (E:T) una vez que se agregaron 1e4 células diana/pocillo: 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 1: 27 y 1:81 en duplicados técnicos. Cada población de células T se cocultivó con cuatro K562 diferentes que tenían diferentes combinaciones de expresión del antígeno cebador ALPG y del antígeno citolítico MSLN: K562, K562-ALPG, K562-MSLN y K562-ALPG/MSLN. Las placas preparadas con células T y células diana se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g antes de la incubación a 37 °C durante 72 horas con una membrana transpirable en cada placa. La citotoxicidad al final del cocultivo de 72 horas se midió utilizando un ensayo de luciferasa de extremo.

[00883] Cinética de citotoxicidad

[00884] Se diseñaron células T de tres donantes para expresar LG1 o LG3 (o controles CAR constitutivos compatibles) utilizando el proceso de fabricación no viral y se congelaron y conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas y las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día del ensayo, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo. Para cada donante, todas las poblaciones de células T diseñadas se normalizaron al% de KI más bajo dentro de ese donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones diseñadas que estaban por encima del% de KI más bajo. Después de la normalización, las células T se resuspendieron en medio sin IL-7 e IL-15 y se diluyeron en serie antes de agregarlas a placas de ensayo transparentes de fondo plano de 96 pocillos que habían sido recubiertas previamente con poli-L-lisina (50 uL/pocillo a temperatura ambiente, aspiradas y secadas durante 30 minutos). La dilución en serie de células T dio como resultado las siguientes proporciones de cocultivo efector KI+:diana (E:T) una vez que se agregaron suavemente 6e3 células diana K562-ALPG/MSLN a cada pocillo: 3:1, 1:1 y 1:3 en duplicados técnicos. Se incluyó un tinte AnexinaV en el medio de ensayo para marcar las células apoptóticas. Las placas preparadas con células T y células diana se dejaron reposar sin perturbaciones durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de cubrirlas con películas transpirables. Luego, las placas se cargaron en un generador de imágenes de células vivas Incucyte y se tomaron imágenes cada 2 horas durante 72 horas para rastrear la actividad citotóxica a lo largo del tiempo midiendo la señal de GFP en los K562 y el marcador apoptótico AnexinaV.

[00885] Producción de citocinas

[00886] La producción de citocinas se evaluó en sobrenadantes tomados de pocillos de cocultivo del ensayo de citotoxicidad con células tumorales K562 diseñadas para expresar diferentes combinaciones de ALPG y MSLN (consulte «Muerte dual dependiente de antígeno in vitro»). Los sobrenadantes recogidos a las 72 horas de los pocillos 1:1 KI+ E:T en el ensayo de citotoxicidad descrito anteriormente se analizaron para determinar la producción de IL-2 usando un ensayo Luminex.

[00887] Modelo de ingeniería de líneas celulares para niveles de ALPG y MSLN relevantes

para el paciente

[00888] Las células diana K562 utilizadas en todos los experimentos de cocultivo con células T de compuerta lógica se diseñaron mediante lentivirus para expresar construcciones con antígenos y proteínas diana. La expresión celular se comparó con el nivel de expresión del antígeno cebador ALPG y la expresión del antígeno citolítico MSLN con los niveles que se encuentran comúnmente en muestras de tumores primarios de cáncer de ovario. Las células K562 parentales se obtuvieron de ATCC. El lentivirus pseudotipado VSV-G pantrópico se produjo mediante la transfección de células Lenti-X 293T con un vector de expresión transgénica y los plásmidos de empaquetamiento viral psPAX2 y pMD2.G usando Fugene HD (Promega #E2312). El lentivirus se concentró adicionalmente usando el concentrador Lenti-X (Takara Bio #631231). Todas las células K562 utilizadas en los ensayos se transdujeron con lentivirus que contenían una construcción «EFG» que expresaba tanto GFP como luciferasa. La GFP se usó como marcador de clasificación para generar una población pura de células transducidas mediante clasificación FACS con un FACS ARIA II, así como un marcador para células diana en ensayos basados en flujo o Incucyte, y el gen de luciferasa se usó para leer ensayos de citotoxicidad.

[00889] Después de clasificar y almacenar la línea K562-EFG, la línea celular se transdujo adicionalmente para expresar combinaciones del antígeno cebador ALPG y el antígeno citolítico MSLN. Se utilizaron construcciones lentivirales que expresan ALPG, MSLN o ALPG y MSLN juntas separadas por una secuencia 2A para la expresión bicistrónica para transducir la línea K562-EFG.

[00890] Ensayo de sensibilidad del receptor cebador para la inducción de la expresión de CAR

[00891] Las células T de un donante se diseñaron para expresar LG1, que tiene exactamente el mismo PrimeR que LG3, utilizando el método de ingeniería descrito anteriormente. El día 9 después de la activación, se contaron las células T LG1 y se sembraron 2e4 células T totales por pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos en 200 uL de medio sin IL-7 e IL-15. Las células T modificadas se sembraron solas (condición de «células T solas»), con K562-ALPG^{bajo}, o con células K562-ALPG^{alto} a 1:1 KI+ E:T en duplicados técnicos. Las placas preparadas con células T se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g antes de la incubación a 37 °C durante 72 horas. Después del cocultivo de 72 horas,

las células T se tiñen para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizan mediante citometría de flujo en un Attune NxT. Para analizar específicamente las células T vivas en el análisis de flujo utilizando FlowJo, se utilizó un tinte de viabilidad y expresión de GFP en los K562 para excluir las células muertas y las células diana en la selección.

[00892] A continuación, se utilizó un modelo de estrés in vitro utilizando células SKOV3-WT. Se diseñaron células T de dos donantes para expresar LG1 o LG3 (o controles CAR constitutivos compatibles) utilizando el método de ingeniería descrito anteriormente. Las células se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas y las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día del ensayo, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo. Para cada donante, todas las poblaciones de células T diseñadas se normalizaron al% de KI más bajo dentro de ese donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones diseñadas que estaban por encima del% de KI más bajo. Después de la normalización, las células T se resuspendieron en medio sin IL-7 e IL-15 y se agregaron a placas de ensayo de paredes blancas y fondo plano de 96 pocillos a 1:1 KI+ E:T con 1e4 células de cáncer de ovario SKOV3 que expresan endógenamente ALPG y MSLN. Las placas preparadas con células T y células diana se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g antes de la incubación a 37 °C durante 72 horas con una membrana transpirable en cada placa. Los sobrenadantes se recogieron a las 72 horas y se analizaron para determinar la producción de IFNγ e IL-2 mediante un ensayo Luminex.

[00893] <u>Expresión en muestras de cáncer primario y metastásico</u>

[00894] Para evaluar los niveles de antígeno en muestras de indicación específica, se evaluó la expresión de los antígenos diana de compuerta lógica ALPG (anticuerpo cebador) y MSLN (antígeno citolítico) en muestras de tumores de cáncer de ovario primario y metastásico mediante análisis IHC. Se analizaron muestras de tumores de cáncer de ovario primario (n=22) y metástasis (n=11) mediante IHC para determinar la expresión de ALPG y MSLN, y cada muestra se calificó según el porcentaje de células tumorales positivas para cada antígeno, además de la intensidad de la expresión del antígeno.

[00895] Ensayo de citotoxicidad de heterogeneidad

[00896] Para evaluar la proporción mínima de células positivas para el antígeno primario necesarias para inducir la eliminación total del tumor mediante las células T del circuito, se desarrolló un ensayo de citotoxicidad en el que se controlaba directamente la heterogeneidad del antígeno tumoral. Se diseñaron células T de dos donantes para expresar LG1 o LG3 (o controles CAR constitutivos compatibles) utilizando el método de ingeniería descrito anteriormente. Las células se congelaron y se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas y las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día del ensayo, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo. Para cada donante, todas las poblaciones de células T diseñadas se normalizaron al% de KI más bajo dentro de ese donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones diseñadas que estaban por encima del% de KI más bajo. Después de la normalización, las células T se resuspendieron en medio sin IL-7 e IL-15 y se agregaron a placas de ensayo transparentes de fondo redondo de 96 pocillos a 1:1 KI+ E:T con 1e4 K562-MSLN y K562-ALPG/MSLN se mezcló en varias proporciones para modelar diferentes niveles de heterogeneidad del antígeno cebador. Las placas preparadas con células T y células diana se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g antes de la incubación a 37 °C durante 72 horas con una membrana transpirable en cada placa. La citotoxicidad al final del cocultivo de 72 horas se midió utilizando un ensayo de luciferasa de extremo.

[00897] Ensayo de inhibición de proteínas solubles

[00898] La MSLN se elimina de las células en una forma soluble (sMSLN) que puede actuar como un sumidero e inhibir la unión de las células CAR T anti-MSLN a la MSLN presentada en la superficie de las células cancerosas y, por lo tanto, inhibir la destrucción de las células diana. Además, se sabe que la proteína soluble CA125 interactúa con MSLN y puede bloquear la unión de aglutinantes anti-MSLN y CAR si se dirigen a un epítopo que puede ser ocluido mediante la unión de CA125. Se pueden seleccionar diseños de CAR anti-MSLN candidatos para determinar su capacidad de resistir la inhibición por sMSLN y CA125 encontrados en niveles fisiológicamente relevantes usando ensayos que titulan niveles

crecientes de proteínas solubles en cocultivo con células CAR T y células cancerosas diana positivas para MSLN y miden la activación de células T/destrucción de la diana. Se desarrolló un ensayo que utiliza células diana K562-ALPG/MSLN y producción de citocinas IL-2 como medida de la activación de las células T para detectar la inhibición de las células CAR T anti-MSLN por parte de una proteína soluble, donde el CAR M912 muestra la inhibición por CA125. Después de validar el ensayo de inhibición de CAR de proteína soluble utilizando controles constitutivos de células CAR T, el ensayo se utilizó para analizar las compuertas lógicas LG1 y LG3.

[00899] Se diseñaron células T de dos donantes para expresar LG1 o LG3 (o controles CAR constitutivos compatibles) utilizando el método de ingeniería descrito anteriormente. Las células se congelaron y se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas y las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día del ensayo, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo. Para cada donante, todas las poblaciones de células T diseñadas se normalizaron al% de KI más bajo dentro de ese donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones diseñadas que estaban por encima del% de KI más bajo. Después de la normalización, las células T se resuspendieron en medio sin IL-7 e IL-15 y se agregaron a placas de ensayo transparentes de fondo plano de 96 pocillos a 1:1 KI+ E:T con 2e4 células diana K562-ALPG/MSLN en presencia de concentraciones variables de CA125 soluble o sMSLN. Las placas preparadas con células T y las células diana se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g antes de la incubación a 37 °C durante 48 horas. Los sobrenadantes se recogieron a las 48 horas y se analizaron para determinar la producción de IL-2 mediante un ensayo Luminex.

[00900] **Resultados**

[00901] Edición y estimulación de células T

[00902] En la **FIG. 1** se muestra un diagrama del ensayo. Los resultados se muestran en la **FIG. 2**. En la condición de «células T en reposo», las células T que expresaban ambas compuertas lógicas (LG1 y LG3) mostraron expresión de PrimeR pero mínima expresión de CAR en ausencia de estimulación (**FIG. 2**). Tras la estimulación de TCR a través de

Dynabeads anti-CD3/anti-CD28, las células T ahora activadas mostraron un aumento de PrimeR MFI y % de PrimeR+ en relación con las mismas células T en la condición de «células T en reposo» (FIG. 2). Sin embargo, la estimulación con TCR no aumentó el porcentaje de células PrimeR+ que también expresan CAR. Estos resultados indican que la expresión de un CAR de LG1 y LG3 depende de la unión al antígeno PrimeR, incluso en el contexto de un TCR fuerte y una señalización coestimuladora.

[00903] Destrucción dependiente de antígeno dual in vitro

[00904] Ambas compuertas lógicas demuestran una destrucción dependiente de antígeno dual in vitro. Las células T diseñadas con la compuerta lógica 1 o la compuerta lógica 3 se programaron para reconocer y activar específicamente una respuesta citotóxica a las células cancerosas que expresan tanto el antígeno cebador ALPG como el antígeno citolítico MSLN. La especificidad de antígeno dual de las células T de compuerta lógica contrasta con las células CAR T constitutivas convencionales que pueden causar toxicidades debido a la reacción cruzada del tumor ON-diana OFF con tejidos sanos que expresan el antígeno citolítico. Mientras que las células T que expresan los CAR anti-MSLN constitutivos mataron tanto a las células K562-MSLN como a las K562-ALPG/MSLN (FIG. 3C y 3D), la citotoxicidad de las células T que expresan la compuerta lógica fue específica para el antígeno dual K562-ALPG/MSLN (FIG. 3D), y demostró una actividad mínima contra las líneas celulares K562-ALPG o K562-MSLN positivas para un único antígeno incluso en las proporciones E:T más altas (FIG. 3B y 3C). No se observó citotoxicidad en las células T de control negativo sólo con RNP (FIG. 3A). Se observó actividad específica del tumor en las células T que expresan la compuerta lógica (FIG. 3D). Se observó toxicidad en la diana y fuera de la diana en las células T CAR únicamente contra la línea celular K562-MSLN (FIG. 3C). En conjunto, estos datos demuestran que la citotoxicidad de las células T de compuerta lógica contra las células positivas al antígeno citolítico se restringió a condiciones de cocultivo en las que el antígeno cebador ALPG también está presente.

[00905] Cinética de citotoxicidad

[00906] La compuerta lógica 1 demostró una cinética de destrucción más rápida que la compuerta lógica 3 in vitro. Las imágenes dinámicas de cocultivos de células T con células diana K562-ALPG/MSLN revelaron que las células T diseñadas con diferentes compuertas lógicas o controles CAR constitutivos coincidentes destruyeron a sus dianas con diferentes

cinéticas. Las células T diseñadas con CAR 1 o CAR 3 constitutivos mostraron un rápido inicio de actividad citotóxica al colocarlas en placas con las células diana, y CAR 1 tuvo el índice de destrucción más rápido. La citotoxicidad de las células T de compuerta lógica comenzó aproximadamente 24 horas después del inicio de la citotoxicidad mediante los controles de CAR constitutivos. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, la citotoxicidad retardada por las compuertas lógicas probablemente se basó en su mecanismo de que PrimeR primero necesita unirse a su antígeno antes de que las células T puedan desencadenar la expresión de CAR suficiente para alcanzar niveles superficiales capaces de inducir citotoxicidad. Las células T de compuerta Lógica 1 mostraron una destrucción de células diana K562-ALPG/MSLN más rápida y más completa en relación con las células T de compuerta lógica 3 (FIG. 4). No se observó citotoxicidad en las células T de control negativo sólo con RNP. La cinética de destrucción más rápida por parte de las células T de la Compuerta Lógica 1 en relación con las células T de la Compuerta Lógica 3 se corresponde bien con otras medidas de activación de las células T y destrucción de la diana que indican que la Compuerta Lógica 1 es el candidato más potente.

[00907] Producción de citocinas

[00908] Para demostrar aun más la especificidad y la actividad funcional de las células T de compuerta lógica, se evaluó la producción de citocinas. De acuerdo con los datos de citotoxicidad, la producción de citocinas a partir de células T de compuerta lógica se limitó a los pocillos donde estaban presentes las células diana de antígeno dual K562-ALPG/MSLN (FIG. 5D). Por el contrario, las células T que portaban el control CAR constitutivo produjeron IL-2 cuando se cultivaron conjuntamente con células diana K562-MSLN (FIG. 5B) o K562-ALPG/MSLN (FIG. 5D). Ni la compuerta lógica ni las células T CAR constitutivas produjeron IL-2 en respuesta a líneas celulares diana K562 (FIG. 5A) o K562-ALPG (FIG. 5C) que no expresaban el antígeno citolítico. Las células T de control negativo sólo con RNP no produjeron citocinas cuando se cultivaron conjuntamente con cualquier línea celular diana (FIG. 5A). Sin limitarse a ninguna teoría, estos datos respaldan aun más la hipótesis de que la producción funcional de las células T de compuerta lógica se limita a condiciones en las que están presentes tanto los antígenos cebadores como los citolíticos.

[00909] Modelo de ingeniería de líneas celulares para niveles de ALPG y MSLN relevantes para el paciente

[00910] Las líneas K562-ALPG, K562-MSLN y K562-ALPG/MSLN se generaron mediante FACS para tener niveles de expresión de antígeno coincidentes con las líneas celulares ASPC-1, una línea celular de cáncer de páncreas procedente de ATCC con expresión de antígeno endógeno tanto de ALPG como de MSLN. La evaluación basada en citometría de flujo de la expresión de ALPG y MSLN en líneas K562 establecidas después de la clasificación y el control de línea celular ASPC-1 muestra que FACS generó con éxito líneas K562 diseñadas con expresión que coincidía con el control (FIG. 6A y 7A). Es importante destacar que el análisis IHC de la expresión de ALPG y MSLN en células ASPC-1, tanto en muestras de pellets celulares como de tumores de xenoinjerto (tomadas de ratones NSG y fijadas con formalina), coincidía con los niveles de expresión bajos a medios de estos antígenos en muestras de tumores de cáncer de ovario primario analizadas en los mismos experimentos (FIG. 6B y 7B). En conjunto, estos datos respaldan que las líneas diana K562 utilizadas en estos ensayos expresan niveles fisiológicamente relevantes de antígenos diana ALPG y MSLN que coinciden con los niveles encontrados en muestras tumorales típicas de pacientes con cáncer de ovario.

[00911] Ensayo de sensibilidad del receptor cebador para la inducción de la expresión de CAR

[00912] A continuación, se utilizó un ensayo de inducción de CAR para evaluar la sensibilidad de este PrimeR al ALPG de baja densidad. El aglutinante anti-ALPG PrimeR fue sensible a niveles de ALPG 4 veces más bajos que la línea de referencia AsPC-1. Tanto LG1 como LG3 utilizan el mismo PrimeR con el aglutinante anti-ALPG. Se generaron líneas celulares K562-ALPG^{alto} y K562-ALPG^{bajo} para coincidir con la expresión del antígeno de la línea celular tumoral de referencia AsPC-1. Las células diana K562-ALPG/MSLN utilizadas en los ensayos funcionales se clasificaron para que coincidieran con la expresión de ALPG con la línea de K562-ALPG^{alta} utilizada en el ensayo de inducción de CAR. La cuantificación de las moléculas de superficie de ALPG en la línea K562-ALPG^{alta} muestra que hay un mayor número de antígenos presentes en estas células en comparación con la línea celular de referencia **(FIG. 8A, 8B, 8C**). Por el contrario, la línea K562-ALPG^{baja} muestra una expresión de ALPG claramente más baja que la línea «alta», y la cuantificación del antígeno muestra que la línea K562-ALPG^{baja} tiene una expresión de ALPG 4 veces menor que la línea celular ASPC-1 de referencia (**FIG. 8A, 8B, 8C**). Por lo tanto, la línea K562-ALPG^{baja} tiene una

expresión de ALPG que es fisiológicamente relevante y probablemente inferior a los niveles encontrados en tumores de cáncer de ovario en pacientes con cáncer humano. Es importante destacar que las células T diseñadas con LG1 y el aglutinante anti-ALPG PrimeR muestran niveles de inducción de CAR dependientes de cebado equivalentes en respuesta tanto a las células K562-ALPG^{bajo} como las células K562-ALPG^{alto} (**FIG. 8C**). Sin desear estar ligado a ninguna teoría, estos resultados demuestran que las células T LG1 son capaces de inducir la expresión de CAR en respuesta a niveles de ALPG iguales o inferiores al nivel de expresión que se encuentra típicamente en muestras de tumores de cáncer de ovario de pacientes con cáncer humano, y sugieren que la densidad de ALPG tumoral no será un factor limitante para la capacidad de las células T LG1 para eliminar las células cancerosas ALPG+/MSLN+.

[00913] A continuación, se usó un modelo de estrés in vitro usando células SKOV3-WT para evaluar cómo las células T diseñadas con las dos compuertas lógicas candidatas responden a líneas celulares de cáncer de ovario SKOV3 con expresión baja y heterogénea de ALPG y MSLN (FIG. 9A y 9B). Sin intención de limitarse a ninguna teoría, dado que LG1 y LG3 utilizan el mismo PrimeR pero cada uno induce la expresión de un CAR basado en 41BBζ construido con un aglutinante MSLN diferente, las diferencias en la respuesta de estas células T de compuerta lógica a diferentes células diana positivas para antígeno dual pueden ser impulsadas por diferentes actividades de los dos CAR de MSLN dentro de los distintos circuitos. Curiosamente, en ambos donantes analizados, las células T LG1 produjeron significativamente más citocinas en respuesta a las células diana SKOV3 que las células T LG3, con el efecto particularmente sorprendente para IL-2 (FIG. 9C y 9D). Además, las células T que expresaban LG1 produjeron significativamente más citocinas que las células T CAR1 constitutivas (nuevamente, más radicalmente para IL-2) (FIG. 9C y 9D). Sin intención de limitarse a ninguna teoría, estos datos sugieren que las células T LG1 son capaces de inducir una fuerte producción de citocinas en respuesta a las células diana del cáncer de ovario con expresión baja y heterogénea de ALPG y MSLN.

[00914] Expresión en muestras de cáncer primario y metastásico

[00915] Se encontró que casi todas las muestras, tanto de cáncer de ovario primario como metastásico, expresaban MSLN, y la gran mayoría de las muestras de tumores primarios expresaban MSLN en el 100 % de las células cancerosas (FIG. 10B). La expresión del antígeno cebador ALPG también se encontró en la gran mayoría de las muestras de

pacientes, aunque no en todas las metástasis (FIG. 10A). Si bien ALPG estaba presente en la mayoría de las muestras de cáncer de ovario, se encontró que el porcentaje de células cancerosas dentro de cada muestra que expresan ALPG era más heterogéneo que MSLN para muchos pacientes. Las muestras que resultaron positivas para ALPG fueron todas >5% de ALPG+, y la mayoría contenía al menos 10% de células cancerosas ALPG+. Por lo tanto, ALPG y MSLN se coexpresan en la gran mayoría de muestras de pacientes con cáncer de ovario, donde la expresión de MSLN de manera parece más homogénea en todas las células en muchas muestras y ALPG está presente pero expresado de manera más heterogénea.

[00916] Ensayo de citotoxicidad de heterogeneidad

[00917] Los tumores son mezclas heterogéneas de células cancerosas y esta heterogeneidad se extiende a la expresión de antígenos. Al atacar dos antígenos en forma de puerta AND, el circuito de compuerta lógica primeR/CAR tiene el potencial de reducir significativamente los efectos secundarios tóxicos en relación con las terapias contra el cáncer existentes al mejorar la precisión del direccionamiento al tumor frente al tejido sano. Sin embargo, con esta orientación más específica ha quedado la duda de si estos circuitos son capaces de eliminar tumores heterogéneos que solo expresan el antígeno cebador en una minoría de las células, lo que probablemente será el caso en muchos tumores de pacientes. Los resultados de este ensayo demuestran que ambas compuertas lógicas demuestran una eliminación completa de las células diana hasta solo un 5 % de células cancerosas positivas para el antígeno cebador (ALPG), donde LG1 muestra la respuesta más potente en presencia del antígeno menos cebador (FIG. 10C). Las células T de control CAR constitutivas destruyeron todas las condiciones de células diana MSLN+ igualmente bien, independientemente de la expresión de ALPG. No se observó citotoxicidad en las células T de control negativo sólo con RNP. En conjunto con los datos de IHC que analizan la expresión de antígenos en muestras de pacientes con cáncer de ovario, los resultados del ensayo de citotoxicidad por heterogeneidad del antígeno cebador demuestran que las células T de compuerta lógica son capaces de eliminar poblaciones heterogéneas de células cancerosas que expresan el antígeno cebador sólo en una pequeña minoría de células.

[00918] Ensayo de proteínas solubles

[00919] Ni LG1 ni LG3 (o sus controles CAR constitutivos emparejados) fueron inhibidos por niveles fisiológicamente relevantes de CA125 soluble o sMSLN (FIG. 11A y 11B). Las células

T RNP no mostraron liberación de citocinas como se esperaba para el control negativo. Estos resultados indican que tanto LG1 como LG3 contienen CAR que son resistentes a la inhibición por niveles de CA125 soluble y sMSLN que podrían encontrarse en pacientes con cáncer de ovario.

Ejemplo 2: Caracterización in vivo de compuertas lógicas ALPG/P y MSLN

[00920] Materiales y métodos

[00921] Se diseñaron células T de dos donantes para expresar LG1 o LG3 (o controles CAR constitutivos compatibles) utilizando los métodos de ingeniería descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Las células se congelaron y conservaron el día 9 después de la activación inicial. Para los ensayos de control de calidad (QC), las células T modificadas y las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. A continuación, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar el % de KI.

[00922] Estudio in vivo de doble flanco K526

[00923] Se implantó la cepa NSG doble MHC KO (NSG DKO) (Jackson Laboratories, 025216) con 1e6 de cada una de las células K562-MSLN en el flanco izquierdo y células K562-ALPG/MSLN en el flanco derecho, ambas en solución de Matrigel al 50%. Tres días después de la inoculación de células K562, los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento con tamaños de tumores coincidentes utilizando imágenes bioluminiscentes (BLI) para medir la señal de luciferasa para cuantificar las células tumorales diseñadas, con 7 ratones asignados por condición de tratamiento. El mismo día de la estadificación y la normalización, las células T modificadas genéticamente y los controles RNP compatibles se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humanas. El día 4 después de la implantación de K562 para cada donante, todas las poblaciones de células T modificadas se normalizaron al % de KI más bajo dentro de ese donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones modificadas que estaban por encima del % de KI más bajo. A los ratones se les inyectaron células T 5e6 KI+ por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los volúmenes de los tumores bilaterales se controlaron dos veces por semana mediante un calibrador junto con el peso

corporal.

[00924] MSTO

[00925] La cepa NSG doble MHC KO (NSG DKO) (Jackson Laboratories, 025216) se implantó con 1e6 de cada una de las células MSTO-211H modificadas para expresar ALPG y MSLN a niveles que coincidían con la línea de referencia ASPC-1 en solución de Matrigel al 50 %. Nueve días después de la inoculación de células MSTO, los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento con tamaños de tumores coincidentes según las mediciones del calibrador, con 7 ratones asignados por condición de tratamiento. El mismo día de la estadificación y la normalización, las células T modificadas genéticamente y los controles RNP compatibles se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humanas. El día 10 después de la implantación de MSTO para cada donante, todas las poblaciones de células T modificadas se normalizaron al % de KI más bajo dentro de ese donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones modificadas que estaban por encima del % de KI más bajo. A los ratones se les inyectaron células T KI+ 2e6, 7e5 o 2.3e5 por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los volúmenes de los tumores se controlaron 2-3 veces por semana mediante un calibrador junto con el peso corporal.

[00926] **Resultados**

[00927] El experimento in vivo de doble flanco modela la toxicidad en la diana fuera del tumor observada clínicamente con células CAR T constitutivas que se dirigen a un antígeno tumoral que también se expresa en órganos sanos, donde el tumor que solo expresa el citolítico representa dicho tejido normal. En estos experimentos, el tumor $K562^{MSLN}$ modeló un órgano sano (p. ej., el revestimiento mesotelial) que expresa MSLN y el tumor $K562^{ALPG/MSLN}$ en el flanco opuesto modeló un tumor de cáncer de ovario. Las células T que expresaban LG1 o LG3 mostraron muerte específica de las células tumorales $K562^{ALPG/MSLN}$ de antígeno dual sin actividad mensurable contra las células tumorales $K562^{MSLN}$ fuera de la diana (FIG. 12A-F). En cada figura, la línea inferior muestra el volumen del tumor después del tratamiento con las células T indicadas y la línea superior muestra el volumen del tumor después del tratamiento con células T de control. El volumen del tumor en el tumor $K562^{MSLN}$ y el tumor $K562^{ALPG/MSLN}$ después del tratamiento con el CAR constitutivo se muestra en la FIG. 12A y 12B, respectivamente. El volumen del tumor en el tumor $K562^{MSLN}$ y el tumor $K562^{ALPG/MSLN}$

después del tratamiento con LG1 se muestra en la FIG. 12C y 12D, respectivamente. El volumen del tumor en el tumor $K562^{MSLN}$ y el tumor $K562^{ALPG/MSLN}$ después del tratamiento con LG3 se muestra en la FIG. 12E y 12F, respectivamente. Las células T LG1 demostraron una actividad antitumoral más potente en la diana que las células T LG3. Por lo tanto, tanto LG1 como LG3 dirigieron las células T modificadas para atacar y matar destruir específicamente los tumores ALPG+/MSLN+ e ignorar los tumores MSLN+ presentes a solo unos centímetros de distancia en los mismos ratones. Los resultados de estos experimentos muestran cómo las células T de compuerta lógica se pueden utilizar para atacar específicamente tumores de antígeno dual in vivo.

[00928] La dosis de células T 2e6 LG1 o LG3 indujo una potente destrucción de tumores y respuestas completas en el modelo de tumor de xenoinjerto MSTO-2H11ALPG/MSLN modificado. La potencia del CAR contra tumores sólidos se mejoró con las células T de compuerta lógica LG1 o LG3. Las respuestas a la dosificación de células T a dosis baja, dosis de estrés y dosis alta se muestran en la FIG. 13A, 13B y 13C, respectivamente. En la dosis de prueba de estrés de células CAR-T convencionales 7e5 con expresión constitutiva LG1 MSLN-CAR, el crecimiento tumoral se inhibió sólo parcialmente (FIG. 13B). Por el contrario, las células T de compuerta lógica ALPG PrimeR (ya sean células T LG1 o LG3) dieron como resultado una inhibición superior del crecimiento tumoral con la misma dosis (FIG. 13B). Además, las células T que expresan compuertas lógicas mostraron una expansión más robusta en muestras de sangre en comparación con las que expresan constitutivamente CAR-T basándose en recuentos de células T modificadas genéticamente en la sangre tomadas mediante citometría de flujo (FIG. 13D). El análisis de flujo de células T encontradas en la sangre periférica mostró una expresión mínima de CAR de las células T de compuerta lógica, lo que demuestra la fidelidad de la compuerta lógica para restringir la expresión y actividad de CAR al tumor diana (FIG. 14A-14D). Por lo tanto, las compuertas lógicas no solo mejoraron la especificidad y seguridad de las células CAR T al activar su actividad en función de la presencia de un antígeno cebador, sino que también aumentaron la potencia de las terapias con células T en relación con los CAR constitutivos.

Ejemplo 3: Caracterización de ARNhc in vitro

[00929] **Materiales**

[00930] Reducción a nivel de ARNm (qPCR)

[00931] Se modificaron células T de al menos 2 donantes para expresar FMC63 CAR solo o con los módulos de ARNhc FAS, TOX, PTPN2 o ZC3H12A indicados. Se aislaron células T de donantes de leucopacks y se activaron (día 0). 48 horas después de la activación, se modificaron las células T (día 2). Para modificar las células T, se formó un complejo de ARNgu dirigido a GS94 con sNLS-SpCas9-sNLS Nucleasa a temperatura ambiente durante 10 minutos formando la mezcla de ribonucleoproteínas. Se agregaron a la ribonucleoproteína y se mezclaron plásmidos que contenían el CAR FMC63 solo o los módulos de ARNhc FAS, TOX, PTPN2 o ZC3H12A y la solución P3 primaria suplementada. La mezcla se añadió a células T activadas y se electroporó. Después de la electroporación, las células T modificadas se recuperaron utilizando medios nuevos suplementados con 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15. Las células T modificadas se reabastecieron con medio nuevo suplementado con 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 los días 3 y 5.

[00932] Seis días después de la edición, se realizó un enriquecimiento magnético utilizando Dynabeads MyOne Streptavidin T1 y un anticuerpo anti-EGFRt biotinilado. Las poblaciones altamente puras de células T editadas se lisaron y se extrajo el ARNm utilizando el kit de purificación mRNA Direct de Dynabeads. Una vez extraído, el ARNm se cuantificó utilizando el kit de ensayo de ARN Quant-it RiboGreen y se utilizó para sintetizar ADNc con el kit de síntesis de primera cadena SuperScript IV. Luego, el ADNc se utilizó para realizar una PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real con la mezcla maestra TaqMan Fast Advanced y los ensayos RPL13A, FAS, PTPN2, ZC3H12A y TOX TaqMan.

[00933] Reducción a nivel de proteínas (citometría de flujo)

[00934] Se modificaron células T de al menos 2 donantes para expresar FMC63 CAR solo o con el módulo FAS ARNhc indicado utilizando el proceso de fabricación de R&D. Seis días después de la edición, las células T se tiñeron para determinar la expresión de EGFRt y FAS utilizando anti-EGFRt PE y anti-FAS AF647, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo Attune NxT. La expresión relativa de FAS se cuantificó tomando la proporción del gMFI de FAS para células EGFRt+ divididas entre células EGFRt-. Luego, este valor se normalizó a la expresión relativa de FAS del grupo de control para calcular la reducción.

[00935] Ingeniería de células T para la reducción dual de ARNhc

[00936] Las células T se enriquecieron a partir de células mononucleares de sangre

periférica (PBMC) obtenidas de Leukopaks (STEMCELL Technologies) de donantes normales utilizando Lymphoprep (STEMCELL Technologies) y el kit de aislamiento de células T humanas EasySep (STEMCELL Technologies). Posteriormente, las células T se activaron con CD3/CD28 Dynabeads en una proporción de cuentas a células de 1:1 (ThermoFisher, 40203D) en medio TexMACS (Miltenyi 130-197-196) suplementado con suero AB humano al 3% (Gemini Bio) y 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humanas (grado superior de Miltenyi) y se cultivaron a 37 °C, 5 % de CO2 durante 48 horas antes de la electroporación.

[00937] CRISPR RNP se prepararon combinando ARNgu 120 µM (Synthego) dirigido a la secuencia de ADN GAGCCATGCTTGGCTTACGA (GS94, SEQ ID NO: 307), sNLS-SpCas9-sNLS 62.5 µM (Aldevron) y amortiguador P3 (Lonza) en una proporción de volumen de 5:1:3:6 y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una cantidad optimizada de ADN plasmídico que codifica las secuencias de ARNhc de interés, determinada mediante experimentos de titulación de dosis (que oscilan entre 0.5 y 3 microgramos), se mezcló con 3.5 µl de RNP. Se contaron las células T, se les quitaron las cuentas, se centrifugaron a 90 X G durante 10 minutos y se resuspendieron a 10^6 células/14.5 µl de P3 con suplemento añadido (Lonza). Se añadieron 14.5 µl de suspensión de células T a la mezcla de ADN/RNP, se transfirieron a una placa de nucleocuvette de 384 pocillos Lonza y se pulsaron en un sistema Lonza HT Nucleofector con código EH-115. Se dejó que las células reposaran durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de transferirlas a placas de 96 pocillos (Sarstedt) en medio TexMACS suplementado con 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana (calidad premium Miltenyi).

[00938] Se diseñaron células T de tres donantes para expresar un CAR anti-mesotelina (MSLN) solo o con un módulo de ARNhc de control de luciferasa dual, ARNhc de FAS, ARNhc de FAS-TOX, ARNhc de TOX-PTPN2, ARNhc de FAS-PTPN2, ZC3H12A-PTPN2, o ARNhc FAS-NR4A1 usando el método de electroporación no viral descrito anteriormente. Las células se congelaron y se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes de la criopreservación, se tomó una alícuota de células de cada condición y las células T se tiñeron para determinar la expresión de EGFRt y CAR usando anti-EGFRt y anti-myc, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo en un Attune NxT.

[00939] Las secuencias del ARNhc y un módulo ARNhc-mir de ejemplo se proporcionan a continuación y en el listado de secuencias:

[00940] FAS_11: TTAAGAATCTTTTCAAACACTA (SEQ ID NO: 49)

[00941] FAS_13: TAATCTTAATCTTTCATCCTCT (SEQ ID NO: 51)

[00942] PTPN2_14: TCTGACAAGAGCTTCACACTGA (SEQ ID NO: 82)

[00943] PTPN2_1: TATAATACGACTTCACATCTTC (SEQ ID NO: 72)

[00944] TOX_9: TAGGTGAGGATTCATTCCCGGT (SEQ ID NO: 104)

[00945] TOX_4: TATGACTGCTACATCAAGCCAT (SEQ ID NO: 99)

[00946] ZC3H12A: TTATTAAGAAGCATCTTGCTTA (SEQ ID NO: 126)

[00947] NR4A1: TTAATCAGAAAAGTCACATACT (SEQ ID NO: 144)

[00948] módulo ARNhc-miR FAS_11-PTPN_14: GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAACGCCCTAGGTTTATGTTTGGATG AACTGACATACGCGTATCCGTCTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGTGAAATATATATTA AACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATTACGGTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTT TTTGCGTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATCTCCATGGCTGTTTGAATGAG GCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTC GACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGT GTGAAGCTCTTGTCAGATAGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAAGAGCTTCACACTGATG CCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGA ATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATGGTATAAATTAAATCA CTTTTTCATCTGACCAGTAGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTCTTTCCCTTCTA CAG (SEQ ID NO: 157)

[00949] En el listado de secuencias se proporcionan módulos ARNhc miR adicionales.

[00950] Las células T también fueron modificadas para tener una doble desactivación de FAS y PTPN2.

[00951] <u>Reducción de ARNm en condiciones de reposo</u>

[00952] Se modificaron células T de cuatro donantes para expresar MSLN CAR solo o con módulos de ARNhc de control de luciferasa dual, ARNhc de FAS-NR4A1, ARNhc de FAS-TOX, ARNhc de FAS-PTPN2, ARNhc de PTPN2-TOX o ARNhc de PTPN2-ZC3H12A utilizando el proceso de fabricación descrito anteriormente. Seis días después de la edición, se realizó un enriquecimiento magnético utilizando Dynabeads MyOne Streptavidin T1 y un anticuerpo anti-EGFRt biotinilado. Las poblaciones altamente puras de células T editadas se lisaron y se extrajo el ARNm utilizando el kit de purificación mRNA Direct de Dynabeads. Una

vez extraído, el ARNm se cuantificó utilizando el kit de ensayo de ARN Quant-it RiboGreen y se utilizó para sintetizar ADNc con el kit de síntesis de primera cadena SuperScript IV. Luego, el ADNc se utilizó para realizar una PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) con la mezcla maestra TaqMan Fast Advanced y los ensayos TaqMan para RPL13A, FAS, PTPN2, TOX y ZC3H12A.

[00953] Reducción de proteínas en condiciones de reposo

[00954] Citometría de flujo: se modificaron células T de 2 donantes para expresar MSLN CAR solo o con módulos de ARNhc de control de luciferasa dual, ARNhc de FAS-NR4A1, ARNhc de FAS-TOX, ARNhc de FAS-PTPN2, ARNhc de PTPN2-TOX o ARNhc de PTPN2-ZC3H12A utilizando el proceso de fabricación. Seis días después de la edición y una vez a la semana durante las 6 semanas siguientes, las células T se tiñeron para determinar la expresión de EGFRt y FAS utilizando PE anti-EGFRt y FITC anti-FAS, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo en un Attune NxT. La expresión relativa de FAS se cuantificó tomando la proporción del gMFI de FAS para células EGFRt+ divididas entre células EGFRt-. Luego, este valor se normalizó a la expresión relativa de FAS del grupo de control.

[00955] Transferencia Western: se modificaron células T de 4 donantes para expresar MSLN CAR solo o con módulos de ARNhc de control de luciferasa dual, ARNhc de FAS-NR4A1, ARNhc de FAS-TOX, ARNhc de FAS-PTPN2, ARNhc de PTPN2-TOX o ARNhc de PTPN2-ZC3H12A utilizando el proceso de fabricación. Seis días después de la edición, se realizó un enriquecimiento magnético utilizando Dynabeads MyOne Streptavidin T1 y un anticuerpo anti-EGFRt biotinilado. Luego, las poblaciones altamente puras de células T editadas se lisaron y se hirvieron para reducir y desnaturalizar las proteínas. La proteína total se cuantificó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA. Luego se cargaron los lisados normalizados en un gel SDS-PAGE y se procesaron. Luego se transfirió la proteína del gel a una membrana de PVDF, se bloqueó y se tiñó para detectar el anticuerpo primario RPL13A (control), FAS, NR4A1 o PTPN2 y el anticuerpo secundario conjugado con HRP. Luego se tomaron imágenes de la transferencia con Bio-Rad ChemiDoc y se cuantificó la expresión relativa de PTPN2.

[00956] Reducción del ARNm en condiciones de estimulación crónica

[00957] Las células T CD3+ editadas se sometieron a 14 días de estimulación repetitiva con MSLN+ K562 y descansaron 48 horas antes de RNA-seq.

[00958] Apoptosis mediada por FAS

[00959] Se modificaron células T de 6 donantes para expresar MSLN CAR solo o con módulos de ARNhc de control de luciferasa dual, ARNhc de FAS-NR4A1, ARNhc de FAS-TOX, ARNhc de FAS-PTPN2, ARNhc de PTPN2-TOX o ARNhc de PTPN2-ZC3H12A utilizando el proceso de fabricación. Seis días después de la edición, se cultivaron células T con 0, 0.2, 2 o 20 ug/ml de anticuerpo activador anti-FAS durante 24 horas. Las células T se tiñeron con EGFRt, vivo/muerto y Apotracker y se analizaron mediante citometría de flujo en un Attune NxT. La frecuencia de células editadas viables se calculó como el porcentaje de células vivas/muertas (Apotracker) entre las células EGFRt+ y luego estas frecuencias se normalizaron al porcentaje de células viables en la condición de control con 0 ug/ml de anticuerpo activador anti-FAS.

[00960] Ensayo de crecimiento independiente de citocinas

[00961] Se modificaron células T de 2 donantes para expresar MSLN CAR solo o con módulos de ARNhc de control de luciferasa dual, ARNhc de FAS-NR4A1, ARNhc de FAS-TOX, ARNhc de FAS-PTPN2, ARNhc de PTPN2-TOX o ARNhc de PTPN2-ZC3H12A utilizando el proceso de fabricación. Once días después de la edición, se cultivaron células T con 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 o en ausencia de citocinas exógenas y se cuantificó la frecuencia de células editadas y el número absoluto de células viables los días 0, 2, 4 y 8 después de la abstinencia de citocinas. El cambio múltiplo en células viables editadas desde el día 0 se utilizó para normalizar cada condición.

[00962] Ensayos de citotoxicidad

[00963] Incucyte: las células T de tres donantes se diseñaron para expresar MSLN CAR solo o con módulos de ARNhc de control de luciferasa dual, ARNhc de FAS-NR4A1, ARNhc de FAS-TOX, ARNhc de FAS-PTPN2, ARNhc de PTPN2-TOX o ARNhc de PTPN2-ZC3H12A utilizando el proceso de fabricación y se congelaron y conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes de realizar el ensayo, las células se descongelaron y recuperaron en medios que contenían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15. Las frecuencias de las células editadas se normalizaron a la eficiencia de edición más baja agregando nuevamente células T editadas solo con RNP. Luego, las células T se cultivaron conjuntamente con células K562 con y sin ingeniería para expresar el antígeno diana CAR, MSLN, en una proporción de uno a uno. En el transcurso de 48 horas, se tomaron imágenes de los cultivos celulares utilizando Incucyte y

se calculó el porcentaje de destrucción dividiendo el número de células K562 viables por el número total de células K562, restando el cociente de 1 y multiplicando por 100.

[00964] Luciferasa: se modificaron células T de tres donantes para expresar SS1 CAR solo o con un módulo de ARNhc de control de luciferasa dual o el módulo de ARNhc de FAS-PTPN2 utilizando el proceso de fabricación CiTE y se congelaron y conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes de realizar el ensayo, las células se descongelaron y recuperaron en medios que contenían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15. Las frecuencias de las células editadas se normalizaron a la eficiencia de edición más baja agregando nuevamente células T editadas solo con RNP. Luego, las células T se cultivaron conjuntamente con células MSTO modificadas para expresar el antígeno diana CAR, MSLN, en las proporciones indicadas. Después de 48 horas, se realizó el ensayo Luc-Screen y se calculó el porcentaje de destrucción de células diana dividiendo los valores de luminiscencia de cada muestra por los valores de luminiscencia de los pocillos de control solo de tumor, restando el cociente de 1 y multiplicando por 100.

[00965] RSA

[00966] Las células T de tres donantes se modificaron para expresar MSLN CAR solo o con módulos de ARNhc de control de luciferasa dual, ARNhc de FAS-NR4A1, ARNhc de FAS-TOX, ARNhc de FAS-PTPN2, ARNhc de PTPN2-TOX o ARNhc de PTPN2-ZC3H12A utilizando el proceso de fabricación y se congelaron y conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes de realizar el ensayo, las células se descongelaron y recuperaron en medios que contenían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15. Seis días después de la edición, se realizó un enriquecimiento magnético utilizando Dynabeads MyOne Streptavidin T1 y un anticuerpo anti-EGFRt biotinilado. Las células editadas enriquecidas se contaron mediante citometría de flujo en un Attune NxT con cuentas de recuento CountBright Plus Absolute. Se dispensaron 85.000 células T editadas en pocillos de una placa de fondo plano de 96 pocillos y se iniciaron cocultivos dispensando K562 en una proporción definida de efector:diana. En los días 2, 5, 7, 9 y 12 después del enriquecimiento inicial, las células T se cuantificaron mediante citometría de flujo y los cocultivos se reajustaron a la proporción E:T deseada mediante la dispensación de células K562 utilizando un manipulador de líquidos TTP LabTech Dragonfly. El día 14 después del enriquecimiento inicial, se realizó RNAseq en células T editadas realizando un enriquecimiento basado en anticuerpos anti-EGFRt como se indicó anteriormente, usando

citometría de flujo para dispensar 20.000 células T en pocillos de una placa de 384 pocillos y luego usando una preparación de RNAseq a granel para recuento de códigos de barras 3' interna. Se dispensaron cebadores de transcripción inversa oligo-dT con código de barras de muestra utilizando un manipulador de líquidos acústico Beckman Echo; se realizó una transcripción inversa y los productos de RT-PCR se convirtieron en bibliotecas de secuenciación utilizando el kit de etiquetado Illumina Nextera XT y se secuenciaron en un secuenciador de ADN Illumina NovaSeq. La producción de citocinas a partir de los sobrenadantes del día 14 se cuantificó mediante kits de citocinas multiplex EMD Millipore Luminex.

[00967] Resultados

[00968] Reducción a nivel de ARNm (qPCR)

[00969] En la FIG. 18A-D se muestra la reducción de ARNm de FAS, PTPN2, TOX y ZC3H12A**.** Los resultados de la PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real muestran que las secuencias de ARNhc contra FAS (FIG. 36A), TOX (FIG. 36B) y PTPN2 (FIG. 36C) proporcionan una reducción superior al 50 % en células editadas al final de la fabricación. La reducción máxima de ZC3H12A fue aproximadamente del 55 % (FIG. 36D). Se seleccionaron las secuencias de ARNhc FAS_11, FAS_13, PTPN2_1, PTPN2_14, TOX_9, TOX_4, ZC3H12A_12, ZC3H12A_1, NR4A1_12 y NR4A1_19 (no se muestran) para una caracterización adicional.

[00970] Reducción a nivel de proteínas (citometría de flujo)

[00971] El módulo de ARNhc dirigido a FAS proporcionó más del 50 % de reducción de la proteína FAS en células editadas al final de la fabricación (FIG. 37).

[00972] Ingeniería de células T para la reducción dual de ARNhc

[00973] No se observaron diferencias en la eficiencia de edición o el rendimiento de las células editadas al final de la fabricación. El módulo ARNhc-miR no afectó la expansión celular durante la producción celular de 9 días (FIG. 15A y 15B).

[00974] Reducción de ARNm en condiciones de reposo

[00975] Múltiples ARNhc demuestran una potente reducción del gen diana de ambos genes cuando se usan en combinación (FIG. 16). El módulo FAS-PTPN2 proporcionó más del 50 % de reducción del ARNm de FAS y PTPN2 en células editadas en condiciones de reposo (FIG. 16).

[00976] Reducción de proteínas en condiciones de reposo

[00977] El módulo de ARNhc dirigido a FAS, PTPN2 y TOX proporciona una reducción estable de FAS durante al menos 7 semanas después de la edición en condiciones de reposo (FIG. 17A). Los niveles de proteína FAS, PTPN2 y NR4A1 también se redujeron significativamente 6 días después de la edición (FIG. 17B). La proteína FAS se redujo a menos del 25 % cuando el ARNhc de FAS se combinó con PTPN2 o TOX, la proteína NR4A1 se redujo a menos del 50 % cuando el ARNhc de NR4A1 se combinó con FAS, y la proteína PTPN2 se redujo a aproximadamente o menos del 12 % cuando el ARNhc de PTPN2 se combinó con ARNhc de FAS, TOX o ZC3H12A. Por lo tanto, la reducción del gen ARNhc para FAS, PTPN2 y NR4A1 fue sólida y duradera en condiciones homeostáticas.

[00978] Reducción del ARNm en condiciones de estimulación crónica

[00979] La reducción del gen diana se mantuvo durante la estimulación crónica (FIG. 18). Por lo tanto, la reducción del gen ARNhc para FAS, PTPN2 y NR4A1 fue sólida y duradera en condiciones de estimulación crónica.

[00980] Apoptosis mediada por FAS

[00981] El módulo de ARNhc dirigido a FAS conduce a una reducción suficiente para proporcionar una sensibilidad reducida al menos 100 veces a la apoptosis mediada por FAS (FIG. 19A y 19B). La FIG. 19A muestra que hubo una fuerte reducción de FAS en las células del ARNhc. La FIG. 19B muestra que las células T con reducción de FAS conservaron más del 80 % de la viabilidad normalizada con respecto a las células T con solo el ARNhc de control después del tratamiento con un anticuerpo activador anti-FAS durante 24 horas. Por lo tanto, ARNhc-miR FAS protegió contra la apoptosis de células T mediada por FAS.

[00982] Ensayo de crecimiento independiente de citocinas

[00983] Todas las células T modificadas murieron en ausencia de soporte de citocinas y no se observó crecimiento independiente de citocinas. Por lo tanto, las células T modificadas con la combinación de módulos de ARNhc no mostraron evidencia de mayor riesgo de transformación (FIG. 20) como lo indica la muerte de las células T modificadas después de la retirada de citocinas.

[00984] Ensayos de citotoxicidad

[00985] Todas las combinaciones de reducción demostraron una destrucción idéntica de las células diana in vitro. Las células T modificadas con la combinación de módulos de ARNhc o

las células inactivadoras de FAS-PTPN2 de control (FAS-PTPN2 dKO) no mostraron evidencia de actividad citotóxica reducida durante el ensayo Incucyte de 48 horas con el antígeno diana que expresa la línea celular K562 (FIG. 21).

[00986] Además, todas las combinaciones de reducción de ARNhc demostraron una cinética de destrucción comparable in vitro. Las células T modificadas con los módulos de reducción de ARNhc no mostraron evidencia de actividad citotóxica reducida durante el ensayo de luciferasa de 48 horas con el antígeno diana que expresa la línea celular MSTO (FIG. 22).

[00987] RSA

[00988] La reducción de PTPN2 mediante ARNhc aumentó la expansión de las células T durante la estimulación crónica del antígeno (FIG. 23). Todos los módulos duales de ARNhc aumentan la producción de IFNγ durante la estimulación crónica con antígeno, prueba de Wilcoxon **** = $p<0.0001$, *** = $p<0.001$, ns = $p>0.05$ (**FIG. 25**). Las células T de reducción de PTPN2 también exhibieron características del ciclo celular después de la estimulación crónica del antígeno (FIG. 24A y 24B), y conservaron la característica efectora después de la estimulación crónica del antígeno (FIG. 26A y 26B).

[00989] Por lo tanto, las células T modificadas con el módulo de ARNhc FAS-PTPN2 exhibieron una expansión ~8 veces mayor (FIG. 23), una expresión de interferón gamma ~2 veces mayor (FIG. 25) y características fuertes de la función de las células T efectoras (FIG. 26A y 26B) y ciclo celular (FIG. 24A y 24B) en relación con células T de control modificadas que expresan un módulo de ARNhc dirigido a genes de control irrelevantes. Prueba de Wilcoxon **** = $p<0.0001$, *** = $p<0.001$, ns = $p>0.05$.

Ejemplo 4: Caracterización de ARNhc in vivo

[00990] Materiales

[00991] Se modificaron células T de tres donantes para expresar un CAR de MSLN solo o con un módulo de ARNhc de control de luciferasa dual o el módulo de ARNhc de FAS-PTPN2 utilizando el proceso de fabricación descrito anteriormente y se congelaron y conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes de realizar el ensayo, las células se descongelaron y se recuperaron en medios y se normalizaron a la eficiencia de edición más baja con células T editadas únicamente con RNP. Para evaluar la eficacia de las células T modificadas con CAR de MSLN solo o con un módulo de ARNhc de control de luciferasa dual

o el módulo de ARNhc de FAS-PTPN2, se realizó un ensayo in vivo en un modelo subcutáneo de mesotelioma. A ratones NSG-MHC I/II dKO se les inyectaron células MSTO211H que sobreexpresaban MSLN. Se inyectaron células MSTO211H en 100 uL de suspensión 1:1 de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y Matrigel en el flanco derecho de los ratones. Los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento según los volúmenes del tumor y se les inyectaron células T en la vena de la cola en dosis de $0.25x10^6$, $0.5x10^6$ y $2x10^6$. Los volúmenes de los tumores se midieron antes y dos veces por semana después de iniciar el tratamiento y se calcularon como V = (largo x ancho2)/2.

[00992] La presencia, expansión y persistencia de células CAR-T SS1 en la sangre periférica de los ratones tratados se controlaron mediante citometría de flujo multiparamétrica. Se recogieron cincuenta uL de sangre de cada ratón los días 7, 14, 21 y 28 después del tratamiento. La sangre se lisó con amortiguador de lisis ACK para eliminar los glóbulos rojos y se tiñó con anticuerpos marcados fluorescentemente contra: CD45 y GR1 murinos; CD3, CD4, CD8a, CCR7, CD27, CD45RA, EGFR, CD95 y flag humanos. A continuación, se agregaron muestras marcadas con perlas de recuento para la normalización antes del análisis de citometría de flujo mediante el citómetro de flujo Attune. Los datos FACS recopilados se analizaron utilizando el software FlowJo.

[00993] Se aislaron el bazo y los tumores de subconjuntos (n = 3) de ratones en cada grupo a los que se les inyectó la dosis alta de CAR-T el día 14, y se realizaron FAC para caracterizar y cuantificar los fenotipos de CAR-T.

[00994] Resultados

[00995] Paralelamente a la infusión de los animales, se realizó un análisis fenotípico de cada condición para comparar los estados de diferenciación de las células. Como se muestra en la FIG. 13, la expresión del ARNhc en células T no alteró los porcentajes de células T CD4 o CD8 en las poblaciones de células T modificadas genéticamente, ni las cantidades relativas de células T efectoras (Te), células T efectoras de memoria (Tem), células T de memoria central (Tcm), o células T madre de memoria (Tscm), con la excepción de la modificación DKO FAS/PTPN2 (FIG. 27). Por lo tanto, los módulos de ARNhc no alteraron el estado de diferenciación de las células T previas a la infusión.

[00996] Después del tratamiento in vivo, las células T modificadas con el módulo ARNhc-miR FAS-PTPN2 exhiben un control tumoral mejorado (FIG. 28A) y una mayor acumulación

de células T editadas en la periferia (FIG. 28B) y dentro del tumor. Las células T editadas que expresan el CAR, o el ARNhc FAS, FAS/TOX o FS/PTPN2 redujeron significativamente el volumen tumoral in vivo (FIG. 28A). Las células T de ARNhc FAS-PTPN2 también mostraron una expansión 10 veces mayor y una persistencia mejorada en la sangre periférica en comparación con las células CAR T solas sin ARNhc (FIG. 28B). Por lo tanto, FAS-PTPN2 reduce el aumento de la expansión de las células T y el control de tumores.

[00997] En los experimentos de dosis, las células T con reducción de ARNhc FAS-PTPN2 en dosis de $0.5x10^6$ y las células T con reducción de ARNhc FAS-TOX mostraron un control tumoral mejor o comparable al de $2x10^6$ CAR solo, lo que indica que se observó un control comparable del tumor con una cuarta parte de la dosis (FIG. 29). Por lo tanto, la reducción de FAS y PTPN2 o TOX permite dosis más bajas para un tratamiento tumoral similar.

[00998] FAS-PTPN2 impulsó la expansión de todos los subconjuntos de células T, incluidas las células efectoras y progenitoras. Las combinaciones FAS-PTPN2 y FAS-TOX dieron como resultado una mayor frecuencia de células con un fenotipo de memoria en el bazo y proporciones similares de subconjuntos en el tumor (FIG. 30A y 30B).

[00999] Además, no hubo evidencia de toxicidad grave asociada con una mayor expansión de células T (FIG. 31) como lo muestra el peso del ratón durante el transcurso del ensayo. Ninguna de las condiciones experimentales dio resultado la pérdida de peso de los ratones.

Ejemplo 5: Coexpresión de ARNhc y compuerta lógica ALPG/P y MSLN in vitro

[001000] Materiales y métodos

[001001] Ensayo de citotoxicidad dual dependiente de antígeno

[001002] Se modificaron células T de cuatro donantes para expresar la compuerta lógica 1 sola sin ARNhc o una célula T de circuito integrado (ICT) líder completamente optimizada que combina la compuerta lógica 1 con un casete de ARNhc FAS/PTPN2 (AB-1015, SEQ ID NO: 168) usando el proceso de fabricación no viral y se congelaron y conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas y las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día del ensayo, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo. Para cada donante, todas las poblaciones de células T modificadas se normalizaron al% de KI

más bajo dentro de ese donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones modificadas que estaban por encima del% de KI más bajo. Después de la normalización, las células T se resuspendieron en medio sin IL-7 e IL-15 y se diluyeron en serie antes de agregarlas a placas de ensayo de paredes blancas y fondo plano de 96 pocillos. La dilución en serie de células T da como resultado las siguientes proporciones de cocultivo efector KI+:diana (E:T) una vez que se agregaron 1e4 células diana/pocillo: 3:1, 1:1, 1:3, 1:9 y 1:27 en duplicados técnicos. Cada población de células T se cocultivó con K562-MSLN y K562-ALPG/MSLN. Las placas preparadas con células T y células diana se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g antes de la incubación a 37 °C durante 72 horas con una membrana transpirable en cada placa. La citotoxicidad al final del cocultivo de 72 horas se midió utilizando un ensayo de luciferasa de extremo. La expresión de PrimeR y CAR se cuantificó mediante tinción primaria con una versión marcada del antígeno de cada receptor que luego se detectó con un anticuerpo secundario conjugado fluorescentemente y se analizó mediante citometría de flujo.

[001003] Reducción de proteínas en condiciones de reposo

[001004] Citometría de flujo: Se modificaron células T de 2 donantes para expresar LG1 (receptor cebador ALPG/P y MSLN CAR) solo (control LG1 HTLV) o con el módulo de ARNhc FAS-PTPN2 usando el proceso de fabricación. Las células T se tiñeron para determinar la expresión de ALPG/P y FAS cinco días después de la edición utilizando ALPG-AF647 y FITC anti-FAS, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo en un Attune NxT. La expresión relativa de FAS se muestra en los histogramas de citometría de flujo.

[001005] Resultados

[001006] La coexpresión de la compuerta lógica ALPG/P y MSLN y el ARNhc FAS/PTPN2 mantuvo la fidelidad y potencia de la compuerta lógica in vitro. Como se muestra en la FIG. 32, la incubación de las células T que expresan la compuerta lógica y el ARNhc no indujo la lisis de las células K562-MSLN que expresan solo el antígeno CAR. Sin embargo, la incubación con células K562 que expresan el receptor cebador ALPG diana dio como resultado una lisis significativa dependiente de la dosis de las células diana, con el 100% de las células diana lisadas en la proporción más alta. Por lo tanto, la coexpresión de ARNhc con la compuerta lógica no afectó la función del receptor cebador y CAR.

[001007] Además, el ARNhc también demostró una fuerte reducción de FAS en relación con

las células de control LG1 sin ARNhc (FIG. 33). Por lo tanto, la coexpresión del receptor cebador y CAR con el ARNhc no afectó la función del ARNhc.

Ejemplo 6: Coexpresión de ARNhc y compuerta lógica ALPG/P y MSLN in vivo

[001008] Materiales y métodos

[001009] Se modificaron células T de dos donantes para expresar ARNhc de LG1 y FAS/PTPN2 (AB-1015, SEQ ID NO: 168) o ARNhc de LG1 y FAS/TOX usando los métodos de ingeniería descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Las células se congelaron y se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Para los ensayos de control de calidad (QC), las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. A continuación, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar el % de KI.

[001010] Estudio in vivo de doble flanco K526

[001011] Se implantó la cepa NSG doble MHC KO (NSG DKO) (Jackson Laboratories, 025216) con 1e6 de cada una de las células K562-MSLN en el flanco izquierdo y células K562-ALPG/MSLN en el flanco derecho, ambas en solución de Matrigel al 50%. Tres días después de la inoculación de células K562, los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento con tamaños de tumores coincidentes utilizando imágenes bioluminiscentes (BLI) para medir la señal de luciferasa para cuantificar las células tumorales diseñadas, con 7 ratones asignados por condición de tratamiento. El mismo día de la estadificación y la normalización, las células T modificadas genéticamente y los controles RNP compatibles se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humanas. El día 4 después de la implantación de K562 para cada donante, todas las poblaciones de células T modificadas se normalizaron al % de KI más bajo dentro de ese donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones modificadas que estaban por encima del % de KI más bajo. A los ratones se les inyectaron células T 5e6 KI+ por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los volúmenes de los tumores bilaterales se controlaron dos veces por semana mediante un calibrador junto con el peso corporal.

[001012] Resultados

[001013] La incorporación de ARNhc de FAS/PTPN2 en el circuito LG1 dio como resultado una mayor potencia antitumoral con fidelidad equivalente en relación con el circuito de control de ARNhc LG1 + dualLuc in vivo en el modelo NSG de tumor dual (FIG. 34A (donante dos) y 34B (donante tres)). No se observó reducción tumoral frente a células que expresan únicamente el antígeno CAR MSLN. Se observaron reducciones en el volumen del tumor cuando las células tumorales expresaron tanto ALPG como MSLN. Se observó una mayor reducción del volumen del tumor cuando las células T modificadas coexpresaron el ARNhc de FAS/PTPN2 en comparación con solo la compuerta lógica ALPG/MSLN (FIG. 34A y 34B).

[001014] El circuito de ARNhc LG1+FAS/TOX mostró fidelidad y potencia antitumoral similares al circuito LG1+FAS/PTPN2 in vivo en el modelo NSG de tumor dual (FIG. 35A (donante dos) y 35B (donante tres)). No se observó reducción tumoral frente a células que expresan únicamente el antígeno CAR MSLN. Se observaron reducciones en el volumen del tumor cuando las células tumorales expresaron tanto ALPG como MSLN. Se observó una mayor reducción del volumen del tumor cuando las células T modificadas coexpresaron el ARNhc de FAS/TOX o el ARNhc de FAS/PTPN2. Se observaron reducciones similares del volumen del tumor después del tratamiento con células T que coexpresan ARNhc de FAS/TOX o ARNhc de FAS/PTPN2 (FIG. 35A y 35B).

Ejemplo 7: ensayo in vivo en modelo de tumor de ovario

[001015] Se modificaron células T de 3 donantes para expresar el casete AB-1015, que incluye LG1 (receptor cebador ALPG/P y CAR MSLN) con el módulo de ARNhc FAS-PTPN2, utilizando los métodos de ingeniería descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Las células se congelaron y conservaron el día 9 después de la activación inicial. Para los ensayos de control de calidad (QC), las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. Las células T modificadas se contaron y se tiñeron para el receptor cebador y la expresión de CAR utilizando ALPG-AF647 y MSLN-Bio primario/estreptavidina-PE secundario, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar el % de KI.

[001016] La cepa NSG doble MHC KO (NSG DKO) (Jackson Laboratories, 025216) se implantó por vía intraperitoneal con 1e7 células cada una de la línea celular específica de indicación de cáncer de ovario OVCAR3-ALPG que expresa ALPG y MSLN. Como se muestra en la Fig. 56A, cinco días después de la inoculación de células tumorales, los ratones se

asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento con tamaños de tumores coincidentes basándose en mediciones de bioluminiscencia de la luciferasa expresada por las células diana OVCAR3-ALPG, con 10 ratones asignados por condición de tratamiento. El mismo día de la estadificación y la normalización, las células T modificadas genéticamente y los controles RNP compatibles se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humanas. El día seis después de la implantación de la línea celular de cáncer de ovario, a los ratones se les inyectaron células T KI+ 7.5e6 (o el número total equivalente de células de control RNP) por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Los volúmenes de los tumores se controlaron 2-3 veces por semana mediante medición de luminiscencia junto con el peso corporal.

[001017] Como se muestra en la Fig. 56B, las células T AB-1015 (módulo de ARNhc LG1 + FAS-PTPN2) indujeron la destrucción de tumores y la inhibición del crecimiento tumoral en el modelo de tumor de línea celular de cáncer de ovario. Las células T AB-1015 dieron como resultado una mayor inhibición del crecimiento tumoral en comparación con las células de control RNP. Además, la FIG. 56C muestra que el tratamiento con células T AB-1015 no produjo pérdida de peso corporal y fue bien tolerado por los ratones. Sin querer limitarse a ninguna teoría, las células T modificadas con el circuito LG1+FAS/PTPN2 completo generan respuestas potentes contra un modelo específico de cáncer de ovario en experimentos de tumores de xenoinjerto de ratón in vivo.

Ejemplo 8: La reducción e inactivación de FAS y otros genes mejora el perfil de células hematopoyéticas modificadas genéticamente

[001018] Métodos

[001019] Inactivación de FAS (KO) en combinación con un ensayo genético adicional

[001020] Se estimularon células T CD8 con perlas magnéticas CD3/CD28 durante 48 horas. Se transfectaron 500 000 células con RNP en complejo con Cas9/ARNcr/ARNtracr dirigidas al primer exón codificante de un solo gen o una combinación de dos genes utilizando el sistema Nucleofector de 384 pocillos Lonza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La biblioteca de ARNcr se centró en un total de 18 genes individuales que se ejecutaron en todas las combinaciones por pares para un total de 171 condiciones independientes. Cada condición se realizó por duplicado técnico en dos donantes independientes y el experimento se realizó dos veces. Los datos que se muestran son los resultados acumulativos de ambos

experimentos. Después de la transfección con RNP, las células se dejaron en reposo durante 4 días y luego se estimularon con perlas magnéticas CD3/CD28 en una proporción de perlas a células de 5:1. 2, 5, 7, 9 y 12 días después de la primera estimulación posterior a la transfección, se quitaron las perlas de las células, se contaron mediante citometría de flujo y se volvieron a sembrar con perlas CD3/CD28 en una proporción de perlas a células de 5:1. Al final del ensayo, la cantidad de células T viables se cuantificó mediante citometría de flujo y los niveles de citocinas y otras moléculas efectoras en el sobrenadante se cuantificaron mediante nPlex ELISA.

[001021] Ensayo de reducción de ARNhc

[001022] Las células CAR T se enriquecieron utilizando anti-EGFRt biotinilado (clon 528 Thermo) y perlas magnéticas conjugadas con estreptavidina (MyOne T1 Dynabeads). Posteriormente, se lisaron células T enriquecidas (>=70% EGFRt+) y se extrajo el ARN total utilizando el kit mRNA DIRECT de Dynabeads según el protocolo del fabricante. El ARN purificado se cuantificó utilizando Ribogreen Quant-IT y se normalizó antes de la síntesis de ADNc utilizando el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript IV. Luego, se utilizó el ADNc sintetizado para realizar qRT-PCR utilizando TaqMan Fast Advanced Master Mix y sondas TaqMan para cada diana de ARNhc respectiva. Se utilizaron sondas TaqMan para RPL13A para normalizar aun más la entrada de ADNc. Se capturaron los valores de Cq y se empleó el método delta-delta para cuantificar la expresión. El porcentaje de reducción se calculó como ((1 - ddCq) * 100).

[001023] Ensayo de apoptosis mediada por FAS

[001024] Las células ICT se descongelaron y enriquecieron utilizando reactivo ALPG-Fc y perlas magnéticas de unión a proteína G. Posteriormente, se cultivaron células T enriquecidas (~50 % PrimeR+) con concentraciones crecientes (0, 0.2, 2, 20 ug/ml) del anticuerpo de reticulación FAS, clon CH11, durante 22 horas. Las células ICT se tiñeron con ALPG, Apotracker y un tinte de viabilidad, y la frecuencia de células viables se cuantificó mediante citometría de flujo. La frecuencia relativa de células viables se calculó normalizando la viabilidad en cada dosis de la muestra a 0 ug/ml de anticuerpo anti-FAS activador.

[001025] *Ensayo de reducción dual in vivo*

[001026] Se activaron células T a granel durante 2 días en perlas de expansión CTS y se electroporaron con proteína CAS9, complejos ARNcr:ARNtracr y plantilla HDR CD19 (FMC63-

41BBz) para generar células T TRAC KI CAR con o sin deleciones combinatorias de FAS y otro gen de interés. Después de la electroporación, las células se expandieron durante 8 días en TexMAC que contenían un 3% de suero humano y citocinas IL-7 e IL-15 recombinantes. Las células $CD3^{+}$ residuales se agotaron en todas las condiciones el 4to día de expansión. El día 10 después de la activación, las células se recogieron, se normalizaron con células T $CD3^{Neg}$ y se resuspendieron en medio TexMAC para garantizar densidades celulares y frecuencias CAR^{+} equivalentes en todas las condiciones. Se transfirieron de forma adoptiva células CAR T 2.5e5, por vía intravenosa, a animales macho NSG (n = 7/condición) inoculados con células leucémicas NALM6 0.5e6 que albergaban un gen indicador de luciérnaga 4 días antes. Se evaluó la carga tumoral de los animales inoculados con NALM6 mediante imágenes bioluminiscentes (BLI) 1 día antes de la infusión de células T CAR para aleatorizar adecuadamente las cohortes. Los animales fueron monitoreados diariamente para detectar signos de bienestar y los BLI se midieron dos veces por semana utilizando un instrumento IVIS Spectrum. Los ratones fueron sacrificados cuando se encontraron moribundos de acuerdo con las pautas de IACUC.

[001027] Resultados

[001028] Como se muestra en la FIG. 38, la inactivación de FAS mejoró la proliferación y la función efectora. Las inactivaciones combinadas con FAS y genes adicionales también mejoraron la proliferación y la función efectora ya sea en relación con FAS solo (p. ej., producción de molécula efectora de FAS + gen A/B/C/D en relación con FAS solo) o en relación con el gen adicional (p. ej., proliferación de FAS + gen A/B/C en relación con el gen A/B/C solo).

[001029] Como se muestra en la **FIG. 39B**, se demostró una doble reducción robusta (>50 %) del FAS y dianas adicionales utilizando ARNhc junto con una expresión mantenida de transgenes. Los módulos ARNhc-miR proporcionaron una reducción superior al 50 % para cada diana de interés sin efectos nocivos en la expresión del transgén EGFRt. La FIG. 39A proporciona un diagrama del sistema de reducción y un diagrama de un ejemplo de construcción dual ARNhc-CAR.

[001030] Como se muestra en la FIG. 40B, la reducción de FAS proporcionó una protección mejorada >2 veces contra la apoptosis mediada por FAS. El módulo ARNhc-miR proporcionó una protección casi completa contra la apoptosis mediada por FAS en este ensayo. Se

muestra la media y el SEM de tres donantes representativos. En la **FIG. 40** B se presenta un diagrama de los ejemplos de sistemas de control y shFAS.

[001031] Como se muestra en la FIG. 41, se muestran las reducciones duales con FAS y genes adicionales mejoraron la eficacia in vivo de las células CAR T (CD19-41BBZ introducidas en el locus TRAC) en un modelo NALM6 sistémico. El tratamiento de ratones con reducción dual con FAS y genes adicionales dio como resultado una mayor supervivencia del ratón en comparación con las células CAR T de control solas.

Ejemplo 9: Caracterización de construcciones de ARNhc y compuertas lógicas adicionales

[001032] Materiales y métodos

[001033] Se modificaron células T de tres donantes (ABXFC_ICT 6, 9, 10) para expresar tres construcciones de ARNhc LG1 y FAS/PTPN2 utilizando los métodos de ingeniería descritos anteriormente en los Ejemplos 1, 3 y 4. Las células de control que expresan SS1-CAR y TC-210, puntos de referencia de control de CAR, se produjeron mediante ingeniería de lentivirus. Se utilizaron células no tratadas (UNT) como control negativo. Las células se congelaron y se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Para los ensayos de control de calidad (QC), las células T modificadas y las células T de control de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. Al día siguiente, las células T se contaron, se lavaron, se tiñeron con tinte de viabilidad Zombie-Aqua, se tiñeron para la expresión PrimeR y CAR usando ALPG-AF647 y MSLN-Bio primario/estreptavidina-PE secundario, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo con un Attune NxT para evaluar el % de KI. Los resultados del ensayo de citometría de flujo demuestran que después de la fabricación, las construcciones de compuerta lógica AB-X/ARNhc se expresaron en un 10-20 % de las células T vivas en los tres donantes analizados.

[001034] Las construcciones se construyeron como se describe en la Tabla 1 a continuación. La FIG. 42A proporciona un diagrama del diseño de la construcción.

Tabla 1

Nombre de la construcción	**Alias**	**Descripción**	**SEQ ID NO**
AB-1013	LG1_2xSPA_Fas+PTPN2	2xSPA poliA reduce PrimeR	166

		MFI en relación con AB-1015	
AB-1014	LG1_TTT_Fas+PTPN2	El sitio de inicio de traducción TTT reduce PrimeR MFI en relación con AB-1015	167
AB-1015	LG1_Fas+PTPN2		168

[001035] Reducción de ARNm en condiciones de reposo

[001036] Seis días después de la edición, se realizó un enriquecimiento magnético utilizando Dynabeads MyOne Streptavidin T1 y un anticuerpo anti-EGFRt biotinilado. Las poblaciones altamente puras de células T editadas se lisaron y se extrajo el ARNm utilizando el kit de purificación mRNA Direct de Dynabeads. Una vez extraído, el ARNm se cuantificó utilizando el kit de ensayo de ARN Quant-it RiboGreen y se utilizó para sintetizar ADNc con el kit de síntesis de primera cadena SuperScript IV. Luego, el ADNc se utilizó para realizar una PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) con la mezcla maestra TaqMan Fast Advanced y los ensayos TaqMan para FAS y PTPN2.

[001037] Reducción a nivel de proteínas (citometría de flujo)

[001038] Seis días después de la edición, las células T se tiñeron para determinar la expresión de EGFRt y FAS utilizando anti-EGFRt PE y anti-FAS AF647, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo Attune NxT. La expresión relativa de FAS se cuantificó tomando la proporción del gMFI de FAS para células EGFRt+ divididas entre células EGFRt-. Luego, este valor se normalizó a la expresión relativa de FAS del grupo de control para calcular la reducción.

[001039] Reducción a nivel de proteínas (Western blot)

[001040] Seis días después de la edición, se realizó un enriquecimiento magnético utilizando Dynabeads MyOne Streptavidin T1 y un anticuerpo anti-EGFRt biotinilado. Luego, las poblaciones altamente puras de células T editadas se lisaron y se hirvieron para reducir y desnaturalizar las proteínas. La proteína total se cuantificó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA. Luego se cargaron los lisados normalizados en un gel SDS-PAGE y se procesaron. Luego se transfirió la proteína del gel a una membrana de PVDF, se bloqueó y se tiñó para detectar el anticuerpo primario PTPN2 y el anticuerpo secundario conjugado con HRP. Luego se tomaron imágenes de la transferencia con Bio-Rad ChemiDoc y se cuantificó la expresión relativa de PTPN2.

[001041] Relación y expansión de CD4 y CD8

[001042] Las células T conservadas obtenidas según el método anterior se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. Al día siguiente, las células T se contaron, se lavaron, se tiñeron con tinte de viabilidad Zombie-Aqua, se tiñeron para CD4 y CD8 con FMO utilizados como controles para la selección y se analizaron mediante citometría de flujo con un Attune NxT.

[001043] Fenotipado de la memoria

[001044] Las células T del donante editadas como se describió anteriormente con el ARNhc y el circuito de compuerta lógica se perfilaron fenotípicamente con marcadores de subconjunto de células T de la superficie celular mediante citometría de flujo. Las células T conservadas se descongelaron, se contaron, se lavaron y se tiñeron con tinte de viabilidad Zombie-Aqua, o para CD4, CD8, CD45RA y CCR7 con FMO utilizados como controles para la selección. Las células se analizaron mediante citometría de flujo con un Attune NxT. En FlowJo, se seleccionaron linfocitos únicos y viables mediante SSC y FSC y se utilizó un perfil de subconjunto mediante una combinación de CCR7 y CD45RA para identificar células T de memoria de células madre (SCM: CD45RA+CCR7+), de memoria central (CD45RA-CCR7+), de memoria efectoras (CD45RA-CCR7-), o efectoras terminales (TEMRA: CD45RA+CCR7-) en subpoblaciones CD4+ y CD8+.

[001045] Conversión de CAR

[001046] Se modificaron células T de dos donantes (ABXFC_ICT 9, 10) para expresar las tres construcciones de ARNhc LG1 y FAS/PTPN2 utilizando el proceso de fabricación descrito anteriormente. Las células se congelaron y se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. Las células T PrimeR+ luego se enriquecieron a > 95% de pureza mediante un proceso basado en MACS de dos días. Luego se contaron las células T y se sembraron células T 5e4 por pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos en 200 uL de medio con 500 pg/mL de IL-7 e IL-15 antes de la adición de células $K562^{ALPG}$ a una relación 1:1 E:T en duplicados técnicos. Muestras de células T solas antes de la estimulación con el antígeno PrimeR a través de las células $K562^{ALPG}$, así como muestras recolectadas después de 24, 96 y 144 horas de cocultivo en las condiciones anteriores (con ½ cambio de medio cada 2-3 días) se lavaron, se tiñeron con tinte

de viabilidad Zombie-Aqua, se tiñeron para la expresión PrimeR y CAR usando ALPG-AF647 y MSLN-Bio primario/estreptavidina-PE secundario, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo con un Attune NxT. Conversión %CAR = (%CAR+ en t_x / %PrimeR+ en t_0)*100

[001047] Ensayo de citotoxicidad de heterogeneidad

[001048] Se modificaron células T de tres donantes (ABXFC_ICT 9, 10) para expresar las tres construcciones de ARNhc LG1 y FAS/PTPN2 utilizando el proceso de fabricación descrito anteriormente. Las células se congelaron y se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas y las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día del ensayo, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR usando ALPG-AF647 y MSLN-Bio primario/estreptavidina-PE secundario, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo con un Attune NxT. Para cada donante, todas las poblaciones de células T modificadas se normalizaron al% de KI más bajo dentro de ese donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones modificadas que estaban por encima del% de KI más bajo. Después de la normalización, las células T se resuspendieron en medio sin IL-7 e IL-15 y se agregaron a placas de ensayo de paredes blancas de fondo plano de 96 pocillos a 1:1 KI+ E:T con $1x10^4$ $K562^{MSLN}$ y $K562^{ALPG/MSLN}$ se mezcló en varias proporciones para modelar diferentes niveles de heterogeneidad del antígeno cebador. Las placas preparadas con células T y células diana se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g antes de la incubación a 37 °C durante 72 horas con una membrana transpirable en cada placa. La citotoxicidad al final del cocultivo de 72 horas se midió utilizando un ensayo de luciferasa de extremo.

[001049] Resultados

[001050] Se observó una eficacia de activación del transgén similar con cada una de las construcciones (**FIG. 42B**). Las células T que expresan PrimeR tenían una expresión de CAR mínima, debido a la función de la expresión de CAR de compuerta a compuerta lógica en la exposición a células diana ALPG+ (**FIG. 42C**). Estos resultados indican que las células T que expresan las construcciones de circuito de ARNhc/compuerta lógica AB-X se generaron de manera robusta utilizando el proceso de fabricación descrito.

[001051] La composición de CD4/CD8 de la población KI+ (o transducida para las

poblaciones lentivirales) para todas las células T modificadas genéticamente y la población de células T en masa para los controles RNP y no transducidos (UNT) se muestran en la FIG. 42D. La relación CD4:CD8 fue similar para todos los circuitos de compuerta lógica/ARNhc y la compuerta lógica sola. Estos resultados indican que la integración de la compuerta lógica y los módulos de ARNhc no alteró la composición de CD4/CD8 o la cinética de expansión de las células T que expresan los candidatos de circuito completo de compuerta lógica/ARNhc en comparación con la compuerta lógica sola (FIG. 42D).

[001052] El fenotipado de la memoria mostró fenotipos consistentes para los circuitos de ARNhc LG1 y FAS/PTPN2 con menos diferenciación que los puntos de referencia lentivirales (muestras UNT, TC-210 y SSI-CAR) (FIG. 43). En los tres donantes, la edición no contribuyó a una expansión de las células T terminalmente diferenciadas, ya que el subconjunto principal de células T en ambas subpoblaciones retuvo la expresión positiva de CD45RA y CCR7 (FIG. 43). Esto indica que las células T editadas tienen la capacidad de expandirse, sobrevivir y persistir in vivo. Los resultados también indican que la integración de la compuerta lógica y los módulos de ARNhc no alteró la composición del fenotipo de memoria de las células T que expresan los candidatos de circuito completo de compuerta lógica/ARNhc en comparación con la compuerta lógica sola. Así, las células T editadas tienen la capacidad de expandirse, sobrevivir y persistir in vivo.

[001053] Todas las construcciones mostraron una reducción equivalente tanto de FAS (FIG. 44A) como de PTPN2 (FIG. 44B).

[001054] Los tres circuitos de compuerta lógica/ARNhc (AB-1013, AB-1014 y AB-1015) indujeron la expresión de CAR dependiente de ALPG (FIG. 45). La conversión de CAR dependiente de ALPG mediante el circuito de compuerta lógica AB-X/ARNhc alcanzó un pico después de aproximadamente 100 horas de estimulación con el antígeno PrimeR, con una cinética de activación similar pero diferente magnitud de inducción de CAR observada para los diferentes candidatos. AB-1015 demostró la mayor conversión relativa de la señal PrimeR a la expresión de CAR después de la interacción con ALPG (FIG. 45).

[001055] En el ensayo de heterogeneidad, los tres circuitos de compuerta lógica/ARNhc destruyeron las poblaciones de células diana heterogéneas del antígeno cebador con potencia variada (FIG. 46). Por ejemplo, AB-1015 mostró la respuesta más potente en presencia del antígeno menos cebador (FIG. 46). Las células T de control CAR constitutivas destruyeron

todas las condiciones de células diana MSLN+ igualmente bien independientemente de la expresión de ALPG. No se observó citotoxicidad en las células T de control negativo sólo con RNP. En conjunto con los datos de IHC que analizan la expresión de antígenos en muestras de pacientes con cáncer de ovario, y los resultados del ensayo de citotoxicidad por heterogeneidad del antígeno cebador demuestran que las células T de compuerta lógica/ARNhc son capaces de eliminar poblaciones heterogéneas de células cancerosas que expresan el antígeno cebador sólo en una pequeña minoría de células.

Ejemplo 10: Caracterización in vivo de circuitos ARNhc y LG adicionales

[001056] Materiales y métodos

[001057] Se modificaron células T de dos donantes para expresar los tres circuitos de ARNhc LG1 y FAS/PTPN2 como se describe en el Ejemplo 9 usando los métodos de ingeniería descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Las células se congelaron y se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Para los ensayos de control de calidad (QC), las células T de control solo RNP de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. A continuación, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR utilizando PE anti-myc y APC anti-FLAG, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar el % de KI.

[001058] Estudio in vivo de doble flanco K526

[001059] Se implantó la cepa NSG doble MHC KO (NSG DKO) (Jackson Laboratories, 025216) con 1e6 de cada una de las células K562-MSLN en el flanco izquierdo y células K562-ALPG/MSLN en el flanco derecho, ambas en solución de Matrigel al 50%. Tres días después de la inoculación de células K562, los ratones fueron asignados aleatoriamente a grupos de tratamiento con tamaños de tumores coincidentes utilizando imágenes bioluminiscentes (BLI) para medir la señal de luciferasa para cuantificar las células tumorales diseñadas, con 7 ratones asignados por condición de tratamiento. El mismo día de la estadificación y la normalización, las células T del circuito ARNhc + LG1 modificadas y las células T solo CAR coincidentes, las células T solo de compuerta lógica o los controles RNP se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día 4 después de la implantación de K562 para cada donante, todas las poblaciones de células T modificadas se normalizaron al % de KI más bajo dentro de ese

donante agregando solo células RNP para diluir las poblaciones modificadas que estaban por encima del % de KI más bajo. A los ratones se les inyectaron 7.5 x 10^6 células T del circuito ARNhc + LG1, células T solo CAR o células T solo de compuerta lógica iv a través de la vena de la cola el día 4. Los volúmenes de los tumores bilaterales se controlaron dos veces por semana mediante un calibrador junto con el peso corporal. El estudio finalizó el día 24.

[001060] Resultados

[001061] Como se muestra en la FIG. 47A y 47B, las células T CAR únicamente inhibió el crecimiento de tumores MSLN/ALPG (FIG. 47B) y MSLN únicamente (FIG. 47A). Por tanto, las células dirigidas a MSLN CAR expresan MSLN.

[001062] Además, cada una de las células T del circuito ARNhc + LG1 completo era específica in vivo e inhibía el crecimiento tumoral de tumores $K562^{MSLN/ALPG}$ (FIG. 47D). Las células T de circuito completo no inhibieron el crecimiento de las células tumorales de MSLN únicamente (FIG. 47C) y, por lo tanto, mostraron selectividad hacia las células que expresan MSLN y ALPG dual.

Ejemplo 11: Caracterización adicional in vitro

[001063] Materiales y métodos

[001064] Ensayo de estimulación continua

[001065] Las células T editadas que expresan el circuito LG1, el circuito completo ARNhc + compuerta lógica o los controles SS1-CAR o TC-210 se enriquecieron con reactivo ALPG-Fc y Dynabeads de Proteína G hasta una pureza >70%. Las células T editadas se normalizaron a una concentración de 8.5x10^4 células T/pocillo y se sembraron en placas de 96 pocillos en 250 uL de medio TexMacs (Miltenyi) suplementado con suero humano al 3% y 50 U/mL de IL-2 humana y se cocultivaron con ALPG y MSLN que sobreexpresan K562 en una proporción efector:diana de 2:1. En los días 2, 5, 7, 9 y 12 después del inicio del cultivo, las células T y las dianas se contaron mediante citometría de flujo y los pocillos se diluyeron para restablecer la cantidad de células T a 8.5 x10^4 y se agregaron células diana nuevas según fuera necesario para restablecer la relación 2:1 E:T. La expansión de las células T y el control diana se cuantificaron como la expansión acumulada de las células T y las células K562 en el cocultivo, respectivamente. Los valores son mediana ± sem. Prueba de Wilcoxon **** < 0.0001, ns > 0.05

[001066] Ensayo de comparación con células CAR T

[001067] Se modificaron células T de tres donantes (ABXFC_ICT 6, 9, 10) para expresar los tres circuitos de ARNhc LG1 y FAS/PTPN2 como se describe en el Ejemplo 9 usando los métodos de ingeniería descritos anteriormente en el Ejemplo 1. Las células se congelaron y se conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas y las células T de control de los mismos donantes se descongelaron y se dejaron reposar durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día del ensayo, las células T modificadas se contaron y se tiñeron para determinar la expresión de PrimeR y CAR usando ALPG-AF647 y MSLN-Bio primario/estreptavidina-PE secundario, respectivamente, y se analizaron mediante citometría de flujo con un Attune NxT. Después de la normalización, las células T se resuspendieron en medio sin IL-7 e IL-15 y se diluyeron en serie antes de agregarlas a placas de ensayo de paredes blancas y fondo plano de 96 pocillos. La dilución en serie de células T da como resultado las siguientes proporciones de cocultivo efector KI+:diana (E:T) una vez que se agregaron 1e4 células diana/pocillo: 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 1:27 y 1:81 en duplicados técnicos. Cada población de células T se cultiva conjuntamente por separado con células diana $K562^{MSLN}$ y $K562^{ALPG/MSLN}$. Las placas preparadas con células T y células diana se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g antes de la incubación a 37 °C durante 72 horas con una membrana transpirable en cada placa. La citotoxicidad al final del cocultivo de 72 horas se midió utilizando un ensayo de luciferasa de extremo.

[001068] Para demostrar aun más la especificidad y la actividad funcional de las células T del circuito de compuerta lógica/ARNhc, se evaluó la producción de citocinas en sobrenadantes tomados de pocillos de cocultivo del ensayo de citotoxicidad con células tumorales K562 modificadas para expresar diferentes combinaciones de ALPG y MSLN (descritas anteriormente). Los sobrenadantes recogidos a las 72 horas de los pocillos 1:1 KI+ E:T en el ensayo de citotoxicidad descrito anteriormente se analizaron para determinar la producción de IFNγ usando un ensayo Luminex. De acuerdo con los datos de citotoxicidad, la producción de IFNγ a partir de células T candidatas de compuerta lógica AB-X/ARNhc se limitó a los pocillos donde estaban presentes las células diana de antígeno dual $K562^{ALPG/MSLN}$. Por el contrario, las células T que portaban el control CAR constitutivo produjeron IFNγ cuando se cultivaron conjuntamente con células diana K562-MSLN o K562-ALPG/MSLN. Estos datos respaldan aun más la idea de que el resultado funcional de las células T candidatas a ARNhc/compuerta

lógica AB-X se limita a condiciones en las que están presentes tanto los antígenos cebadores como los citolíticos.

[001069] Ensayo de citocinas

[001070] La producción de citocinas se evaluó en sobrenadantes tomados de pocillos de cocultivo del ensayo de citotoxicidad con células tumorales K562 diseñadas para expresar diferentes combinaciones de ALPG y MSLN (descritas anteriormente). Los sobrenadantes se recogieron a las 72 horas de los pocillos 1:1 KI+ E:T en el ensayo de citotoxicidad descrito anteriormente y se analizaron para determinar la producción de IFNγ usando un ensayo Luminex.

[001071] Ensayo de citotoxicidad de líneas celulares múltiples

[001072] Cada población de células T se cultivó conjuntamente por separado con células diana K562-ALPG/MSLN, MSTO-ALPG/MSLN y SKOV3-ALPG/MSLN, para evaluar la potencia de la respuesta de las células T contra estas tres líneas celulares diferentes en la diana. Las células T se diluyeron en serie y esto dio como resultado las siguientes proporciones de cocultivo efector KI+:diana (E:T) una vez que se agregaron 1e4 células diana/pocillo: 3:1, 1:1, 1:3, 1:9, 1:27 y 1:81 en duplicados técnicos. Las placas preparadas con células T y células diana se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g antes de la incubación a 37 °C durante 72 horas con una membrana transpirable en cada placa. La citotoxicidad al final del cocultivo de 72 horas se midió utilizando un ensayo de luciferasa de extremo.

[001073] Ensayo de transformación celular

[001074] Se sembraron 1x106 células T que expresaban los circuitos LG1 ARNhc+ AB-1014, AB-1013 o AB-1015 en un pocillo de una placa GRex de 24 pocillos a una densidad de 0.56/ml. Las células se cultivaron durante 5 días en medio completo TexMACS (+3% HS) con o sin citocinas. La cantidad de células y la viabilidad se registraron los días 0, 3, 5 y 7. Como control positivo, se cultivaron $1x10^6$ células Jurkat en el medio sin citocinas en paralelo.

[001075] Resultados

[001076] Las células que expresan solo LG1 (compuerta lógica AB-X) mostraron un mejor control tumoral que SS1-CAR y un control tumoral equivalente como TC-210 (FIG. 48). Sin embargo, las tres células T del circuito ARNhc+ LG1 (AB-1013, AB-1014 y AB-1015) mostraron una expansión de células T y un control tumoral mejorados (por ejemplo, menos expansión tumoral) en el ensayo de estimulación continua en comparación con las células T

LG1 (FIG. 49). Cada donante se normalizó al valor mediano de compuerta lógica AB-X.

[001077] La FIG. 50A muestra que mientras las células T que expresan los CAR anti-MSLN constitutivos eliminaron tanto las células $K562^{MSLN}$ como $K562^{ALPG/MSLN}$, la citotoxicidad de las células T de ARNhc + compuerta lógica (AB-1013, AB-1014 y AB-1015) fue específica para células de antígeno dual $K562^{ALPG/MSLN}$ únicamente. En la FIG. 50A, la citotoxicidad contra células $K562^{MSLN}$ se muestra con líneas discontinuas, la citotoxicidad contra células $K562^{ALPG/MSLN}$ se muestra con líneas continuas. No se observó citotoxicidad en las células T de control negativo sólo con RNP. Por lo tanto, la citotoxicidad de las células T de compuerta lógica contra las células positivas al antígeno citolítico se restringió a condiciones en las que el antígeno cebador también estaba presente. Además, la incorporación del módulo de ARNhc con la compuerta lógica en un circuito completo no provocó una pérdida de especificidad de la compuerta lógica para unirse a sus antígenos diana.

[001078] De acuerdo con los datos de citotoxicidad, la producción de IFNγ a partir de las células T del circuito de compuerta lógica/ARNhc se limitó a muestras con las células diana de antígeno dual $K562^{ALPG/MSLN}$ (FIG. 50B). Por el contrario, las células T que portaban el control constitutivo CAR produjeron IFNγ cuando se cultivaron conjuntamente con células diana $K562^{MSLN}$ o $K562^{ALPG/MSLN}$. No se observó expresión de IFNγ después de la incubación de los tres circuitos ARNhc + LG1, las células T CAR, las células T LG1 o las células T de control después de la incubación con células K562 o $K652^{ALPG}$ de control (no se muestran los datos). Por lo tanto, las células T del circuito de compuerta lógica/ARNhc demuestran un perfil de seguridad mejorado en relación con las células CAR T tanto en ensayos de citotoxicidad como de citocinas. Sin intención de limitarse a ninguna teoría, estos datos indican que el resultado funcional de las células T del circuito de compuerta lógica/ARNhc se limita a condiciones en las que están presentes tanto los antígenos cebadores como los citolíticos.

[001079] El aumento de la potencia de AB-1015 se asoció con un aumento modesto en la actividad de eliminación independiente de ALPG en células $K562^{MSLN}$ y una mayor expresión de IFNγ en comparación con AB-1013 y AB-1014 (FIG. 51). La comparación de los datos del ensayo de citotoxicidad para las diferentes poblaciones de células T frente a las células diana K562-MSLN muestra la reducción significativa en la destrucción de estas células diana negativas para el antígeno principal por parte de las células T LG1 en relación con las células CAR T constitutivas. Se observó un aumento constante en la destrucción de las dianas K562-

MSLN por parte de AB-1015 en relación con los otros candidatos de compuerta lógica/ARNhc AB-X en la E:T más alta de 3:1. De manera similar, tanto AB-1015 como AB-1014 mostraron aumentos pequeños pero significativos en la secreción de IFNγ a una E:T de 1:1 con dianas K562-MSLN; sin embargo, los niveles alcanzados fueron ~100 veces más bajos que los producidos por el control de CAR constitutivo. En conjunto, estos resultados demuestran la mejora significativa en la ventana terapéutica (la diferencia en la actividad contra las células diana K562-ALPG/MSLN frente a las células diana K562-MSLN) mostrada por el circuito de compuerta lógica/ARNhc en relación con los controles de CAR constitutivos.

[001080] La actividad de las tres células T del circuito ARNhc+LG1 también se evaluó en líneas celulares adicionales (células $MSTO^{ALPG/MSLN}$ y $SKOV3^{ALPG/MSLN}$). Los resultados de este ensayo de citotoxicidad demuestran un claro orden de potencia en la diana (calculada por la CE50 de la dosis de células T) de los tres circuitos de compuerta lógica/ARNhc. Como se muestra en la FIG. 52, las tres células T del circuito de compuerta lógica ARNhc+ indujeron la destrucción de la diana. Sin embargo, la citotoxicidad in vitro más potente se observó con la construcción AB-1015 contra múltiples líneas celulares diana. En las diferentes líneas celulares en la diana, las células T AB-1015 fueron consistentemente ~ 2-3 veces más potentes que las células T AB-1013, y AB-1014 mostró una potencia intermedia relativa. En conjunto, estos resultados demuestran que los circuitos de compuerta lógica/ARNhc podrían diseñarse para tener una potencia sintonizable en la diana.

[001081] Además, no se observó transformación celular en células T editadas con los tres circuitos ARNhc+LG1 (AB-1013, AB-1014 o AB-1015) (FIG. 53). Si bien las células Jurkat de control positivo mantuvieron una buena viabilidad y expansión sin citocinas durante todo el ensayo, las células T del circuito ARNhc+LG1 no proliferaron ni sobrevivieron más allá del día 3, lo que demuestra que las células T del circuito ARNhc+LG1 no se transformaron.

Ejemplo 12: Especificidad de unión a células CAR T MSLN

[001082] Métodos

[001083] Ensayos de citotoxicidad

[001084] Se modificaron células T de cuatro donantes para expresar constitutivamente el CAR MSLN (CAR LG1) utilizando el proceso de fabricación descrito en el Ejemplo 1 y se congelaron y conservaron el día 9 después de la activación inicial. Antes del ensayo, las células T modificadas o de control RNP únicamente se descongelaron y se dejaron reposar

durante la noche en medios que incluían 12.5 ng/ml de IL-7 e IL-15 humana. El día del ensayo, las células T de control CAR MSLN y RNP únicamente se contaron y se resuspendieron en medio sin IL-7 e IL-15 y se diluyeron en serie y se agregaron a placas de ensayo de paredes blancas y fondo plano de 96 pocillos. La dilución en serie de células T da como resultado las siguientes proporciones de efector de cocultivo:diana (E:T) una vez que se agregaron 1e4 células diana THP-1 o K562 (control negativo), K562-MSLN (control positivo) y K562-GP2/pocillo: 3:1, 1:1, 1:3 en duplicados técnicos. Las placas preparadas con células T y células diana se incubaron a 37°C durante 24 horas con una membrana transpirable en cada placa. La citotoxicidad al final del cocultivo de 24 horas se midió utilizando un ensayo de luciferasa de extremo.

[001085] Ensayo de polirreactividad

[001086] Se modificaron células T de cuatro donantes para expresar el CAR MSLN como se describió anteriormente. Las células CAR T se cultivaron conjuntamente con tres líneas celulares diferentes: A498 y H1975 en proporciones finales efector:diana (E:T) de 3:1, 1:1, 1:3 en duplicados técnicos. Las placas preparadas con células T y células diana se incubaron a 37°C durante 24 horas con una membrana transpirable en cada placa. La citotoxicidad al final del cocultivo de 24 horas se midió utilizando un ensayo de luciferasa de extremo.

[001087] Resultados

[001088] Como se muestra en la FIG. 54A, las células CAR T de MSLN no reconocieron las células SLC2A9+ (células THP-1). Además, como se muestra en la FIG. 54D, las células CAR T de MSLN no reconocieron las células GP2+ o las células de control negativo K562 (FIG. 54B), pero se unieron a las células de control positivo que expresan MSLN (FIG. 54C). Además, no se observó evidencia de polirreactividad con las células CAR MSLN contra células A498 o células H1975 (FIG. 55).

[001089] Si bien la invención se ha mostrado y se ha descrito particularmente con referencia a una modalidad preferida y varias modalidades alternativas, los expertos en la técnica pertinente entenderán que pueden hacerse diversos cambios en cuanto a forma y detalles en esta sin alejarse del espíritu y el alcance de la invención.

[001090] Todas las referencias, patentes publicadas y solicitudes de patente citadas en el cuerpo de la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia, a todos los efectos.

LISTADO DE SECUENCIAS INFORMAL

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia
1	ALPG/P CDR H1	GFSLTSY
2	ALPG/P CDR H2	WEDGS
3	ALPG/P CDR H3	PHYGSSYVGAMEY
4	ALPG/P CDR L1	RASENIYSYVA
5	ALPG/P CDR L2	NAKSLAS
6	ALPG/P CDR L3	QHHYVSPWT
7	ALPG/P VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWIRQPAGKGLEWIGVIWEDGSTNYHSALISRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARPHYGSSYVGAMEYWGAGTTVTVSS
8	ALPG/P VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYVAWYQQKPGKAPKLLIYNAKSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYVSPWTFGGGTKLEIK
9	primeR ALPG/P ECD scFv de aglutinante completo	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYVAWYQQKPGKAPKLLIYNAKSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYVSPWTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWIRQPAGKGLEWIGVIWEDGSTNYHSALISRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARPHYGSSYVGAMEYWGAGTTVTVSS
10	MSLN LG3 CDR H1	GIDLSLY
11	MSLN LG3 CDR H2	TDDGT
12	MSLN LG3 CDR H3	ETPLSPVNY
13	MSLN LG3 VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSLYRMRWYRQAPGKGLELVALITDDGTSYYADSVKGRFTISRDNAKNS

		VYLQMNSLRAEDTAVYYCNAETPLSPVNYWGQGTTVTVSS
14	MSLN LG1 CDR H1	GGSISNSY
15	MSLN LG1 CDR H2	YHSGN
16	MSLN LG1 CDR H3	QDGVGATTTEEY
17	MSLN LG1 VH	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYHSGNTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVTQDGVGATTTEEYWGQGTLVTVSS
18	primeR CD8bisagra2	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
19	primeR TMD	FMYVAAAAFVLLFFVGCGVLLS
20	primeR STS	RKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNA
21	primeR HNF1a DBD	MVSKLSQLQTELLAALLESGLSKEALLQALGEPGPYLLAGEGPLDKGESCGGGRGELAELPNGLGETRGSEDETDDDGEDFTPPILKELENLSPEEAAHQKAVVETLLQEDPWRVAKMVKSYLQQHNIPQREVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHAGQGGLIEEPTGDELPTKKGRRNRFKWGPASQQILFQAYERQKNPSKEERETLVEECNRAECIQRGVSPSQAQGLGSNLVTEVRVYNWFANRRKEEAFRHKLAM
22	primeR p65 TAD	DEFPTMVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDEDLGALLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLSQISS
23	primeR HNF1a-	MVSKLSQLQTELLAALLESGLSKEALLQALGEPGPYLLA

	p65 TAD	GEGPLDKGESCGGGRGELAELPNGLGETRGSEDETDD DGEDFTPPILKELENLSPEEAAHQKAVVETLLQEDPWRV AKMVKSYLQQHNIPQREVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTP MKTQKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHAGQGGLIEEPT GDELPTKKGRRNRFKWGPASQQILFQAYERQKNPSKEE RETLVEECNRAECIQRGVSPSQAQGLGSNLVTEVRVYN WFANRRKEEAFRHKLAMTCRDEFPTMVFPSGQISQASA LAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPVPVLAPG PPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDEDLGALL GNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPML MEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLPNGLLSGDE DFSSIADMDFSALLSQISS
24	Secuencia completa de la proteína ALPG primeR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYVAWYQQK PGKAPKLLIYNAKSLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQHHYVSPWTFGGGTKLEIKGGGGSGGGG SGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSY GVSWIRQPAGKGLEWIGVIWEDGSTNYHSALISRVTMSV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARPHYGSSYVGAME YWGAGTTVTVSSATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA CFMYVAAAAFVLLFFVGCGVLLSRKRRRQHGQLWFPEG FKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNAMVSKLSQLQT ELLAALLESGLSKEALLQALGEPGPYLLAGEGPLDKGES CGGGRGELAELPNGLGETRGSEDETDDDGEDFTPPILK ELENLSPEEAAHQKAVVETLLQEDPWRVAKMVKSYLQQ HNIPQREVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKTQKRAALY TWYVRKQREVAQQFTHAGQGGLIEEPTGDELPTKKGRR NRFKWGPASQQILFQAYERQKNPSKEERETLVEECNRA ECIQRGVSPSQAQGLGSNLVTEVRVYNWFANRRKEEAF RHKLAMTCRDEFPTMVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQ APAPAPAPAMVSALAQAPAPVPVLAPGPPQAVAPPAPK PTQAGEGTLSEALLQLQFDDEDLGALLGNSTDPAVFTDL

		ASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVT GAQRPPDPAPAPLGAPGLPNGLLSGDEDFSSIADMDFS ALLSQISS
25	Secuencia completa de la proteína ALPG primeR con secuencia señal CD8	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASENIYSYVAWYQQKPGKAPKLLIYNAKSLASGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYVSPW TFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGL VKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVSWIRQPAGKGLEWIGV IWEDGSTNYHSALISRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARPHYGSSYVGAMEYWGAGTTVTVSSATTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACFMYVAAAAFVLLFFVGC GVLLSRKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGE DSVGLKPLKNAMVSKLSQLQTELLAALLESGLSKEALLQ ALGEPGPYLLAGEGPLDKGESCGGGRGELAELPNGLGE TRGSEDETDDDGEDFTPPILKELENLSPEEAAHQKAVVE TLLQEDPWRVAKMVKSYLQQHNIPQREVVDTTGLNQSH LSQHLNKGTPMKTQKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHA GQGGLIEEPTGDELPTKKGRRNRFKWGPASQQILFQAY ERQKNPSKEERETLVEECNRAECIQRGVSPSQAQGLGS NLVTEVRVYNWFANRRKEEAFRHKLAMTCRDEFPTMVF PSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQA PAPVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQF DDEDLGALLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPV APHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGL PNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLSQISS
26	MSLN bisagra CD8a	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG LDFACD
27	MSLN TMD CD8a	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
28	MSLN Co-estimulación 4-	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEG GCEL

	1BB	
29	MSLN activación CD3z	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
30	Secuencia completa proteína LG1 CAR MSLN	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYYWGWI RQPPGKGLEWIGSIYHSGNTYYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLSSVTAADTAVYYCVTQDGVGATTTEEYWGQGT LVTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP R
31	Secuencia completa de la proteína LG3 CAR MSLN	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDLSLYRMRWYR QAPGKGLELVALITDDGTSYYADSVKGRFTISRDNAKNS VYLQMNSLRAEDTAVYYCNAETPLSPVNYWGQGTTVTV SSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELR VKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
32	Secuencia completa de la proteína LG1 CAR MSLN con secuencia señal	MALPVTALLLPLALLLHAARPQLQLQESGPGLVKPSETLS LTCTVSGGSISNSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYHSGNT YYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCVT QDGVGATTTEEYWGQGTLVTVSSAAATTTPAPRPPTPA PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN

		QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR
33	Secuencia completa de la proteína LG3 CAR MSLN con secuencia señal	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGIDLSLYRMRWYRQAPGKGLELVALITDDGTS YYADSVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDTAVYYC NAETPLSPVNYWGQGTTVTVSSAAATTTPAPRPPTPAP TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGL STATKDTYDALHMQALPPR
34	secuencia señal de CD8α	MALPVTALLLPLALLLHAARP
35	Etiqueta Myc	EQKLISEEDL
36	Secuencia completa del ácido nucleico ALPG primeR	gacatacagatgacacagagccctagcagtctgagcgccagtgtgggcgata gagttactatcacttgtagagcatccgagaacatatacagttacgtggcctggtat cagcaaaaacctggcaaagctcccaagttattgatttacaatgctaagagcttg gcctctggggtgccatcgaggttcagcggtagcgggagcgggaccgacttca ctctgaccatctcgagtctccagccggaggactttgcgacatactattgtcaaca ccattacgtatcaccctggaccttcggcggcgggactaagttagagatcaagg gtggaggaggatcaggcggcggtggatcaggaggaggagggtcacaagtg cagttacaggaatcagggcccggcctggtgaagccaagtgaaaccctgagtc tgacgtgcacggtttcaggatttagcctcacttcctacggtgtctcttggattcggc agccagccggcaaagggctcgagtggattggggtgatctgggaagatggctc aacaaactatcattctgcactaatctctcgcgtgacaatgtcggtggacacgtcc aagaatcaattttcccttaaactgtcctccgtgaccgcagccgatacagcggtat attattgcgcgcgacctcactacggatctagctatgtcggcgcgatggagtattg gggcgctggcacaaccgtcaccgtttcttccgcaaccacgacgccagcgccg cgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcc

		ctgaggcgtgcttcatgtacgtggcggcggccgcctttgtgcttctgttcttcgtgg gctgcggggtgctgctgtcccgtaaacgcagacgtcaacacggtcaactgtgg tttccagaaggttttaaggtctccgaagcaagtaagaagaaaagacgtgaacc actgggagaagatagcgtcggtctgaaaccactcaagaatgccatggtttctaa actgagccagctgcagacggagctcctggcggccctgctggagtcagggctg agcaaagaggcactgctccaggcactgggcgagccggggccctacctcctg gctggagaaggccccctggacaaggggagtcctgcggcggcggtcgagg ggagctggctgagctgcccaatgggctgggggagactcggggctccgagga cgagaccgacgacgatggggaagacttcacgccacccatcctcaaagagct ggagaacctcagccctgaggaggcggcccaccagaaagccgtggtggaga cccttctgcaggaggacccgtggcgtgtggcgaagatggtcaagtcctacctgc agcagcacaacatcccacagcgggaggtggtcgataccactggcctcaacc agtcccacctgtcccaacacctcaacaagggcactcccatgaagacgcaga agcgggccgccctgtacacctggtatgtccgcaagcagcgagaggtggcgca gcagttcacccatgcagggcagggagggctgattgaagagcccacaggaga tgagctaccaaccaagaaggggcggaggaaccgtttcaagtggggcccagc atcccagcagatcctgttccaggcctatgagaggcagaagaaccctagcaag gaggagcgagaaacgctagtggaggagtgcaatagggcggaatgcatcca gagaggtgtgtcaccatcacaagcacaaggtctgggctccaacctcgtcacgg aggtgcgtgtctacaactggtttgccaaccggcgcaaagaagaagccttccgg cacaagctggccatgacctgcagggatgagtttcccaccatggtgtttccttctgg gcagatcagccaggcctcggccttggccccggcccctccccaagtcctgcccc aggctccagcccctgcccctgctccagccatggtatcagctctggcccaggcc ccagcccctgtcccagtcctagccccaggccctcctcaagctgtggccccacct gcccccaagcccacccaagctggggaaggaacgctgtcagaggccctgctg cagctgcagtttgatgatgaagacctgggggccttgcttggcaacagcacaga cccagctgtgttcacagacctggcatccgtcgacaactccgagtttcagcagct gctgaaccagggcatacctgtggcccccacacaactgagcccatgctgatg gagtaccctgaggctataactcgcctagtgacaggggcccagaggcccccg acccagctcctgctccactgggggccccggggctccccaatggcctcctttcag gagatgaagacttctcctccattgcggacatggacttctcagccctgctgagtca

		gatcagctcc
37	Secuencia completa del ácido nucleico LG1 CAR MSLN	CAGTTGCAGTTACAGGAGAGCGGACCCGGTCTGGTT AAACCGTCTGAAACACTGAGTTTGACATGTACAGTGT CCGGCGGCTCGATTTCAAACTCTTACTATTGGGGCTG GATTAGGCAGCCTCCCGGGAAAGGGCTCGAGTGGAT CGGGTCCATATATCACTCAGGAAATACCTACTACAAC CCAAGTCTTAAGTCTAGAGTGACAATCAGTGTGGATA CGTCCAAGAATCAATTCTCCCTGAAGCTCTCAAGCGT GACCGCCGCCGACACCGCAGTGTATTATTGCGTAACT CAAGACGGTGTGGGCGCTACCACTACCGAAGAGTATT GGGGACAAGGCACTCTTGTCACAGTCTCCAGCGCGG CAGCAaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccacc atcgcgtcgcagccactgtcactgcgcccagaagcgtgccggccagcggcg gggggcgcagtgcacacgaggggctggacttcgcctgtgatatctacatctg ggcgcccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttta ctgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgag accagtacaaactactcaagaagaggacggctgtagctgccgatttccagaa gaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcaga cgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatcta ggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagaggcgtggccgggaccct gagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtaca atgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaa aggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcag tacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccct agg
38	Secuencia completa del ácido nucleico LG3 CAR MSLN	GAAGTTCAGCTCGTGGAGAGTGGAGGCGGGTTAGTG CAACCCGGCGGGTCTTTGAGATTGAGTTGTGCTGCGT CTGGAATTGACCTGTCCCTGTACCGAATGAGGTGGTA TCGACAAGCACCGGGCAAAGGGCTGGAACTCGTGGC TCTAATCACCGATGACGGTACAAGCTACTACGCAGAC TCCGTCAAGGGCCGTTTCACAATATCACGCGATAACG

		CCAAAAATAGCGTGTATCTACAGATGAACAGTCTGCG AGCCGAGGATACCGCCGTGTATTACTGCAATGCCGAG ACACCTCTGTCGCCAGTTAACTATTGGGGTCAGGGAA CTACGGTAACTGTCTCAAGCGCGGCAGCAaccacgacgc cagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagCCAct gTCActgcgcccaGAAgcgtgccggccagcggcgggggcgcagtgca cacgaggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgg gacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcag aaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactact caagaagaggacggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggagg atgtgaactgAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGC CCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAA CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT TTGGACAAGAGGcgtGGCCGGGACCCTGAGATGGGGG GAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGT ACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTA CAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGG CAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG GCCCTGCCCCCTAGG
39	ARNm de FAS NCBI NM_000043.6	CTCTTCTCCCGCGGGTTGGTGGACCCGCTCAGTACG GAGTTGGGGAAGCTCTTTCACTTCGGAGGATTGCTCA ACAACCATGCTGGGCATCTGGACCCTCCTACCTCTGG TTCTTACGTCTGTTGCTAGATTATCGTCCAAAAGTGTT AATGCCCAAGTGACTGACATCAACTCCAAGGGATTGG AATTGAGGAAGACTGTTACTACAGTTGAGACTCAGAA CTTGGAAGGCCTGCATCATGATGGCCAATTCTGCCAT AAGCCCTGTCCTCCAGGTGAAAGGAAAGCTAGGGACT GCACAGTCAATGGGGATGAACCAGACTGCGTGCCCT GCCAAGAAGGGAAGGAGTACACAGACAAAGCCCATTT TTCTTCCAAATGCAGAAGATGTAGATTGTGTGATGAAG

		GACATGGCTTAGAAGTGGAAATAAACTGCACCCGGAC CCAGAATACCAAGTGCAGATGTAAACCAAACTTTTTTT GTAACTCTACTGTATGTGAACACTGTGACCCTTGCAC CAAATGTGAACATGGAATCATCAAGGAATGCACACTC ACCAGCAACACCAAGTGCAAAGAGGAAGGATCCAGAT CTAACTTGGGGTGGCTTTGTCTTCTTCTTTTGCCAATT CCACTAATTGTTTGGGTGAAGAGAAAGGAAGTACAGA AAACATGCAGAAAGCACAGAAAGGAAAACCAAGGTTC TCATGAATCTCCAACTTTAAATCCTGAAACAGTGGCAA TAAATTTATCTGATGTTGACTTGAGTAAATATATCACCA CTATTGCTGGAGTCATGACACTAAGTCAAGTTAAAGG CTTTGTTCGAAAGAATGGTGTCAATGAAGCCAAAATAG ATGAGATCAAGAATGACAATGTCCAAGACACAGCAGA ACAGAAAGTTCAACTGCTTCGTAATTGGCATCAACTTC ATGGAAAGAAAGAAGCGTATGACACATTGATTAAAGAT CTCAAAAAAGCCAATCTTTGTACTCTTGCAGAGAAAAT TCAGACTATCATCCTCAAGGACATTACTAGTGACTCAG AAAATTCAAACTTCAGAAATGAAATCCAAAGCTTGGTC TAGAGTGAAAAACAACAAATTCAGTTCTGAGTATATGC AATTAGTGTTTGAAAAGATTCTTAATAGCTGGCTGTAA ATACTGCTTGGTTTTTTACTGGGTACATTTTATCATTTA TTAGCGCTGAAGAGCCAACATATTTGTAGATTTTTAAT ATCTCATGATTCTGCCTCCAAGGATGTTTAAAATCTAG TTGGGAAAACAAACTTCATCAAGAGTAAATGCAGTGG CATGCTAAGTACCCAAATAGGAGTGTATGCAGAGGAT GAAAGATTAAGATTATGCTCTGGCATCTAACATATGAT TCTGTAGTATGAATGTAATCAGTGTATGTTAGTACAAA TGTCTATCCACAGGCTAACCCCACTCTATGAATCAATA GAAGAAGCTATGACCTTTTGCTGAAATATCAGTTACTG AACAGGCAGGCCACTTTGCCTCTAAATTACCTCTGATA ATTCTAGAGATTTTACCATATTTCTAAACTTTGTTTATA

		ACTCTGAGAAGATCATATTTATGTAAAGTATATGTATTT GAGTGCAGAATTTAAATAAGGCTCTACCTCAAAGACCT TTGCACAGTTTATTGGTGTCATATTATACAATATTTCAA TTGTGAATTCACATAGAAAACATTAAATTATAATGTTTG ACTATTATATATGTGTATGCATTTTACTGGCTCAAAACT ACCTACTTCTTTCTCAGGCATCAAAAGCATTTTGAGCA GGAGAGTATTACTAGAGCTTTGCCACCTCTCCATTTTT GCCTTGGTGCTCATCTTAATGGCCTAATGCACCCCCA AACATGGAAATATCACCAAAAAATACTTAATAGTCCAC CAAAAGGCAAGACTGCCCTTAGAAATTCTAGCCTGGT TTGGAGATACTAACTGCTCTCAGAGAAAGTAGCTTTGT GACATGTCATGAACCCATGTTTGCAATCAAAGATGATA AAATAGATTCTTATTTTTCCCCCACCCCCGAAAATGTT CAATAATGTCCCATGTAAAACCTGCTACAAATGGCAG CTTATACATAGCAATGGTAAAATCATCATCTGGATTTA GGAATTGCTCTTGTCATACCCCCAAGTTTCTAAGATTT AAGATTCTCCTTACTACTATCCTACGTTTAAATATCTTT GAAAGTTTGTATTAAATGTGAATTTTAAGAAATAATATT TATATTTCTGTAAATGTAAACTGTGAAGATAGTTATAAA CTGAAGCAGATACCTGGAACCACCTAAAGAACTTCCA TTTATGGAGGATTTTTTTGCCCCTTGTGTTTGGAATTA TAAAATATAGGTAAAAGTACGTAATTAAATAATGTTTTT GGTATTTCTGGTTTTCTCTTTTTTGGTAGGGGCTTGCT TTTTGGTTTTGTCTTCCTTTTCTCTAACTGATGCTAAAT ATAACTTGTCTTTAATGCTTCTTGGATCCCTTAGAAGG TACTTCCTTTTTAACCTTAACCCTTTTAGTAGTTAAATA ATTATTTCCATAGGTTGCTATTGCCAAGAAGACCTCTT CCAAACAGCACATGATTATTCGTCAAACAGTTTCGTAT TCCAGATACTGGAATGTGGATAAGAAAGTATACATTTC AAGGGGTAGGTTTTATTATTAAGAAAGCCAAATGAGG ATTTTGAAATATTCTTTCCTGCATATTATCCATTCTAGC

		TACATGCTGGCCAGTGGGCCACCTTTCTTTTCTGCAA TTTAATGCTAGTAATATATTCTATTTAACCCATGAGTCC CAAAGTATTAGCATTTCAACATGTAAGCATGTCGGTAA GATAGTTGTGCTTTGCTTAGGGTTCCCTCCTGTGTTAT GGTCTGGAAAGTGTCTTTAGGCAGAAAGTCTGAGTGA TCACAGGGTTCACTCATTAATTTCTCTTTTCTGAGCCA TCATAGTCTGTGCTGTCTGCTCTCCAGTTTTCTATTTC TAGACAGAAGTAGGGCAAGTTAGGTACTAGTTATTCTT CATGGCCAGAAGTGCAAGTTCTACTTTGCAAGACAAG ATTAAGTTAGAGAACACCCTATTCCACTTTGGTGAACT CAGAGCAAGAACTTTGAGTTCCTTTGGGAGGAAGACA GTGGAGAAGTCTTTGTACTTGGTGATGTGGTTTTTTTC CTCATGGCTTCACCTAGTGGCCCCAAGCATGACTTCT CCCATGTCAATGAGCACAGCCACATTCCCGAGTTGAG GTGACCCCACGGTCCAGAATCATCCTCATTCTGGTGA ACCTGGTTCTCTTTGTGGTGGGCATACTGGGTAGGAG AATCACCCAAAGGTCACCCATGAGCTGCAGAAAAAAA GGCTATTTGCAGAAGGAGCTCACAGATCACATTGAAA GCATTGCATATTCAAACATCTTGGTCTTCTTTATTGGC ATGCCCACAGGGTCTTCTGACCTCTGATTAGATCAGA CACTTTTTAGATATTGAATCATCAGTTTCTGTACAACTA TCTGAATAAGGTATATAATCAATGAAATTTAGAATTTTT TTCTATGCTTACTCCTGATTGGTAATTTGTTTGGGTTTA GAATTCTATACAAGGCCATTTGTAATTTTCCTCAGCAC TTTAAAAATATTAAACCATGTTTTCTTAA
40	ARNm de PTPN2 NCBI NM_002828.4	GCATGCGCCGCAGCGCCAGCGCTCTCCCCGGATCGT GCGGGGCCTGAGCCTCTCCGCCGGCGCAGGCTCTG CTCGCGCCAGCTCGCTCCCGCAGCCATGCCCACCAC CATCGAGCGGGAGTTCGAAGAGTTGGATACTCAGCGT CGCTGGCAGCCGCTGTACTTGGAAATTCGAAATGAGT CCCATGACTATCCTCATAGAGTGGCCAAGTTTCCAGA

		AAACAGAAATCGAAACAGATACAGAGATGTAAGCCCA TATGATCACAGTCGTGTTAAACTGCAAAATGCTGAGAA TGATTATATTAATGCCAGTTTAGTTGACATAGAAGAGG CACAAAGGAGTTACATCTTAACACAGGGTCCACTTCC TAACACATGCTGCCATTTCTGGCTTATGGTTTGGCAG CAGAAGACCAAAGCAGTTGTCATGCTGAACCGCATTG TGGAGAAAGAATCGGTTAAATGTGCACAGTACTGGCC AACAGATGACCAAGAGATGCTGTTTAAAGAAACAGGA TTCAGTGTGAAGCTCTTGTCAGAAGATGTGAAGTCGT ATTATACAGTACATCTACTACAATTAGAAAATATCAATA GTGGTGAAACCAGAACAATATCTCACTTTCATTATACT ACCTGGCCAGATTTTGGAGTCCCTGAATCACCAGCTT CATTTCTCAATTTCTTGTTTAAAGTGAGAGAATCTGGC TCCTTGAACCCTGACCATGGGCCTGCGGTGATCCACT GTAGTGCAGGCATTGGGCGCTCTGGCACCTTCTCTCT GGTAGACACTTGTCTTGTTTTGATGGAAAAAGGAGAT GATATTAACATAAAACAAGTGTTACTGAACATGAGAAA ATACCGAATGGGTCTTATTCAGACCCCAGATCAACTG AGATTCTCATACATGGCTATAATAGAAGGAGCAAAATG TATAAAGGGAGATTCTAGTATACAGAAACGATGGAAA GAACTTTCTAAGGAAGACTTATCTCCTGCCTTTGATCA TTCACCAAACAAAATAATGACTGAAAAATACAATGGGA ACAGAATAGGTCTAGAAGAAGAAAAACTGACAGGTGA CCGATGTACAGGACTTTCCTCTAAAATGCAAGATACAA TGGAGGAGAACAGTGAGAGTGCTCTACGGAAACGTAT TCGAGAGGACAGAAAGGCCACCACAGCTCAGAAGGT GCAGCAGATGAAACAGAGGCTAAATGAGAATGAACGA AAAAGAAAAAGGTGGTTATATTGGCAACCTATTCTCAC TAAGATGGGGTTTATGTCAGTCATTTTGGTTGGCGCTT TTGTTGGCTGGACACTGTTTTTTCAGCAAAATGCCCTA TAAACAATTAATTTTGCCCAGCAAGCTTCTGCACTAGT

		AACTGACAGTGCTACATTAATCATAGGGGTTTGTCTGC AGCAAACGCCTCATATCCCAAAAACGGTGCAGTAGAA TAGACATCAACCAGATAAGTGATATTTACAGTCACAAG CCCAACATCTCAGGACTCTTGACTGCAGGTTCCTCTG AACCCCAAACTGTAAATGGCTGTCTAAAATAAAGACAT TCATGTTTGTTAAAAACTGGTAAATTTTGCAACTGTATT CATACATGTCAAACACAGTATTTCACCTGACCAACATT GAGATATCCTTTATCACAGGATTTGTTTTTGGAGGCTA TCTGGATTTTAACCTGCACTTGATATAAGCAATAAATA TTGTGGTTTTATCTACGTTATTGGAAAGAAAATGACAT TTAAATAATGTGTGTAATGTATAATGTACTATTGACATG GGCATCAACACTTTTATTCTTAAGCATTTCAGGGTAAA TATATTTTATAAGTATCTATTTAATCTTTTGTAGTTAACT GTACTTTTTAAGAGCTCAATTTGAAAAATCTGTTACTAA AAAAATAAATTGTATGTCGATTGAATTGTACTGGATAC ATTTTCCATTTTTCTAAAGAGAAGTTTGATATGAGCAG TTAGAAGTTGGAATAAGCAATTTCTACTATATATTGCAT TTCTTTTATGTTTTACAGTTTTCCCCATTTTAAAAAGAA AAGCAAACAAAGAAACAAAAGTTTTTCCTAAAAATATC TTTGAAGGAAAATTCTCCTTACTGGGATAGTCAGGTAA ACAGTTGGTCAAGACTTTGTAAAGAAATTGGTTTCTGT AAATCCCATTATTGATATGTTTATTTTTCATGAAAATTT CAATGTAGTTGGGGTAGATTATGATTTAGGAAGCAAAA GTAAGAAGCAGCATTTTATGATTCATAATTTCAGTTTA CTAGACTGAAGTTTTGAAGTAAACACTTTTCAGTTTCT TTCTACTTCAATAAATAGTATGATTATATGCAAACCTTA CATTGTCATTTTAACTTAATGAATATTTTTTAAAGCAAA CTGTTTAATGAATTTAACTGCTCATTTGAATGCTAGCTT TCCTCAGATTTCAACATTCCATTCAGTGTTTAATTTGTC TTACTTAAACTTGAAATTGTTGTTACAAATTTAATTGCT AGGAGGCATGGATAGCATACATTATTATGGATAGCAT

		ACCTTATTTCAGTGGTTTTCAAACTATGCTCATTGGAT GTCCAGGTGGGTCAAGAGGTTACTTTCAACCACAGCA TCTCTGCCTTGTCTCTTTATATGCCACATAAGATTTCT GCATAAGGCTTAAGTATTTTAAAGGGGGCAGTTATCAT TTAAAAACAGTTTGGTCGGGCGCGGTGGCTCATGCCT GTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAAGTGGGCAGAT CACCTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCCAA CGTGGTGAAACACCATCTCTACTAAAAATGCAAAAATT AGCTGGGCATGGTGGAGGGCACCTGTAATCTCAGCT ACTCAGGAGGCTGAGGTAGGAGAATTGCTTGAACCCA GGAGATGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACGTCAC TGCACTCCAGCCAGGGCGACAGAGCGAGACTCCATC TCAAAAGAAACAAACAAAAAAAACAGTTTGGGCCGGG TGTGGTGGCTCACGCTTGTAATCCCAGCACTTCGGAA GGCCAAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAAGAGATGGA GACTGTCCTGGCCAACATGGTGAAATCCCTTCTTTACT AAAAATACAAAAATTATCTGGGCGTGGTGGTGCATGC CTGTAGTCCCAGCTCCTTGGGAGGCTAAGGCAGGAG AATCACTTGAACCCGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAG CCGAGATTGCACCACTGCACTCCAGCCTGGCAACAGA GCAAGACTTCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTT GAAAACCATTGGTATAGATAGATATTTTGAATTGATTT GCATAGTCTCCTTGAATGTGTTAAATTATGTTGAAAGT ATGAAAGCAGGATGTAGGTGGTACTACATATTAAATAA GATTTATATAACA
41	ARNm de TOX NCBI NM_014729.3	CTCTTCTTCTTAAACAAACCACAAACGGATGTGAGGG AAGGAAGGTGTTTCTTTTACTCCTGAGCCCAGACACC TCACTCTGTTCCGTCTAAGCTTGTTTTGCTGAACACTT TTTTTTAAAAAAGGAAAAAGAAAAGGAGTTGCTTGATG TGAGAGTGAAATGGACGTAAGATTTTATCCACCTCCA GCCCAGCCCGCCGCTGCGCCCGACGCTCCCTGTCTG

		GGACCTTCTCCCTGCCTGGACCCCTACTATTGCAACA AGTTTGACGGTGAGAACATGTATATGAGCATGACAGA GCCGAGCCAGGACTATGTGCCAGCCAGCCAGTCCTA CCCTGGTCCAAGCCTGGAAAGTGAAGACTTCAACATT CCACCAATTACTCCTCCTTCCCTCCCAGACCACTCGC TGGTGCACCTGAATGAAGTTGAGTCTGGTTACCATTC TCTGTGTCACCCCATGAACCATAATGGCCTGCTACCA TTTCATCCACAAAACATGGACCTCCCTGAAATCACAGT CTCCAATATGCTGGGCCAGGATGGAACACTGCTTTCT AATTCCATTTCTGTGATGCCAGATATACGAAACCCAGA AGGAACTCAGTACAGTTCCCATCCTCAGATGGCAGCC ATGAGACCAAGGGGCCAGCCTGCAGACATCAGGCAG CAGCCAGGAATGATGCCACATGGCCAGCTGACTACCA TTAACCAGTCACAGCTAAGTGCTCAACTTGGTTTGAAT ATGGGAGGAAGCAATGTTCCCCACAACTCACCATCTC CACCTGGAAGCAAGTCTGCAACTCCTTCACCATCCAG TTCAGTGCATGAAGATGAAGGCGATGATACCTCTAAG ATCAATGGTGGAGAGAAGCGGCCTGCCTCTGATATGG GGAAAAAACCAAAAACTCCCAAAAAGAAGAAGAAGAA GGATCCCAATGAGCCCCAGAAGCCTGTGTCTGCCTAT GCGTTATTCTTTCGTGATACTCAGGCCGCCATCAAGG GCCAAAATCCAAACGCTACCTTTGGCGAAGTCTCTAA AATTGTGGCTTCAATGTGGGACGGTTTAGGAGAAGAG CAAAAACAGGTCTATAAAAAGAAAACCGAGGCTGCGA AGAAGGAGTACCTGAAGCAACTCGCAGCATACAGAGC CAGCCTTGTATCCAAGAGCTACAGTGAACCTGTTGAC GTGAAGACATCTCAACCTCCTCAGCTGATCAATTCGA AGCCGTCGGTGTTCCATGGGCCCAGCCAGGCCCACT CGGCCCTGTACCTAAGTTCCCACTATCACCAACAACC GGGAATGAATCCTCACCTAACTGCCATGCATCCTAGT CTCCCCAGGAACATAGCCCCCAAGCCGAATAACCAAA

		TGCCAGTGACTGTCTCTATAGCAAACATGGCTGTGTC CCCTCCTCCTCCCCTCCAGATCAGCCCGCCTCTTCAC CAGCATCTCAACATGCAGCAGCACCAGCCGCTCACCA TGCAGCAGCCCCTTGGGAACCAGCTCCCCATGCAGG TCCAGTCTGCCTTACACTCACCCACCATGCAGCAAGG ATTTACTCTTCAACCCGACTATCAGACTATTATCAATC CTACATCTACAGCTGCACAAGTTGTCACCCAGGCAAT GGAGTATGTGCGTTCGGGGTGCAGAAATCCTCCCCC ACAACCGGTGGACTGGAATAACGACTACTGCAGTAGT GGGGGCATGCAGAGGGACAAAGCACTGTACCTTACTT GAGAATCTGAACACCTCTTCTTTCCACTGAGGAATTCA GGGAAGTGTTTTCACCATGGATTGCTTTGTACAGTCAA GGCAGTTCTCCATTTTATTAGAAAATACAAGTTGCTAA GCACTTAGGACCATTTGAGCTTGTGGGTCACCCACTC TGGAAGAAATAGTCATGCTTCTTTATTATTTTTTTAATC CTTTATGGACATTGTTTTTCTTCTTCCCTGAAGGAAATT TGGACCATTCAGATTTTATGTTGGTTTTTTGCTGTGAA GTGCTGCGCTCTAGTAACTGCCTTAGCAACTGTAGAT GTCTCGGATAAAAGTCCTGGATTTTCCATTGGTTTTCA TAATGGGTGTTTATATGAAACTACTAAAGACTTTTTAAA TGGCTTGATGTAGCAGTCATAGCAAGTTTGTAAATAGC ATCTATGTTACACTCTCCTAGAGTATAAAATGTGAATG TTTTTGTAGCTAAATTGTAATTGAAACTGGCTCATTCC AGTTTATTGATTTCACAATAGGGGTTAAATTGGCAAAC ATTCATATTTTTACTTCATTTTTAAAACAACTGACTGAT AGTTCTATATTTTCAAAATATTTGAAAATAAAAAGTATT CCCAAGTGATTTTAATTTAAAAACAAATTGGCTTTGTCT CATTGATCAGACAAAAAGAAACTAGTATTAAGGGAAG CGCAAACACATTTATTTTGTACTGCAGAAAAATTGCTT TTTTGTATCACTTTTTGTGTAATGGTTAGTAAATGTCAT TTAAGTCCTTTTATGTATAAAACTGCCAAATGCTTACCT

		GGTATTTTATTAGATGCAGAAACAGATTGGAAACAGCT AAATTACAACTTTTACATATGGCTCTGTCTTATTGTTTC TTCATACTGTGTCTGTATTTAATCTTTTTTTATGGAACC TGTTGCGCCTATTTATGAAATAATAAATATAGGTGTTT GTAAGTAAATTTGTTAGTATTTGAAAGAGGTTTCTTTG ATGTTTTAACTTTTGCTGGCAAAAAAAAATTCACGCTT GGTGTGAATACTTTATTATTTAGTTTTTACAGTAACATG AATAAAGCCAAACCTGCTTTTCATTTAGCAGCAAATTA AAGTAACCAGTCCTTATTTCTGCATTTCTTTGGTTGAT GCAAACAAAAAACTATTATATTTAAGAACTTTATTTCTT CATACGACATAACAGAATTGCCCTCCAAGTCACACAA GCTCCAAGACTAAACAAACAGACAGGTCCTCTGTCTT AAAAAGGTTACTTCTTGGTTCTCAGCTGGTTCTAGTCA ATTCTGAACCACCACCCCCCGCCCCCCGCAAAAAAGT AAAAGTCAAACCAAACTTCCTCAAGCTGCATGCTTTTC ACAAAATCCAGAAAGCATTTAAGAATTGAACTAGGGG CTGGAAGAAGTGAAAGGGAAGCATCTAAAAATGAAAG GTGAGTAACCAGATAGCAAAAGAAAAGGGAAAGCCAT CCAAATTTGAAAGCTGTTGATAGAAATTGAGATTCTTG CTGTCTTTTGTGCCTCTACAAGCTACTACTCATTCCAG AATTCCTGGGTCTTCCAAGAGGATTCTTAAGGTACCA GAGATTTGCTAGGGAACCAAAAGTGCTTGAGAATCTG CCTGAGGGCTTGCATAGCTTTCACATTAAAAAAAGAAA AAGCTAGCAGATTTACTCCTTTTTAGGGGATCATATCA AGAAAGTTAGTCTGGTTGGAAACCAAGAGAATGGCTG ATGTCTCTTTCTTGGAATATGTGAAATAAATTTAGCAG TTTAACTAAATACAAATATATGCATTGTGTAATCCACTC AGAATTAAACAGACAAAAGGTATGCTTGCTTTGGAATG ATTTTAGGCATTGTACAACCTTGAATCACTTGAGCATG TAATAACTAATAAATAATGCAGATCCATGTGATTATTAA AATGACTGTAGCTGAGAGCTCTAATTTTCCTGTCTTGA

		AACTGTATAAGAACTCATGTGATTAAGTTCACAGTTTA TTGTTTGTCTGTTTAGTATTTTAGAAATATACCAGCACT ACTAATTAACTAATGTCTTTTATTTATTATATTATGATAA AGTAAAAATTTCACTTGCATTAAGTCTAAACTGAGAAG GTAATTACTGGGAGGAGAATGAGCAGCTTTGACTTTG ACAGGCGGTTTGTGCAGGAAAGCACAGTGCCGTGTT GTTTACAGCTTTTCTAGAGCAGCTGTGCGACCAGGGT AGAGAGTGTTGAAATTCAATACCAAATACAGTAAAAAC AAATGTAAATAAAAGAAAACACATCATCAATAAAACTG TTATTATGCGTGACCGTA
42	guía FAS_1	TAGATTTTAAACATCCTTGGAG
43	guía FAS_1	TAGATTTTAAACATCCTTGGAG
44	guía FAS_6	TTACTCTTGATGAAGTTTGTTT
45	guía FAS_7	TTGAACTTTCTGTTCTGCTGTG
46	guía FAS_8	TTGTCTGTGTACTCCTTCCCTT
47	guía FAS_9	TCTTTGATTGCAAACATGGGTT
48	guía FAS_10	TTGATCTCATCTATTTTGGCTT
49	guía FAS_11	TTAAGAATCTTTTCAAACACTA
50	guía FAS_12	TTCTATTGATTCATAGAGTGGG
51	guía FAS_13	TAATCTTAATCTTTCATCCTCT
52	guía FAS_14	TTAACTTGACTTAGTGTCATGA
53	guía FAS_15	TTACATAAATATGATCTTCTCA
54	guía FAS_16	TACATAAATATGATCTTCTCAG
55	guía FAS_18	TAAAAATCTACAAATATGTTGG
56	guía FAS_19	TTTGGTTTACATCTGCACTTGG
57	FAS_1 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGATCCAAGGATGTTTAAAATCTA TAGTGAAGCCACAGATGTATAGATTTTAAACATCCTTG

		GAGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
58	FAS_1 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGATCCAAGGATGTTTAAAATCTA TAGTGAAGCCACAGATGTATAGATTTTAAACATCCTTG GAGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
59	FAS_6 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCAACAAACTTCATCAAGAGTA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTACTCTTGATGAAGTTT GTTTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
60	FAS_7 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGAACAGCAGAACAGAAAGTTCA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTGAACTTTCTGTTCTGC TGTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT

61	FAS_8 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCAGGGAAGGAGTACACAGAC AATAGTGAAGCCACAGATGTATTGTCTGTGTACTCCTT CCCTTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA TTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
62	FAS_9 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCACCCATGTTTGCAATCAAAG ATAGTGAAGCCACAGATGTATCTTTGATTGCAAACATG GGTTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
63	FAS_10 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCAGCCAAAATAGATGAGATCA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTGATCTCATCTATTTTG GCTTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
64	FAS_11 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCAGTGTTTGAAAAGATTCTTAA

		TAGTGAAGCCACAGATGTATTAAGAATCTTTTCAAACA CTATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
65	FAS_12 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGACCACTCTATGAATCAATAGA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTCTATTGATTCATAGAG TGGGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
66	FAS_13 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCGAGGATGAAAGATTAAGATT ATAGTGAAGCCACAGATGTATAATCTTAATCTTTCATC CTCTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
67	FAS_14 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCCATGACACTAAGTCAAGTTA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTAACTTGACTTAGTGTC ATGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT

		GGTATAAATTAAATCACTTT
68	FAS_15 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCGAGAAGATCATATTTATGTA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTACATAAATATGATCTT CTCATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
69	FAS_16 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGATGAGAAGATCATATTTATGTA TAGTGAAGCCACAGATGTATACATAAATATGATCTTCT CAGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
70	FAS_18 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGACAACATATTTGTAGATTTTTA TAGTGAAGCCACAGATGTATAAAAATCTACAAATATGT TGGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
71	FAS_19 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG

		CTGTTGACAGTGAGCGACAAGTGCAGATGTAAACCAA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTTGGTTTACATCTGCAC TTGGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
72	Guía de PTPN2_1	TATAATACGACTTCACATCTTC
73	Guía de PTPN2_2	TAGAAAGTTCTTTCCATCGTTT
74	Guía de PTPN2_4	TTCTATGTCAACTAAACTGGCA
75	Guía de PTPN2_5	TTAAACAGCATCTCTTGGTCAT
76	Guía de PTPN2_7	TCGAATTTCCAAGTACAGCGGC
77	Guía de PTPN2_8	TTAGAAAGTTCTTTCCATCGTT
78	Guía de PTPN2_9	TAGATGTACTGTATAATACGAC
79	Guía de PTPN2_10	TCTGTATACTAGAATCTCCCTT
80	Guía de PTPN2_11	TTTTATGTTAATATCATCTCCT
81	Guía de PTPN2_13	TGAGAATCTCAGTTGATCTGGG
82	Guía de PTPN2_14	TCTGACAAGAGCTTCACACTGA
83	Guía de PTPN2_15	TTCTATTATAGCCATGTATGAG

84	Guía de PTPN2_16	TGATATTTTCTAATTGTAGTAG
85	PTPN2_1 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGAAAGATGTGAAGTCGTATTAT ATAGTGAAGCCACAGATGTATATAATACGACTTCACAT CTTCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
86	PTPN2_2 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCAACGATGGAAAGAACTTTCT ATAGTGAAGCCACAGATGTATAGAAAGTTCTTTCCATC GTTTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
87	PTPN2_4 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCGCCAGTTTAGTTGACATAGA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTCTATGTCAACTAAACT GGCATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
88	PTPN2_5 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA

		CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCTGACCAAGAGATGCTGTTTA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTAAACAGCATCTCTTGG TCATTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
89	PTPN2_7 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGACCGCTGTACTTGGAAATTCG ATAGTGAAGCCACAGATGTATCGAATTTCCAAGTACA GCGGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGA ATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
90	PTPN2_8 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCACGATGGAAAGAACTTTCTA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTAGAAAGTTCTTTCCAT CGTTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
91	PTPN2_9 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGATCGTATTATACAGTACATCTA TAGTGAAGCCACAGATGTATAGATGTACTGTATAATAC GACTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT

		CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
92	PTPN2_10 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCAGGGAGATTCTAGTATACAG ATAGTGAAGCCACAGATGTATCTGTATACTAGAATCTC CCTTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
93	PTPN2_11 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCGGAGATGATATTAACATAAA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTTTATGTTAATATCATC TCCTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
94	PTPN2_13 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGACCAGATCAACTGAGATTCTC ATAGTGAAGCCACAGATGTATGAGAATCTCAGTTGAT CTGGGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGA ATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
95	PTPN2_14	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC

	completo	CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCCAGTGTGAAGCTCTTGTCAG ATAGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAAGAGCTTCAC ACTGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA TTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
96	PTPN2_15 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGATCATACATGGCTATAATAGA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTCTATTATAGCCATGTA TGAGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
97	PTPN2_16 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGATACTACAATTAGAAAATATCA TAGTGAAGCCACAGATGTATGATATTTTCTAATTGTAG TAGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
98	guía TOX_2	TAAAGTATTCACACCAAGCGTG
99	guía TOX_4	TATGACTGCTACATCAAGCCAT
100	guía TOX_5	TTAAATGACATTTACTAACCAT
101	guía TOX_6	TTAAATTAAAATCACTTGGGAA
102	guía TOX_7	TTTGCTCTTCTCCTAAACCGTC

103	guía TOX_8	TTAGTTAATTAGTAGTGCTGGT
104	guía TOX_9	TAGGTGAGGATTCATTCCCGGT
105	guía TOX_10	TTAGTCTTGGAGCTTGTGTGAC
106	guía TOX_11	TTTAAATTAAAATCACTTGGGA
107	guía TOX_12	TTTTAAATTAAAATCACTTGGG
108	guía TOX_13	TTCAATTACAATTTAGCTACAA
109	guía TOX_15	TTTATTATTTCATAAATAGGCG
110	guía TOX_16	TTACAAACTTGCTATGACTGCT
111	guía TOX_17	TATTATTTCATAAATAGGCGCA
112	TOX_2 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGAACGCTTGGTGTGAATACTTT ATAGTGAAGCCACAGATGTATAAAGTATTCACACCAAG CGTGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
113	TOX_4 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCTGGCTTGATGTAGCAGTCAT ATAGTGAAGCCACAGATGTATATGACTGCTACATCAA GCCATTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA TTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
114	TOX_5 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG

		CTGTTGACAGTGAGCGCTGGTTAGTAAATGTCATTTAA TAGTGAAGCCACAGATGTATTAAATGACATTTACTAAC CATTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
115	TOX_6 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCTCCCAAGTGATTTTAATTTAA TAGTGAAGCCACAGATGTATTAAATTAAAATCACTTGG GAATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
116	TOX_7 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGAACGGTTTAGGAGAAGAGCAA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTTGCTCTTCTCCTAAAC CGTCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
117	TOX_8 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCCCAGCACTACTAATTAACTA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTAGTTAATTAGTAGTGC TGGTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG

		CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
118	TOX_9 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCCCGGGAATGAATCCTCACCT ATAGTGAAGCCACAGATGTATAGGTGAGGATTCATTC CCGGTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA TTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
119	TOX_10 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGATCACACAAGCTCCAAGACTA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTAGTCTTGGAGCTTGT GTGACTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA TTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
120	TOX_11 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCCCCAAGTGATTTTAATTTAAA TAGTGAAGCCACAGATGTATTTAAATTAAAATCACTTG GGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
121	TOX_12 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA

		CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGACCAAGTGATTTTAATTTAAAA TAGTGAAGCCACAGATGTATTTTAAATTAAAATCACTT GGGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
122	TOX_13 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCTGTAGCTAAATTGTAATTGAA TAGTGAAGCCACAGATGTATTCAATTACAATTTAGCTA CAATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
123	TOX_15 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGAGCCTATTTATGAAATAATAAA TAGTGAAGCCACAGATGTATTTATTATTTCATAAATAG GCGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
124	TOX_16 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCGCAGTCATAGCAAGTTTGTA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTACAAACTTGCTATGAC TGCTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT

		TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
125	TOX_17 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCGCGCCTATTTATGAAATAAT ATAGTGAAGCCACAGATGTATATTATTTCATAAATAGG CGCATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
126	Guía ZC3H12A_1	TTATTAAGAAGCATCTTGCTTA
127	Guía ZC3H12A_2	TTGCTTACTGACATGAAGCCAC
128	Guía ZC3H12A_3	TTGTAGGAGAGGATCTCGGCAG
129	guía ZC3H12A_5	TGTATCAACAGGGTGATCGCTT
130	ZC3H12A_1 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCAAGCAAGATGCTTCTTAATA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTATTAAGAAGCATCTTG CTTATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
131	ZC3H12A_2 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA

		CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGATGGCTTCATGTCAGTAAGCA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTGCTTACTGACATGAA GCCACTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA TTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
132	ZC3H12A_3 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGATGCCGAGATCCTCTCCTACA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTGTAGGAGAGGATCTC GGCAGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGA ATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
133	ZC3H12A_5 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCAGCGATCACCCTGTTGATAC ATAGTGAAGCCACAGATGTATGTATCAACAGGGTGAT CGCTTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA TTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
134	Guía NR4A1_4	TCTGTCATTTGTCTTCTTCCTA
135	Guía NR4A1_7	TTGAGGTAGAAGATGCGCTGCA
136	Guía NR4A1_9	TCCTCGAACTTGAAGGAGGCAG
137	Guía NR4A1_10	TTTTCAGTTCCAACTACATGTC
138	Guía NR4A1_11	TTACAAAAAACATAAAGGCCGG
139	Guía NR4A1_12	TATAAATGTCAGAATCTGTCAT

140	Guía NR4A1_13	TATATTAATCAGAAAAGTCACA
141	Guía NR4A1_14	ATATTAATCAGAAAAGTCACAT
142	Guía NR4A1_15	TAATCAGAAAAGTCACATACTA
143	Guía NR4A1_17	TATTAATCAGAAAAGTCACATA
144	Guía NR4A1_19	TTAATCAGAAAAGTCACATACT
145	NR4A1_4 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCAGGAAGAAGACAAATGACAG ATAGTGAAGCCACAGATGTATCTGTCATTTGTCTTCTT CCTATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
146	NR4A1_7 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCGCAGCGCATCTTCTACCTCA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTGAGGTAGAAGATGCG CTGCATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAA TTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA TGGTATAAATTAAATCACTTT
147	NR4A1_9 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGATGCCTCCTTCAAGTTCGAGG ATAGTGAAGCCACAGATGTATCCTCGAACTTGAAGGA GGCAGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGA ATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTT GCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAA

		TGGTATAAATTAAATCACTTT
148	NR4A1_10 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGAACATGTAGTTGGAACTGAAA ATAGTGAAGCCACAGATGTATTTTCAGTTCCAACTACA TGTCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAAT TCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTG CTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAAT GGTATAAATTAAATCACTTT
149	NR4A1_11 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGACGGCCTTTATGTTTTTTGTAA TAGTGAAGCCACAGATGTATTACAAAAAACATAAAGGC CGGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
150	NR4A1_12 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCTGACAGATTCTGACATTTATA TAGTGAAGCCACAGATGTATATAAATGTCAGAATCTGT CATTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
151	NR4A1_13 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG

		CTGTTGACAGTGAGCGCGTGACTTTTCTGATTAATATA TAGTGAAGCCACAGATGTATATATTAATCAGAAAAGTC ACATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
152	NR4A1_14 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCTGTGACTTTTCTGATTAATAT TAGTGAAGCCACAGATGTAATATTAATCAGAAAAGTCA CATTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
153	NR4A1_15 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCAGTATGTGACTTTTCTGATTA TAGTGAAGCCACAGATGTATAATCAGAAAAGTCACATA CTATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
154	NR4A1_17 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCATGTGACTTTTCTGATTAATA TAGTGAAGCCACAGATGTATATTAATCAGAAAAGTCAC ATATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC

		TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
155	NR4A1_19 completo	TGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGA CTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTG CTGTTGACAGTGAGCGCGTATGTGACTTTTCTGATTAA TAGTGAAGCCACAGATGTATTAATCAGAAAAGTCACAT ACTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTT
156	Módulo FAS_11 miR3G - NR4A1_19 miRE	GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAA CGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCG TATCCGTCTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGTGAA ATATATATTAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATTACG GTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTGC GTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATCT CCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAA TCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATT ACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGG TATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCGTATGTGACTTTTC TGATTAATAGTGAAGCCACAGATGTATTAATCAGAAAA GTCACATACTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGC TAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATA CCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATT AAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGACCAGT AGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTCTTTCC CTTCTACAG
157	Módulo FAS_11 miR3G - PTPN2_14 miRE	GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAA CGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCG TATCCGTCTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGTGAA

		ATATATATTAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATTACG GTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTGC GTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATCT CCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAA TCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATT ACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGG TATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGTGTGAAGCTC TTGTCAGATAGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAAGA GCTTCACACTGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG GCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGA ATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGA ATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGACC AGTAGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTCTT TCCCTTCTACAG
158	Módulo FAS_11 miR3G - TOX_4 miRE	GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAA CGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCG TATCCGTCTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGTGAA ATATATATTAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATTACG GTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTGC GTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATCT CCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAA TCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATT ACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGG TATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCTGGCTTGATGTAG CAGTCATATAGTGAAGCCACAGATGTATATGACTGCTA CATCAAGCCATTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGG CTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAA TACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAA TTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGACCA GTAGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTCTTT CCCTTCTACAG

159	Módulo PTPN2_14 miR3G - TOX_4 miRE	GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAA CGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCG TATCCGTCTCTGACAAGAGCTTCACACTGAGTAGTGA AATATATATTAAACTCAGTGTGAAGCTCTTGTCAGTTA CGGTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTT GCGTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCAT CTCCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAG AATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGA TTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAA GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCTGGCTTGATGT AGCAGTCATATAGTGAAGCCACAGATGTATATGACTG CTACATCAAGCCATTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAG GGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACT GAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCT GAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGA CCAGTAGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTC TTTCCCTTCTACAG
160	Módulo ZC3H12A_12 miR3G - PTPN2_14 miRE	GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAA CGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCG TATCCGTCTTAAGAAGCATCTTGCTTACTGGTAGTGAA ATATATATTAAACCAGTAAGCAAGATGCTTCTTATTAC GGTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTG CGTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATC TCCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGA ATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGAT TACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAG GTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGTGTGAAGCT CTTGTCAGATAGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAAG AGCTTCACACTGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGG GGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTG AATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTG

		AATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGAC CAGTAGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTCT TTCCCTTCTACAG
161	Módulo FAS_11 miR3G - NR4A1_12 miRE	GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAA CGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCG TATCCGTCTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGTGAA ATATATATTAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATTACG GTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTGC GTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATCT CCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAA TCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATT ACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGG TATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCTGACAGATTCTGA CATTTATATAGTGAAGCCACAGATGTATATAAATGTCA GAATCTGTCATTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGG CTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAA TACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAA TTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGACCA GTAGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTCTTT CCCTTCTACAG
162	Módulo FAS_13 miR3G - PTPN2_14 miRE	GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAA CGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCG TATCCGTCTAATCTTAATCTTTCATCCTCTGTAGTGAAA TATATATTAAACAGAGGATGAAAGATTAAGATTTTACG GTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTGC GTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATCT CCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAA TCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATT ACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGG TATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGTGTGAAGCTC TTGTCAGATAGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAAGA

		GCTTCACACTGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG GCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGA ATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGA ATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGACC AGTAGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTCTT TCCCTTCTACAG
163	Módulo FAS_11 miR3G - TOX_9 miRE	GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAA CGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCG TATCCGTCTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGTGAA ATATATATTAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATTACG GTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTGC GTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATCT CCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAA TCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATT ACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGG TATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCCGGGAATGAATC CTCACCTATAGTGAAGCCACAGATGTATAGGTGAGGA TTCATTCCCGGTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG GCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGA ATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGA ATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGACC AGTAGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTCTT TCCCTTCTACAG
164	Módulo PTPN2_14 miR3G - TOX_9 miRE	GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAA CGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCG TATCCGTCTCTGACAAGAGCTTCACACTGAGTAGTGA AATATATATTAAACTCAGTGTGAAGCTCTTGTCAGTTA CGGTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTT GCGTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCAT CTCCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAG AATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGA

		TTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAA GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCCGGGAATGAA TCCTCACCTATAGTGAAGCCACAGATGTATAGGTGAG GATTCATTCCCGGTTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAG GGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACT GAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCT GAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGA CCAGTAGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTC TTTCCCTTCTACAG
165	Módulo PTPN2_1 miR3G - ZC3H12A_1 miRE	GTAAGTCGACTCGTTGGATCCCCACTACCCGGATCAA CGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCG TATCCGTCTATAATACGACTTCACATCTTCGTAGTGAA ATATATATTAAACGAAGATGTGAAGTCGTATTATTTAC GGTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTG CGTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATC TCCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGA ATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGAT TACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAG GTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCAAGCAAGATGCT TCTTAATAATAGTGAAGCCACAGATGTATTATTAAGAA GCATCTTGCTTATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGG GCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGA ATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGA ATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGACC AGTAGTGGACTAGTGTGACGCTGCTGACCCCTTTCTT TCCCTTCTACAG
166	AB-1013: LG1_2xSPA_Fas+PTPN2	TAaGGTAcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccc gtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatga ggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtgg ggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggg gatgcggtgggctctatgggataagcttgatatcgaattcatcgatgttaataatta

		acatatatgttaatcattaacatatagttaattattaaccgctatgttaatgattaaca acggttaataattaacatatatgttaatcattaacatataactagtctagagggtat ataatgggggccactagtctactaccagagTtcatcgctagcgctaccggatc cgccaccATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGC CACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGTT GCAGTTACAGGAGAGCGGACCCGGTCTGGTTAAACC GTCTGAAACACTGAGTTTGACATGTACAGTGTCCGGC GGCTCGATTTCAAACTCTTACTATTGGGGCTGGATTA GGCAGCCTCCCGGGAAAGGGCTCGAGTGGATCGGGT CCATATATCACTCAGGAAATACCTACTACAACCCAAGT CTTAAGTCTAGAGTGACAATCAGTGTGGATACGTCCA AGAATCAATTCTCCCTGAAGCTCTCAAGCGTGACCGC CGCCGACACCGCAGTGTATTATTGCGTAACTCAAGAC GGTGTGGGCGCTACCACTACCGAAGAGTATTGGGGA CAAGGCACTCTTGTCACAGTCTCCAGCGCGGCAGCAa ccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcg cagccactgtcactgcgcccagaagcgtgccggccagcggcgggggcgc agtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccctt ggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccctttactgcaaacg gggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtaca aactactcaagaagaggacggctgtagctgccgatttccagaagaagaaga aggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgc gtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaag agaggagtacgatgttttggacaagaggcgtggccgggaccctgagatgggg ggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgca gaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcg ccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccacc aaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctaggtaaaatc aacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctcc ttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatg gctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggc

		ccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccac tggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccctc cctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggg gctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtccttt ccttggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctac gtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctct gcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttggg ccgcctccccgcctggatccttgacttgcggccaacttgtttattgcagcttataat ggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcact gcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgggatccttg acttgcggccgcaactcccacctgcaacatgcgtgactgactgaggccgcga ctctagagtcgaccggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagc gcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaa cgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgta ctggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtc gccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttc gaggggctcgcatctctccttcacgcgcccgccgccctacctgaggccgccat ccacgccggttgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaactg cgtccgccgtctaggtaaGTcgactcgttggatccCCACTACCCGGAT CAACGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATAC GCGTATCCGTCTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGT GAAATATATATTAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATT ACGGTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTT TGCGTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCA TCTCCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACA GAATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGG ATTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAA GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGTGTGAAGC TCTTGTCAGATAGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAA GAGCTTCACACTGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAG GGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACT

		GAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCT GAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGA CCAGTAGTGGactagtgtgacgctgctgacccctttctttcccttctACAG atccaagctgtgaccggcgcctacacctgcagcccaagcttaccatggccttac cagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggcctg acatacagatgacacagagccctagcagtctgagcgccagtgtgggcgatag agttactatcacttgtagagcatccgagaacatatacagttacgtggcctggtatc agcaaaaacctggcaaagctcccaagttattgatttacaatgctaagagcttgg cctctggggtgccatcgaggttcagcggtagcgggagcgggaccgacttcact ctgaccatctcgagtctccagccggaggactttgcgacatactattgtcaacacc attacgtatcaccctggaccttcggcggcgggactaagttagagatcaagggtg gaggaggatcaggcggcggtggatcaggaggaggagggtcacaagtgcag ttacaggaatcagggcccggcctggtgaagccaagtgaaaccctgagtctga cgtgcacggtttcaggatttagcctcacttcctacggtgtctcttggattcggcagc cagccggcaaagggctcgagtggattggggtgatctgggaagatggctcaac aaactatcattctgcactaatctctcgcgtgacaatgtcggtggacacgtccaag aatcaattttcccttaaactgtcctccgtgaccgcagccgatacagcggtatattat tgcgcgcgacctcactacggatctagctatgtcggcgcgatggagtattggggc gctggcacaaccgtcaccgtttcttccgcaaccacgacgccagcgccgcgac caccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgccctga ggcgtgcttcatgtacgtggcggcggccgcctttgtgcttctgttcttcgtgggctgc ggggtgctgctgtcccgtaaacgcagacgtcaacacggtcaactgtggtttcca gaaggttttaaggtctccgaagcaagtaagaagaaaagacgtgaaccactgg gagaagatagcgtcggtctgaaaccactcaagaatgccatggtttctaaactga gccagctgcagacggagctcctggcggccctgctggagtcagggctgagcaa agaggcactgctccaggcactgggcgagccggggccctacctcctggctgga gaaggccccctggacaaggggagtcctgcggcggcggtcgaggggagct ggctgagctgcccaatgggctgggggagactcggggctccgaggacgagac cgacgacgatggggaagacttcacgccacccatcctcaaagagctggagaa cctcagccctgaggaggcggcccaccagaaagccgtggtggagacccttctg caggaggacccgtggcgtgtggcgaagatggtcaagtcctacctgcagcagc

		acaacatcccacagcgggaggtggtcgataccactggcctcaaccagtccca cctgtcccaacacctcaacaagggcactcccatgaagacgcagaagcgggc cgccctgtacacctggtatgtccgcaagcagcgagaggtggcgcagcagttca cccatgcagggcagggagggctgattgaagagcccacaggagatgagctac caaccaagaaggggcggaggaaccgtttcaagtggggcccagcatcccag cagatcctgttccaggcctatgagaggcagaagaaccctagcaaggaggag cgagaaacgctagtggaggagtgcaatagggcggaatgcatccagagaggt gtgtcaccatcacaagcacaaggtctgggctccaacctcgtcacggaggtgcg tgtctacaactggtttgccaaccggcgcaaagaagaagccttccggcacaagc tggccatgacctgcagggatgagtttcccaccatggtgtttccttctgggcagatc agccaggcctcggccttggccccggcccctccccaagtcctgccccaggctcc agcccctgcccctgctccagccatggtatcagctctggcccaggccccagccc ctgtcccagtcctagccccaggccctcctcaagctgtggccccacctgccccca agcccacccaagctggggaaggaacgctgtcagaggccctgctgcagctgc agtttgatgatgaagacctgggggccttgcttggcaacagcacagacccagct gtgttcacagacctggcatccgtcgacaactccgagtttcagcagctgctgaac cagggcatacctgtggcccccacacaactgagcccatgctgatggagtacc ctgaggctataactcgcctagtgacaggggcccagaggccccccgacccag ctcctgctccactgggggccccggggctccccaatggcctcctttcaggagatg aagacttctcctccattgcggacatggacttctcagccctgctgagtcagatcag ctcctaaAGGAaataaaagatctttaatgaaaatAGATCTGTGTGTT GGTTTTTTGTGTGaataaaagatccagagctctagAGATCTGTG TGTTGGTTTTTTGTGTG
167	AB-1014: LG1_TTT_Fas+ PTPN2	TAaGGTAcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccc gtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatga ggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtgg ggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggg gatgcggtgggctctatgggataagcttgatatcgaattcatcgatgttaataatta acatatatgttaatcattaacatatagttaattattaaccgctatgttaatgattaaca acggttaataattaacatatatgttaatcattaacatataactagtctagagggtat ataatgggggccactagtctactaccagagTtcatcgctagcgctaccggatc

		cgccaccATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGC CACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGTT GCAGTTACAGGAGAGCGGACCCGGTCTGGTTAAACC GTCTGAAACACTGAGTTTGACATGTACAGTGTCCGGC GGCTCGATTTCAAACTCTTACTATTGGGGCTGGATTA GGCAGCCTCCCGGGAAAGGGCTCGAGTGGATCGGGT CCATATATCACTCAGGAAATACCTACTACAACCCAAGT CTTAAGTCTAGAGTGACAATCAGTGTGGATACGTCCA AGAATCAATTCTCCCTGAAGCTCTCAAGCGTGACCGC CGCCGACACCGCAGTGTATTATTGCGTAACTCAAGAC GGTGTGGGCGCTACCACTACCGAAGAGTATTGGGGA CAAGGCACTCTTGTCACAGTCTCCAGCGCGGCAGCAa ccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcg cagccactgtcactgcgcccagaagcgtgccggccagcggcgggggcgc agtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccctt ggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacg gggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtaca aactactcaagaagaggacggctgtagctgccgatttccagaagaagaaga aggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgc gtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaag agaggagtacgatgttttggacaagaggcgtggccgggaccctgagatgggg ggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgca gaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcg ccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccacc aaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctaggtaaaatc aacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctcc ttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatg gctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggc ccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccac tggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccctc cctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggg

		gctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtccttt ccttggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctac gtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctct gcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttggg ccgcctccccgcctggatccttgacttgcggccaacttgtttattgcagcttataat ggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcact gcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgggatccttg acttgcggccgcaactcccacctgcaacatgcgtgactgactgaggccgcga ctctagagtcgaccggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagc gcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaa cgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgta ctggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtc gccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttc gaggggctcgcatctctccttcacgcgcccgccgccctacctgaggccgccat ccacgccggttgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaactg cgtccgccgtctaggtaaGTcgactcgttggatccCCACTACCCGGAT CAACGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATAC GCGTATCCGTCTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGT GAAATATATATTAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATT ACGGTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTT TGCGTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCA TCTCCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACA GAATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGG ATTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAA GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGTGTGAAGC TCTTGTCAGATAGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAA GAGCTTCACACTGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAG GGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACT GAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCT GAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGA CCAGTAGTGGactagtgtgacgctgctgacccctttctttcccttctACAG

		atccaagctgtgaccggcgcctacacctgcagcccaagcttTTTatggcctta ccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggcct gacatacagatgacacagagccctagcagtctgagcgccagtgtgggcgata gagttactatcacttgtagagcatccgagaacatatacagttacgtggcctggtat cagcaaaaacctggcaaagctcccaagttattgatttacaatgctaagagcttg gcctctggggtgccatcgaggttcagcggtagcgggagcgggaccgacttca ctctgaccatctcgagtctccagccggaggactttgcgacatactattgtcaaca ccattacgtatcaccctggaccttcggcggcgggactaagttagagatcaagg gtggaggaggatcaggcggcggtggatcaggaggaggagggtcacaagtg cagttacaggaatcagggcccggcctggtgaagccaagtgaaaccctgagtc tgacgtgcacggtttcaggatttagcctcacttcctacggtgtctcttggattcggc agccagccggcaaagggctcgagtggattggggtgatctgggaagatggctc aacaaactatcattctgcactaatctctcgcgtgacaatgtcggtggacacgtcc aagaatcaattttcccttaaactgtcctccgtgaccgcagccgatacagcggtat attattgcgcgcgacctcactacggatctagctatgtcggcgcgatggagtattg gggcgctggcacaaccgtcaccgtttcttccgcaaccacgacgccagcgccg cgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgcc ctgaggcgtgcttcatgtacgtggcggcggccgcctttgtgcttctgttcttcgtgg gctgcggggtgctgctgtcccgtaaacgcagacgtcaacacggtcaactgtgg tttccagaaggttttaaggtctccgaagcaagtaagaagaaaagacgtgaacc actgggagaagatagcgtcggtctgaaaccactcaagaatgccatggtttctaa actgagccagctgcagacggagctcctggcggccctgctggagtcagggctg agcaaagaggcactgctccaggcactgggcgagccggggccctacctcctg gctggagaaggccccctggacaaggggagtcctgcggcggcggtcgagg ggagctggctgagctgcccaatgggctgggggagactcggggctccgagga cgagaccgacgacgatggggaagacttcacgccacccatcctcaaagagct ggagaacctcagccctgaggaggcggcccaccagaaagccgtggtggaga cccttctgcaggaggacccgtggcgtgtggcgaagatggtcaagtcctacctgc agcagcacaacatcccacagcgggaggtggtcgataccactggcctcaacc agtcccacctgtcccaacacctcaacaagggcactcccatgaagacgcaga agcgggccgccctgtacacctggtatgtccgcaagcagcgagaggtggcgca

		gcagttcacccatgcagggcagggagggctgattgaagagcccacaggaga tgagctaccaaccaagaaggggcggaggaaccgtttcaagtggggcccagc atcccagcagatcctgttccaggcctatgagaggcagaagaaccctagcaag gaggagcgagaaacgctagtggaggagtgcaatagggcggaatgcatcca gagaggtgtgtcaccatcacaagcacaaggtctgggctccaacctcgtcacgg aggtgcgtgtctacaactggtttgccaaccggcgcaaagaagaagccttccgg cacaagctggccatgacctgcagggatgagtttcccaccatggtgtttccttctgg gcagatcagccaggcctcggccttggccccggcccctccccaagtcctgcccc aggctccagcccctgcccctgctccagccatggtatcagctctggcccaggcc ccagcccctgtcccagtcctagccccaggccctcctcaagctgtggccccacct gcccccaagcccacccaagctggggaaggaacgctgtcagaggccctgctg cagctgcagtttgatgatgaagacctgggggccttgcttggcaacagcacaga cccagctgtgttcacagacctggcatccgtcgacaactccgagtttcagcagct gctgaaccagggcatacctgtggcccccacacaactgagcccatgctgatg gagtaccctgaggctataactcgcctagtgacaggggcccagaggcccccg acccagctcctgctccactgggggccccggggctccccaatggcctcctttcag gagatgaagacttctcctccattgcggacatggacttctcagccctgctgagtca gatcagctcctaaAGGACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCT CCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCC AGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCA TCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATG GGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGT TGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTG GGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCT CACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTC CTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCAT GCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAG AaACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCA ACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCC CAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCC ttccctgtccttc

168	AB-1015: LG1_Fas+PTPN2	TAaGGTAcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccc gtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatga ggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtgg ggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggg gatgcggtgggctctatgggataagcttgatatcgaattcatcgatgttaataatta acatatatgttaatcattaacatatagttaattattaaccgctatgttaatgattaaca acggttaataattaacatatatgttaatcattaacatataactagtctagagggtat ataatgggggccactagtctactaccagagTtcatcgctagcgctaccggatc cgccaccATGGCCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGC CACTTGCTCTGCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGTT GCAGTTACAGGAGAGCGGACCCGGTCTGGTTAAACC GTCTGAAACACTGAGTTTGACATGTACAGTGTCCGGC GGCTCGATTTCAAACTCTTACTATTGGGGCTGGATTA GGCAGCCTCCCGGGAAAGGGCTCGAGTGGATCGGGT CCATATATCACTCAGGAAATACCTACTACAACCCAAGT CTTAAGTCTAGAGTGACAATCAGTGTGGATACGTCCA AGAATCAATTCTCCCTGAAGCTCTCAAGCGTGACCGC CGCCGACACCGCAGTGTATTATTGCGTAACTCAAGAC GGTGTGGGCGCTACCACTACCGAAGAGTATTGGGGA CAAGGCACTCTTGTCACAGTCTCCAGCGCGGCAGCAa ccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcg cagccactgtcactgcgcccagaagcgtgccggccagcggcgggggcgc agtgcacacgaggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcctt ggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacg gggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtaca aactactcaagaagaggacggctgtagctgccgatttccagaagaagaaga aggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgc gtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaag agaggagtacgatgttttggacaagaggcgtggccgggaccctgagatgggg ggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgca gaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcg

		ccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccacc aaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctaggtaaaatc aacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctcc ttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatg gctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggc ccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccac tggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccctc cctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggg gctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtccttt ccttggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctac gtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctct gcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttggg ccgcctccccgcctggatccttgacttgcggccaacttgtttattgcagcttataat ggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcact gcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgggatccttg acttgcggccgcaactcccacctgcaacatgcgtgactgactgaggccgcga ctctagagtcgaccggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagc gcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggggtcggcaattgaa cgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgta ctggctccgccttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtc gccgtgaacgttcttttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttc gaggggctcgcatctctccttcacgcgcccgccgccctacctgaggccgccat ccacgccggttgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaactg cgtccgccgtctaggtaaGTcgactcgttggatccCCACTACCCGGAT CAACGCCCTAGGTTTATGTTTGGATGAACTGACATAC GCGTATCCGTCTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGT GAAATATATATTAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATT ACGGTAACGCGGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTT TGCGTCGACACTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCA TCTCCATGGCTGTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACA GAATCGTTGCCTGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGG

		ATTACTTCGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAA GGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGCCAGTGTGAAGC TCTTGTCAGATAGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAA GAGCTTCACACTGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAG GGGCTAGAATTCGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACT GAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCT GAATTAAAATGGTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGA CCAGTAGTGGactagtgtgacgctgctgacccctttctttcccttctACAG atccaagctgtgaccggcgcctacacctgcagcccaagcttaccatggccttac cagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggcctg acatacagatgacacagagccctagcagtctgagcgccagtgtgggcgatag agttactatcacttgtagagcatccgagaacatatacagttacgtggcctggtatc agcaaaaacctggcaaagctcccaagttattgatttacaatgctaagagcttgg cctctggggtgccatcgaggttcagcggtagcgggagcgggaccgacttcact ctgaccatctcgagtctccagccggaggactttgcgacatactattgtcaacacc attacgtatcaccctggaccttcggcggcgggactaagttagagatcaagggtg gaggaggatcaggcggcggtggatcaggaggaggagggtcacaagtgcag ttacaggaatcagggcccggcctggtgaagccaagtgaaaccctgagtctga cgtgcacggtttcaggatttagcctcacttcctacggtgtctcttggattcggcagc cagccggcaaagggctcgagtggattggggtgatctgggaagatggctcaac aaactatcattctgcactaatctctcgcgtgacaatgtcggtggacacgtccaag aatcaattttcccttaaactgtcctccgtgaccgcagccgatacagcggtatattat tgcgcgcgacctcactacggatctagctatgtcggcgcgatggagtattggggc gctggcacaaccgtcaccgtttcttccgcaaccacgacgccagcgccgcgac caccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgccctga ggcgtgcttcatgtacgtggcggcggccgcctttgtgcttctgttcttcgtgggctgc ggggtgctgctgtcccgtaaacgcagacgtcaacacggtcaactgtggtttcca gaaggttttaaggtctccgaagcaagtaagaagaaaagacgtgaaccactgg gagaagatagcgtcggtctgaaaccactcaagaatgccatggtttctaaactga gccagctgcagacggagctcctggcggccctgctggagtcagggctgagcaa agaggcactgctccaggcactgggcgagccggggccctacctcctggctgga

		gaaggccccctggacaaggggagtcctgcggcggcggtcgaggggagct ggctgagctgcccaatgggctgggggagactcggggctccgaggacgagac cgacgacgatggggaagacttcacgccacccatcctcaaagagctggagaa cctcagccctgaggaggcggcccaccagaaagccgtggtggagacccttctg caggaggacccgtggcgtgtggcgaagatggtcaagtcctacctgcagcagc acaacatcccacagcgggaggtggtcgataccactggcctcaaccagtccca cctgtcccaacacctcaacaagggcactcccatgaagacgcagaagcgggc cgccctgtacacctggtatgtccgcaagcagcgagaggtggcgcagcagttca cccatgcagggcagggagggctgattgaagagcccacaggagatgagctac caaccaagaaggggcggaggaaccgtttcaagtggggcccagcatcccag cagatcctgttccaggcctatgagaggcagaagaaccctagcaaggaggag cgagaaacgctagtggaggagtgcaatagggcggaatgcatccagagaggt gtgtcaccatcacaagcacaaggtctgggctccaacctcgtcacggaggtgcg tgtctacaactggtttgccaaccggcgcaaagaagaagccttccggcacaagc tggccatgacctgcagggatgagtttcccaccatggtgtttccttctgggcagatc agccaggcctcggccttggccccggcccctccccaagtcctgccccaggctcc agcccctgcccctgctccagccatggtatcagctctggcccaggccccagccc ctgtcccagtcctagccccaggccctcctcaagctgtggccccacctgccccca agcccacccaagctggggaaggaacgctgtcagaggccctgctgcagctgc agtttgatgatgaagacctgggggccttgcttggcaacagcacagacccagct gtgttcacagacctggcatccgtcgacaactccgagtttcagcagctgctgaac cagggcatacctgtggcccccacacaactgagcccatgctgatggagtacc ctgaggctataactcgcctagtgacaggggcccagaggcccccgacccag ctcctgctccactgggggccccggggctccccaatggcctcctttcaggagatg aagacttctcctccattgcggacatggacttctcagccctgctgagtcagatcag ctcctaaAGGAcgggtggcatccctgtgacccctccccagtgcctctcctggc cctggaagttgccactccagtgcccaccagccttgtcctaataaaattaagttgc atcattttgtctgactaggtgtccttctataatattatggggtggaggggggtggtat ggagcaaggggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattg ggaaccaagctggagtgcagtggcacaatcttggctcactgcaatctccgcctc ctgggttcaagcgattctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcat

		gcatgaccaggctcagctaatttttgttttttggtagaaacggggtttcaccatatt ggccaggctggtctccaactcctaatctcaggtgatctacccaccttggcctccc aaattgctgggattacaggcgtgaaccactgctcccttccctgtccttc
169	AB-1013: LG1_2xSPA_Fas+PTPN2 con CDL flanqueante y brazos de homología	GAGCCATGCTTGGCTTACGAGGGCGACCAACCCATC AAACTCCCCGCCCCCAGCACTTTTATTTCTCCTCTTTA GGAAGTACACTTCAGTATCTTTGGCACAGTGCATGAG CACGACTAAAGTAAAACATCGCAGAAAACATAGCTTTA GTCTACCCTTCGTGTCCTAAAAGGAAAACCAGTAGCT TCCCAGGCCACCGGAAGGGCAACACATGTCCTCTGC AGTTTCTGCACACGGGAAGGTAAAGACAGAGAGAGG ACCTACTCCTCAACACAGAAACATTTCAAAATCTTTCC TCGCCTGCAACCCAAGCTGAAGTCATTCTCCCCAGAA ATAACAAAAGTTGGAAGAGAAGCCGGAGACAGGATAG GTGCAGGAAGCCCACACTTTGAGGGCAGCACTCAGA CACCCTCTCCTGTGTGCAGGACGTGCCGAATGTTCAG GTGCAATGAGAATGAGCCATGCTTGGCTTATAaGGTAc gactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttga ccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatc gcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagc aagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggc tctatgggataagcttgatatcgaattcatcgatgttaataattaacatatatgttaat cattaacatatagttaattattaaccgctatgttaatgattaacaacggttaataatt aacatatatgttaatcattaacatataactagtctagagggtatataatgggggcc actagtctactaccagagTtcatcgctagcgctaccggatccgccaccATGG CCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCT GCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGTTGCAGTTACAG GAGAGCGGACCCGGTCTGGTTAAACCGTCTGAAACA CTGAGTTTGACATGTACAGTGTCCGGCGGCTCGATTT CAAACTCTTACTATTGGGGCTGGATTAGGCAGCCTCC CGGGAAAGGGCTCGAGTGGATCGGGTCCATATATCA CTCAGGAAATACCTACTACAACCCAAGTCTTAAGTCTA

		GAGTGACAATCAGTGTGGATACGTCCAAGAATCAATT CTCCCTGAAGCTCTCAAGCGTGACCGCCGCCGACAC CGCAGTGTATTATTGCGTAACTCAAGACGGTGTGGGC GCTACCACTACCGAAGAGTATTGGGGACAAGGCACTC TTGTCACAGTCTCCAGCGCGGCAGCAaccacgacgccagc gccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagccactgtcact gcgcccagaagcgtgccggccagcggcgggggcgcagtgcacacgagg gggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtg gggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaa actcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaa gaggacggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaa ctgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggc cagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatg ttttggacaagaggcgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaa ggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatgg cggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaag gggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacg acgcccttcacatgcaggccctgccccctaggtaaaatcaacctctggattaca aaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggat acgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctcc ttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaac gtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgc caccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggc ggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttggg cactgacaattccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgc ctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccct caatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccg cgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcc tggatccttgacttgcggccaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaa gcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtgg tttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgggatccttgacttgcggccgca

		actcccacctgcaacatgcgtgactgactgaggccgcgactctagagtcgacc ggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccac agtccccgagaagttgggggggagggtcggcaattgaacgggtgcctagag aaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttt cccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctt tttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttcgaggggctcgcatc tctccttcacgcgcccgccgccctacctgaggccgccatccacgccggttgagt cgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaactgcgtccgccgtctaggt aaGTcgactcgttggatccCCACTACCCGGATCAACGCCCTA GGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCGTATCCGT CTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGTGAAATATATAT TAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATTACGGTAACGC GGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTGCGTCGACA CTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATCTCCATGGCT GTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCC TGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGACT TCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCT GTTGACAGTGAGCGCCAGTGTGAAGCTCTTGTCAGAT AGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAAGAGCTTCACAC TGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGACCAGTAGTGG actagtgtgacgctgctgacccctttctttcccttctACAGatccaagctgtgacc ggcgcctacacctgcagcccaagcttaccatggccttaccagtgaccgccttgc tcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggcctgacatacagatgacac agagccctagcagtctgagcgccagtgtgggcgatagagttactatcacttgta gagcatccgagaacatatacagttacgtggcctggtatcagcaaaaacctggc aaagctcccaagttattgatttacaatgctaagagcttggcctctggggtgccatc gaggttcagcggtagcgggagcgggaccgacttcactctgaccatctcgagtc tccagccggaggactttgcgacatactattgtcaacaccattacgtatcaccctg

		gaccttcggcggcgggactaagttagagatcaagggtggaggaggatcagg cggcggtggatcaggaggaggagggtcacaagtgcagttacaggaatcagg gcccggcctggtgaagccaagtgaaaccctgagtctgacgtgcacggtttcag gatttagcctcacttcctacggtgtctcttggattcggcagccagccggcaaagg gctcgagtggattggggtgatctgggaagatggctcaacaaactatcattctgc actaatctctcgcgtgacaatgtcggtggacacgtccaagaatcaattttccctta aactgtcctccgtgaccgcagccgatacagcggtatattattgcgcgcgacctc actacggatctagctatgtcggcgcgatggagtattggggcgctggcacaacc gtcaccgtttcttccgcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccgg cgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgccctgaggcgtgcttcatgt acgtggcggcggccgcctttgtgcttctgttcttcgtgggctgcggggtgctgctgt cccgtaaacgcagacgtcaacacggtcaactgtggtttccagaaggttttaagg tctccgaagcaagtaagaagaaaagacgtgaaccactgggagaagatagc gtcggtctgaaaccactcaagaatgccatggtttctaaactgagccagctgcag acggagctcctggcggccctgctggagtcagggctgagcaaagaggcactg ctccaggcactgggcgagccggggccctacctcctggctggagaaggccccc tggacaaggggagtcctgcggcggcggtcgaggggagctggctgagctgc ccaatgggctgggggagactcggggctccgaggacgagaccgacgacgat ggggaagacttcacgccacccatcctcaaagagctggagaacctcagccctg aggaggcggcccaccagaaagccgtggtggagacccttctgcaggaggac ccgtggcgtgtggcgaagatggtcaagtcctacctgcagcagcacaacatccc acagcgggaggtggtcgataccactggcctcaaccagtcccacctgtcccaa cacctcaacaagggcactcccatgaagacgcagaagcgggccgccctgtac acctggtatgtccgcaagcagcgagaggtggcgcagcagttcacccatgcag ggcagggagggctgattgaagagcccacaggagatgagctaccaaccaag aaggggcggaggaaccgtttcaagtggggcccagcatcccagcagatcctgt tccaggcctatgagaggcagaagaaccctagcaaggaggagcgagaaacg ctagtggaggagtgcaatagggcggaatgcatccagagaggtgtgtcaccat cacaagcacaaggtctgggctccaacctcgtcacggaggtgcgtgtctacaac tggtttgccaaccggcgcaaagaagaagccttccggcacaagctggccatga cctgcagggatgagtttcccaccatggtgtttccttctgggcagatcagccaggc

		ctcggccttggccccggcccctccccaagtcctgccccaggctccagcccctg cccctgctccagccatggtatcagctctggcccaggccccagcccctgtcccag tcctagccccaggccctcctcaagctgtggccccacctgcccccaagcccacc caagctggggaaggaacgctgtcagaggccctgctgcagctgcagtttgatga tgaagacctgggggccttgcttggcaacagcacagacccagctgtgttcacag acctggcatccgtcgacaactccgagtttcagcagctgctgaaccagggcata cctgtggcccccacacaactgagcccatgctgatggagtaccctgaggctat aactcgcctagtgacaggggcccagaggcccccgacccagctcctgctcca ctgggggccccggggctccccaatggcctcctttcaggagatgaagacttctcc tccattgcggacatggacttctcagccctgctgagtcagatcagctcctaaAGG AaataaaagatctttaatgaaaatAGATCTGTGTGTTGGTTTTTT GTGTGaataaaagatccagagctctagAGATCTGTGTGTTGGTT TTTTGTGTGCGAGGGCAATCTGGCCCATCAAGTGGCC TTCGCCTCTGGGAGTAACAAAAATGCACTTCAAAATAG CTTCTGTAATCAAGCTGCATGGGTGGAGTACTCCCCA GCTGACTCCAGGAAGTTCTCTATCCAAAGCTATTCATT AGGCCAGAGCTGTGCAAATAATTAGTCACCCACTTGC TCCATAACCCTCCATGACAGCCCAGGCATTGAGTCCA GGTGGGACCATCAAGCCATGCTCTGGTGGCTCATGC ATTATCATAGAAATGGGAGGCTTTATTTATTTTACTAAA AAGAACAAAAACAACAGACTGCTGTCCTTTAGACAATA GGATCACGTCATCTGAGCCCTCTGTGCCCCAGGTGAC AAGCCCAGCCCCAAGTTCTCTTTCCTCAGCCTCCCCA CACATGTTCTGGAGGAGATGGGCCCAGCAGGCTGCT CTGAGGCCTGGCCCCTCGTAAGCCAAGCATGGCTC
170	AB-1014: LG1_TTT_Fas+ PTPN2 con CDL flanqueante y brazos de homología	GAGCCATGCTTGGCTTACGAGGGCGACCAACCCATC AAACTCCCCGCCCCCAGCACTTTTATTTCTCCTCTTTA GGAAGTACACTTCAGTATCTTTGGCACAGTGCATGAG CACGACTAAAGTAAAACATCGCAGAAAACATAGCTTTA GTCTACCCTTCGTGTCCTAAAAGGAAAACCAGTAGCT TCCCAGGCCACCGGAAGGGCAACACATGTCCTCTGC

		AGTTTCTGCACACGGGAAGGTAAAGACAGAGAGAGG ACCTACTCCTCAACACAGAAACATTTCAAAATCTTTCC TCGCCTGCAACCCAAGCTGAAGTCATTCTCCCCAGAA ATAACAAAAGTTGGAAGAGAAGCCGGAGACAGGATAG GTGCAGGAAGCCCACACTTTGAGGGCAGCACTCAGA CACCCTCTCCTGTGTGCAGGACGTGCCGAATGTTCAG GTGCAATGAGAATGAGCCATGCTTGGCTTATAaGGTAc gactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttga ccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatc gcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagc aaggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggc tctatgggataagcttgatatcgaattcatcgatgttaataattaacatatatgttaat cattaacatatagttaattattaaccgctatgttaatgattaacaacggttaataatt aacatatatgttaatcattaacatataactagtctagagggtatataatgggggcc actagtctactaccagagTtcatcgctagcgctaccggatccgccaccATGG CCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCT GCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGTTGCAGTTACAG GAGAGCGGACCCGGTCTGGTTAAACCGTCTGAAACA CTGAGTTTGACATGTACAGTGTCCGGCGGCTCGATTT CAAACTCTTACTATTGGGGCTGGATTAGGCAGCCTCC CGGGAAAGGGCTCGAGTGGATCGGGTCCATATATCA CTCAGGAAATACCTACTACAACCCAAGTCTTAAGTCTA GAGTGACAATCAGTGTGGATACGTCCAAGAATCAATT CTCCCTGAAGCTCTCAAGCGTGACCGCCGCCGACAC CGCAGTGTATTATTGCGTAACTCAAGACGGTGTGGGC GCTACCACTACCGAAGAGTATTGGGGACAAGGCACTC TTGTCACAGTCTCCAGCGCGGCAGCAaccacgacgccagc gccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagccactgtcact gcgcccagaagcgtgccggccagcggcgggggcgcagtgcacacgagg gggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtg gggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaa

		actcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaa gaggacggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaa ctgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggc cagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatg ttttggacaagaggcgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaa ggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatgg cggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaag gggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacg acgcccttcacatgcaggccctgccccctaggtaaaatcaacctctggattaca aaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggat acgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctcc ttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaac gtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgc caccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccccctccctattgccacggc ggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttggg cactgacaattccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgc ctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccct caatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccg cgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcc tggatccttgacttgcggccaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaa gcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtgg tttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgggatccttgacttgcggccgca actcccacctgcaacatgcgtgactgactgaggccgcgactctagagtcgacc ggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccac agtccccgagaagttgggggggagggtcggcaattgaacgggtgcctagag aaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttt cccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctt tttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttcgaggggctcgcatc tctccttcacgcgcccgccgccctacctgaggccgccatccacgccggttgagt cgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaactgcgtccgccgtctaggt aaGTcgactcgttggatccCCACTACCCGGATCAACGCCCTA

		GGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCGTATCCGT CTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGTGAAATATATAT TAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATTACGGTAACGC GGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTGCGTCGACA CTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATCTCCATGGCT GTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCC TGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGACT TCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCT GTTGACAGTGAGCGCCAGTGTGAAGCTCTTGTCAGAT AGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAAGAGCTTCACAC TGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGACCAGTAGTGG actagtgtgacgctgctgacccctttctttcccttctACAGatccaagctgtgacc ggcgcctacacctgcagcccaagcttTTTatggccttaccagtgaccgccttg ctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggcctgacatacagatgaca cagagccctagcagtctgagcgccagtgtgggcgatagagttactatcacttgt agagcatccgagaacatatacagttacgtggcctggtatcagcaaaaacctgg caaagctcccaagttattgatttacaatgctaagagcttggcctctggggtgccat cgaggttcagcggtagcgggagcgggaccgacttcactctgaccatctcgagt ctccagccggaggactttgcgacatactattgtcaacaccattacgtatcaccct ggaccttcggcggcgggactaagttagagatcaagggtggaggaggatcag gcggcggtggatcaggaggaggagggtcacaagtgcagttacaggaatcag ggcccggcctggtgaagccaagtgaaaccctgagtctgacgtgcacggtttca ggatttagcctcacttcctacggtgtctcttggattcggcagccagccggcaaag ggctcgagtggattggggtgatctgggaagatggctcaacaaactatcattctg cactaatctctcgcgtgacaatgtcggtggacacgtccaagaatcaattttccctt aaactgtcctccgtgaccgcagccgatacagcggtatattattgcgcgcgacct cactacggatctagctatgtcggcgcgatggagtattggggcgctggcacaac cgtcaccgtttcttccgcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccg

		gcgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgccctgaggcgtgcttcatg tacgtggcggcggccgcctttgtgcttctgttcttcgtgggctgcggggtgctgctg tcccgtaaacgcagacgtcaacacggtcaactgtggtttccagaaggttttaag gtctccgaagcaagtaagaagaaaagacgtgaaccactgggagaagatag cgtcggtctgaaaccactcaagaatgccatggtttctaaactgagccagctgca gacggagctcctggcggccctgctggagtcagggctgagcaaagaggcact gctccaggcactgggcgagccggggccctacctcctggctggagaaggccc cctggacaaggggagtcctgcggcggcggtcgaggggagctggctgagct gcccaatgggctgggggagactcggggctccgaggacgagaccgacgacg atggggaagacttcacgccacccatcctcaaagagctggagaacctcagccc tgaggaggcggcccaccagaaagccgtggtggagacccttctgcaggagga cccgtggcgtgtggcgaagatggtcaagtcctacctgcagcagcacaacatcc cacagcgggaggtggtcgataccactggcctcaaccagtcccacctgtccca acacctcaacaagggcactcccatgaagacgcagaagcgggccgccctgta cacctggtatgtccgcaagcagcgagaggtggcgcagcagttcacccatgca gggcagggagggctgattgaagagcccacaggagatgagctaccaaccaa gaaggggcggaggaaccgtttcaagtggggcccagcatcccagcagatcct gttccaggcctatgagaggcagaagaaccctagcaaggaggagcgagaaa cgctagtggaggagtgcaatagggcggaatgcatccagagaggtgtgtcacc atcacaagcacaaggtctgggctccaacctcgtcacggaggtgcgtgtctaca actggtttgccaaccggcgcaaagaagaagccttccggcacaagctggccat gacctgcagggatgagtttcccaccatggtgtttccttctgggcagatcagccag gcctcggccttggccccggcccctccccaagtcctgccccaggctccagcccc tgcccctgctccagccatggtatcagctctggcccaggccccagcccctgtccc agtcctagccccaggccctcctcaagctgtggccccacctgcccccaagccca cccaagctggggaaggaacgctgtcagaggccctgctgcagctgcagtttgat gatgaagacctgggggccttgcttggcaacagcacagacccagctgtgttcac agacctggcatccgtcgacaactccgagtttcagcagctgctgaaccagggca tacctgtggcccccacacaactgagcccatgctgatggagtaccctgaggct ataactcgcctagtgacaggggcccagaggccccccgacccagctcctgctc cactgggggccccggggctccccaatggcctcctttcaggagatgaagacttct

		cctccattgcggacatggacttctcagccctgctgagtcagatcagctcctaaA GGACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCC TCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACC AGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCT GACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGG GGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAA CCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCT GGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTC CGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCT CCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGG CTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAaACGGGGTTT CACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCCTAATCT CAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGG GATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCttccctgtccttcCGA GGGCAATCTGGCCCATCAAGTGGCCTTCGCCTCTGG GAGTAACAAAAATGCACTTCAAAATAGCTTCTGTAATC AAGCTGCATGGGTGGAGTACTCCCCAGCTGACTCCA GGAAGTTCTCTATCCAAAGCTATTCATTAGGCCAGAG CTGTGCAAATAATTAGTCACCCACTTGCTCCATAACCC TCCATGACAGCCCAGGCATTGAGTCCAGGTGGGACC ATCAAGCCATGCTCTGGTGGCTCATGCATTATCATAG AAATGGGAGGCTTTATTTATTTTACTAAAAAGAACAAA AACAACAGACTGCTGTCCTTTAGACAATAGGATCACG TCATCTGAGCCCTCTGTGCCCCAGGTGACAAGCCCAG CCCCAAGTTCTCTTTCCTCAGCCTCCCCACACATGTTC TGGAGGAGATGGGCCCAGCAGGCTGCTCTGAGGCCT GGCCCCTCGTAAGCCAAGCATGGCTCatcccaatggcgcgc cgagcttggcgtaatcatggtcatagctgtt
171	AB-1015: LG1_Fas+PTPN 2 con CDL	GAGCCATGCTTGGCTTACGAGGGCGACCAACCCATC AAACTCCCCGCCCCCAGCACTTTTATTTCTCCTCTTTA GGAAGTACACTTCAGTATCTTTGGCACAGTGCATGAG

	flanqueante y brazos de homología	CACGACTAAAGTAAAACATCGCAGAAAACATAGCTTTA GTCTACCCTTCGTGTCCTAAAAGGAAAACCAGTAGCT TCCCAGGCCACCGGAAGGGCAACACATGTCCTCTGC AGTTTCTGCACACGGGAAGGTAAAGACAGAGAGAGG ACCTACTCCTCAACACAGAAACATTTCAAAATCTTTCC TCGCCTGCAACCCAAGCTGAAGTCATTCTCCCCAGAA ATAACAAAAGTTGGAAGAGAAGCCGGAGACAGGATAG GTGCAGGAAGCCCACACTTTGAGGGCAGCACTCAGA CACCCTCTCCTGTGTGCAGGACGTGCCGAATGTTCAG GTGCAATGAGAATGAGCCATGCTTGGCTTATAaGGTAc gactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttga ccctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatc gcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggcaggacagc aaggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggc tctatgggataagcttgatatcgaattcatcgatgttaataattaacatatatgttaat cattaacatatagttaattattaaccgctatgttaatgattaacaacggttaataatt aacatatatgttaatcattaacatataactagtctagagggtatataatgggggcc actagtctactaccagagTtcatcgctagcgctaccggatccgccaccATGG CCCTGCCAGTAACGGCTCTGCTGCTGCCACTTGCTCT GCTCCTCCATGCAGCCAGGCCTCAGTTGCAGTTACAG GAGAGCGGACCCGGTCTGGTTAAACCGTCTGAAACA CTGAGTTTGACATGTACAGTGTCCGGCGGCTCGATTT CAAACTCTTACTATTGGGGCTGGATTAGGCAGCCTCC CGGGAAAGGGCTCGAGTGGATCGGGTCCATATATCA CTCAGGAAATACCTACTACAACCCAAGTCTTAAGTCTA GAGTGACAATCAGTGTGGATACGTCCAAGAATCAATT CTCCCTGAAGCTCTCAAGCGTGACCGCCGCCGACAC CGCAGTGTATTATTGCGTAACTCAAGACGGTGTGGGC GCTACCACTACCGAAGAGTATTGGGGACAAGGCACTC TTGTCACAGTCTCCAGCGCGGCAGCAaccacgacgccagc gccgcgaccaccaacaccggcgcccaccatcgcgtcgcagccactgtcact

		gcgcccagaagcgtgccggccagcggcgggggcgcagtgcacacgagg gggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgtg gggtccttctcctgtcactggttatcacccttactgcaaacggggcagaaagaa actcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaa gaggacggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaa ctgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggc cagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatg ttttggacaagaggcgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaa ggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatgg cggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaag gggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacg acgcccttcacatgcaggccctgcccccctaggtaaaatcaacctctggattaca aaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggat acgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctcc ttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaac gtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgc caccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccccctccctattgccacggc ggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttggg cactgacaattccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgc ctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccct caatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccg cgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcc tggatccttgacttgcggccaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaa gcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtgg tttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctgggatccttgacttgcggccgca actcccacctgcaacatgcgtgactgactgaggccgcgactctagagtcgacc ggatctgcgatcgctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccac agtccccgagaagttgggggggagggtcggcaattgaacgggtgcctagag aaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttt cccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctt tttcgcaacgggtttgccgccagaacacagctgaagcttcgaggggctcgcatc

		tctccttcacgcgcccgccgccctacctgaggccgccatccacgccggttgagt cgcgttctgccgcctcccgcctgtggtgcctcctgaactgcgtccgccgtctaggt aaGTcgactcgttggatccCCACTACCCGGATCAACGCCCTA GGTTTATGTTTGGATGAACTGACATACGCGTATCCGT CTTAAGAATCTTTTCAAACACTAGTAGTGAAATATATAT TAAACTAGTGTTTGAAAAGATTCTTATTACGGTAACGC GGAATTCGCAACTATTTTATCAATTTTTTGCGTCGACA CTTCAAGGGGCTTGCGGCCGCAACCATCTCCATGGCT GTTTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGCC TGCACATCTTGGAAACACTTGCTGGGATTACTTCGACT TCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCT GTTGACAGTGAGCGCCAGTGTGAAGCTCTTGTCAGAT AGTGAAGCCACAGATGTATCTGACAAGAGCTTCACAC TGATGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTAGAATT CGAGCAATTATCTTGTTTACTAAAACTGAATACCTTGC TATCTCTTTGATACATTTTTACAAAGCTGAATTAAAATG GTATAAATTAAATCACTTTTTCATCTGACCAGTAGTGG actagtgtgacgctgctgacccctttctttcccttctACAGatccaagctgtgacc ggcgcctacacctgcagcccaagcttaccatggccttaccagtgaccgccttgc tcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggcctgacatacagatgacac agagccctagcagtctgagcgccagtgtgggcgatagagttactatcacttgta gagcatccgagaacatatacagttacgtggcctggtatcagcaaaaacctggc aaagctcccaagttattgatttacaatgctaagagcttggcctctggggtgccatc gaggttcagcggtagcgggagcgggaccgacttcactctgaccatctcgagtc tccagccggaggactttgcgacatactattgtcaacaccattacgtatcaccctg gaccttcggcggcgggactaagttagagatcaagggtggaggaggatcagg cggcggtggatcaggaggaggagggtcacaagtgcagttacaggaatcagg gcccggcctggtgaagccaagtgaaaccctgagtctgacgtgcacggtttcag gatttagcctcacttcctacggtgtctcttggattcggcagccagccggcaaagg gctcgagtggattggggtgatctgggaagatggctcaacaaactatcattctgc actaatctctcgcgtgacaatgtcggtggacacgtccaagaatcaattttccctta

		aactgtcctccgtgaccgcagccgatacagcggtatattattgcgcgcgacctc actacggatctagctatgtcggcgcgatggagtattggggcgctggcacaacc gtcaccgtttcttccgcaaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccgg cgcccaccatcgcgtcgcagcccctgtccctgcgccctgaggcgtgcttcatgt acgtggcggcggccgcctttgtgcttctgttcttcgtgggctgcggggtgctgctgt cccgtaaacgcagacgtcaacacggtcaactgtggtttccagaaggttttaagg tctccgaagcaagtaagaagaaaagacgtgaaccactgggagaagatagc gtcggtctgaaaccactcaagaatgccatggtttctaaactgagccagctgcag acggagctcctggcggccctgctggagtcagggctgagcaaagaggcactg ctccaggcactgggcgagccggggccctacctcctggctggagaaggccccc tggacaaggggagtcctgcggcggcggtcgaggggagctggctgagctgc ccaatgggctgggggagactcggggctccgaggacgagaccgacgacgat ggggaagacttcacgccacccatcctcaaagagctggagaacctcagccctg aggaggcggcccaccagaaagccgtggtggagacccttctgcaggaggac ccgtggcgtgtggcgaagatggtcaagtcctacctgcagcagcacaacatccc acagcgggaggtggtcgataccactggcctcaaccagtcccacctgtcccaa cacctcaacaagggcactcccatgaagacgcagaagcgggccgccctgtac acctggtatgtccgcaagcagcgagaggtggcgcagcagttcacccatgcag ggcagggagggctgattgaagagcccacaggagatgagctaccaaccaag aaggggcggaggaaccgtttcaagtggggcccagcatcccagcagatcctgt tccaggcctatgagaggcagaagaaccctagcaaggaggagcgagaaacg ctagtggaggagtgcaatagggcggaatgcatccagagaggtgtgtcaccat cacaagcacaaggtctgggctccaacctcgtcacggaggtgcgtgtctacaac tggtttgccaaccggcgcaaagaagaagccttccggcacaagctggccatga cctgcagggatgagtttcccaccatggtgtttccttctgggcagatcagccaggc ctcggccttggccccggcccctccccaagtcctgccccaggctccagcccctg cccctgctccagccatggtatcagctctggcccaggccccagcccctgtcccag tcctagccccaggccctcctcaagctgtggccccacctgcccccaagcccacc caagctggggaaggaacgctgtcagaggccctgctgcagctgcagtttgatga tgaagacctgggggccttgcttggcaacagcacagacccagctgtgttcacag acctggcatccgtcgacaactccgagtttcagcagctgctgaaccagggcata

		cctgtggccccccacacaactgagcccatgctgatggagtaccctgaggctat aactcgcctagtgacaggggcccagaggccccccgacccagctcctgctcca ctgggggccccggggctccccaatggcctcctttcaggagatgaagacttctcc tccattgcggacatggacttctcagccctgctgagtcagatcagctcctaaAGG Acgggtggcatccctgtgacccctccccagtgcctctcctggccctggaagttg ccactccagtgcccaccagccttgtcctaataaaattaagttgcatcattttgtctg actaggtgtccttctataatattatggggtggaggggggtggtatggagcaagg ggcaagttgggaagacaacctgtagggcctgcggggtctattgggaaccaag ctggagtgcagtggcacaatcttggctcactgcaatctccgcctcctgggttcaa gcgattctcctgcctcagcctcccgagttgttgggattccaggcatgcatgacca ggctcagctaatttttgttttttggtagaaacggggtttcaccatattggccaggct ggtctccaactcctaatctcaggtgatctacccaccttggcctcccaaattgctgg gattacaggcgtgaaccactgctcccttccctgtccttcCGAGGGCAATC TGGCCCATCAAGTGGCCTTCGCCTCTGGGAGTAACAA AAATGCACTTCAAAATAGCTTCTGTAATCAAGCTGCAT GGGTGGAGTACTCCCCAGCTGACTCCAGGAAGTTCTC TATCCAAAGCTATTCATTAGGCCAGAGCTGTGCAAATA ATTAGTCACCCACTTGCTCCATAACCCTCCATGACAG CCCAGGCATTGAGTCCAGGTGGGACCATCAAGCCAT GCTCTGGTGGCTCATGCATTATCATAGAAATGGGAGG CTTTATTTATTTTACTAAAAAGAACAAAAACAACAGACT GCTGTCCTTTAGACAATAGGATCACGTCATCTGAGCC CTCTGTGCCCCAGGTGACAAGCCCAGCCCCAAGTTCT CTTTCCTCAGCCTCCCCACACATGTTCTGGAGGAGAT GGGCCCAGCAGGCTGCTCTGAGGCCTGGCCCCTCGT AAGCCAAGCATGGCTC