

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 728**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2016 PCT/US2016/055492**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17062451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2016 E 16782371 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3359184**

54 Título: **Células genéticamente modificadas que comprenden un gen de región constante alfa del receptor de linfocitos T humano modificado**

30 Prioridad:

05.10.2015 US 201562237394 P
19.02.2016 US 201662297426 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2021

73 Titular/es:

PRECISION BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
302 East Pettigrew Street, Dibrell Building, Suite
A-100
Durham, NC 27701, US

72 Inventor/es:

JANTZ, DEREK;
SMITH, JAMES, JEFFERSON;
NICHOLSON, MICHAEL, G.;
MACLEOD, DANIEL, T.;
ANTONY, JEYARAJ y
BARTSEVICH, VICTOR

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 803 728 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células genéticamente modificadas que comprenden un gen de región constante alfa del receptor de linfocitos T humano modificado

Campo de la invención

5 La invención se refiere a los campos de la oncología, inmunoterapia contra el cáncer, biología molecular y tecnología de ácido nucleico recombinante. En particular, la invención se refiere a una célula genéticamente modificada que comprende en su genoma un gen de región constante alfa del receptor de linfocitos T humano modificado, en el que la célula tiene una expresión reducida de la superficie celular del receptor de linfocitos T endógeno. La invención se refiere además a procedimientos para producir dicha célula genéticamente modificada, y a procedimientos para usar dicha célula para tratar una enfermedad, incluido el cáncer, en un sujeto.

Antecedentes de la invención

15 La inmunoterapia adoptiva de linfocitos T es un enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer. Esta estrategia utiliza linfocitos T humanos aislados que se han modificado genéticamente para mejorar su especificidad para un antígeno asociado a un tumor específico. La modificación genética puede implicar la expresión de un receptor de antígeno quimérico o un receptor de linfocitos T exógeno para injertar especificidad de antígeno en el linfocito T. A diferencia de los receptores de linfocitos T exógenos, los receptores de antígeno quiméricos obtienen su especificidad de los dominios variables de un anticuerpo monoclonal. Por lo tanto, los linfocitos T que expresan receptores de antígeno quimérico (linfocitos T con CAR) inducen inmunorreactividad tumoral en un complejo principal de histocompatibilidad de manera no restringida. Hasta la fecha, la inmunoterapia adoptiva de linfocitos T se ha utilizado como terapia clínica para varios tipos de cánceres, incluyendo neoplasias de linfocitos B (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B y leucemia linfocítica crónica), mieloma múltiple, neuroblastoma, glioblastoma, gliomas avanzados, cáncer de ovario, mesotelioma, melanoma y cáncer de páncreas.

25 A pesar de su posible utilidad como tratamiento contra el cáncer, la inmunoterapia adoptiva con linfocitos T con CAR se ha limitado, en parte, por la expresión del receptor endógeno de linfocitos T en la superficie celular. Los linfocitos T con CAR que expresan un receptor endógeno de linfocitos T pueden reconocer antígenos de histocompatibilidad mayor y menor después de la administración a un paciente alogénico, lo que puede llevar al desarrollo de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH). Como resultado, los ensayos clínicos se han centrado en gran medida en el uso de linfocitos T con CAR autólogos, en los que los linfocitos T de un paciente se aíslan, se modifican genéticamente para incorporar un receptor de antígeno quimérico, y luego se reinfunden en el mismo paciente. Una estrategia autóloga proporciona tolerancia inmunitaria a los linfocitos T con CAR administrados; sin embargo, este enfoque está limitado tanto por el tiempo como por los gastos necesarios para producir linfocitos T con CAR específicos del paciente después de que se diagnostica el cáncer de un paciente.

35 Por lo tanto, sería ventajoso desarrollar linfocitos T con CAR "listos para usar", preparados usando linfocitos T de un donante externo, que han reducido la expresión del receptor endógeno de linfocitos T y no inician EICH tras la administración. Dichos productos se podrían generar y validar antes del diagnóstico, y podrían ponerse a disposición de los pacientes tan pronto como sea necesario. Por lo tanto, existe una necesidad para el desarrollo de linfocitos T con CAR alogénicos que carecen de un receptor endógeno de linfocitos T para prevenir la aparición de EICH.

40 La modificación genética del ADN genómico se puede realizar utilizando endonucleasas específicas de sitio, con sitio de reconocimiento poco frecuente, que están diseñadas para reconocer secuencias de ADN en el locus de interés. Los procedimientos para producir endonucleasas específicas del sitio diseñadas genéticamente se conocen en la técnica. Por ejemplo, Las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) se pueden diseñar para que reconozcan y corten sitios predeterminados en un genoma. Las ZFN son proteínas quiméricas que comprenden un dominio de unión a ADN de dedo de zinc fusionado al dominio de nucleasa de la enzima de restricción FokI. El dominio del dedo de zinc se puede rediseñar a través de medios racionales o experimentales para producir una proteína que se una a una secuencia de ADN predeterminada de aproximadamente 18 pares de bases de longitud. Al fusionar este dominio de proteínas diseñadas con la nucleasa FokI, es posible dirigir las rupturas de ADN con especificidad a nivel de genoma. Las ZFN se han utilizado ampliamente para dirigir la adición, eliminación y sustitución de genes en una amplia gama de organismos eucariotas (revisado en Durai y col. (2005), Nucleic Acids Res 33, 5978). Igualmente, las nucleasas efectoras de TAL (TALEN) se pueden generar para escindir sitios específicos en el ADN genómico. Como una ZFN, una TALEN comprende un dominio de unión a ADN específico del sitio diseñado genéticamente fusionado con el dominio de nucleasa FokI (revisado en Mak y col. (2013), Curr Opin Struct Biol. 23:93-9). En este caso, sin embargo, el dominio de unión al ADN comprende una matriz en tándem de dominios efectoras de TAL, cada uno de los cuales reconoce específicamente un solo par de bases de ADN. Una limitación que tienen las ZFN y las TALEN para la práctica de la presente invención es que son heterodiméricos, para que la producción de una única nucleasa funcional en una célula requiera la coexpresión de dos monómeros de proteínas.

55 Las TALEN compactas tienen una arquitectura de endonucleasa alternativa que evita la necesidad de dimerización (Beurdeley y col. (2013), Nat Commun. 4:1762). Una TALEN compacta comprende un dominio de unión al ADN diseñado genéticamente efector de TAL específico del sitio fusionado con el dominio de nucleasa de la endonucleasa

autoguiada I-Tevl. A diferencia de FokI, I-Tevl no necesita dimerizarse para producir una ruptura de ADN de doble cadena, por lo que una TALEN compacta es funcional como monómero.

Las endonucleasas diseñadas genéticamente basadas en el sistema CRISPR/Cas9 también se conocen en la técnica (Ran y col. (2013), Nat Protoc. 8:2281-2308; Mali y col. (2013), Nat Methods 10:957-63). Una endonucleasa CRISPR comprende dos componentes: (1) una nucleasa efectora de caspasa, típicamente Cas9 microbiana; y (2) un "ARN guía" corto que comprende una secuencia de direccionamiento de ~ 20 nucleótidos que dirige la nucleasa a una ubicación de interés en el genoma. Al expresar múltiples ARN guía en la misma célula, teniendo, cada una, una secuencia de direccionamiento diferente, es posible dirigir las roturas de ADN de manera simultáneamente a múltiples sitios en el genoma. Por lo tanto, las nucleasas CRISPR/Cas9 son adecuadas para la presente invención. El principal inconveniente del sistema CRISPR/Cas9 es su alta frecuencia documentada de roturas de ADN fuera de la diana, lo que podría limitar la utilidad del sistema para tratar pacientes humanos (Fu y col. (2013), Nat Biotechnol. 31:822-6).

Las endonucleasas autoguiadas son un grupo de nucleasas naturales que reconocen sitios de escisión de 15-40 pares de bases que se encuentran comúnmente en los genomas de plantas y hongos. Con frecuencia se asocian con elementos de ADN parásitos, tales como los intrones e inteínas de auto-empalme del grupo 1. Promueven, de forma natural, la recombinación homóloga o la inserción de genes en ubicaciones específicas en el genoma del hospedador al producir una ruptura bicatenaria en el cromosoma, que recluta la maquinaria de reparación de ADN celular (Stoddard (2006), Q. Rev. Biophys. 38: 49-95). Las endonucleasas autoguiadas se agrupan comúnmente en cuatro familias: la familia LAGLIDADG (SEQ ID NO: 7), la familia GIY-YIG, la familia His-Cys box y la familia HNH. Estas familias se caracterizan por motivos estructurales, que afectan a la actividad catalítica y a la secuencia de reconocimiento. Por ejemplo, los miembros de la familia LAGLIDADG (SEQ ID NO: 7) se caracterizan por tener una o dos copias del motivo conservado LAGLIDADG (SEQ ID NO: 7) (véase Chevalier y col. (2001), Nucleic Acids Res. 29 (18): 3757-3774). Las endonucleasas autoguiadas LAGLIDADG (SEQ ID NO: 7) con una única copia del motivo LAGLIDADG (SEQ ID NO: 7) forman homodímeros, mientras que los miembros con dos copias del motivo LAGLIDADG (SEQ ID NO: 7) se encuentran como monómeros.

I-Crel (SEQ ID NO: 6) es miembro de la familia LAGLIDADG (SEQ ID NO: 7) de endonucleasas autoguiadas que reconoce y corta una secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases en el cromosoma de cloroplasto de las algas *Chlamydomonas reinhardtii*. Se han utilizado técnicas de selección genética para modificar la preferencia del sitio de escisión I-Crel de tipo silvestre (Sussman y col. (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41; Chames y col. (2005), Nucleic Acids Res. 33: e178; Seligman y col. (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870-9, Arnould y col. (2006), J. Mol. Biol. 355: 443-58). Más recientemente, se describió un procedimiento de diseño racional de endonucleasas de referencia mono-LAGLIDADG (SEQ ID NO: 7) que es capaz de rediseñar completamente I-Crel y otras endonucleasas de referencia para dirigir sitios de ADN ampliamente divergentes, incluyendo sitios en genomas de mamíferos, levadura, planta, bacterias y virus (documento WO 2007/047859).

Tal como se describió por primera vez en el documento WO 2009/059195, I-Crel y sus derivados diseñados genéticamente son normalmente diméricos, pero se pueden fusionar en un solo polipéptido utilizando un enlazador peptídico corto que une el extremo C-terminal de una primera subunidad al extremo N-terminal de una segunda subunidad (Li y col. (2009), Nucleic Acids Res. 37:1650-62; Grizot y col. (2009), Nucleic Acids Res. 37:5405-19). Por lo tanto, una meganucleasa funcional de "cadena sencilla" se puede expresar a partir de una única transcripción.

El uso de meganucleasas diseñadas genéticamente para escindir dianas de ADN en la región constante alfa del receptor de linfocitos T humanos se describió previamente en la Publicación Internacional WO 2014/191527. La publicación '527 desvela variantes de la meganucleasa I-Onul que están diseñadas para dirigirse a una secuencia de reconocimiento (SEQ ID NO: 3 de la publicación' 527) dentro del exón 1 del gen de la región constante TCR alfa. Aunque la publicación '527 discute que un receptor de antígeno quimérico se puede expresar en células TCR inactivadas, los autores no desvelan la inserción de la secuencia codificante del receptor de antígeno quimérico en el sitio de escisión de meganucleasa en el gen de la región constante de TCR alfa.

También se ha desvelado el uso de otras nucleasas y mecanismos para alterar la expresión del TCR endógeno. Por ejemplo, el uso de las nucleasas de dedos de zinc para alterar los genes TCR en los linfocitos T humanos se describió en la Patente de los Estados Unidos N.º 8.95.828 y en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º US2014/034902. La publicación de EE.UU. N.º US2014/0301990 describe el uso de nucleasas de dedo de zinc y activadores de la transcripción como nucleasas efectoras (TALEN), y un sistema CRISPR/Cas con un ARN guía único diseñado para atacar genes TCR en un linfocito T aislado. La Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º US2012/0321667 desvela el uso de ARN de horquilla pequeña que se dirigen a ácidos nucleicos que codifican TCR específicos y/o cadenas de CD3 en linfocitos T.

Los documentos WO 2014/191527 A1, Poirot y col. (Cancer Research 2015, 75 (18):3853-3864), WO 2013/176915 A1, WO 2014/191128 A1 y WO 2014/153470 A2 desvelan la inactivación del gen alfa TCR en linfocitos T humanos combinado con la introducción de un receptor de antígeno quimérico.

Sin embargo, la presente invención mejora las enseñanzas de la técnica anterior. Los presentes inventores son los primeros en enseñar células genéticamente modificadas que comprenden un receptor de antígeno quimérico insertado en el gen de la región constante alfa TCR humana, que al mismo tiempo altera la expresión del receptor endógeno de

linfocitos T en la superficie celular. Además, la técnica anterior no enseña las meganucleasas o las secuencias de reconocimiento descritas en el presente documento, ni su uso para producir tales células genéticamente modificadas.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

5 La presente invención proporciona un linfocito T humano genéticamente modificado que comprende en su genoma un gen de región constante alfa del receptor de linfocitos T modificado (TCR). Además, dicha célula no tiene expresión en la superficie celular del TCR endógeno en comparación con una célula de control no modificada. La presente invención también proporciona un procedimiento para producir la célula genéticamente modificada. La presente invención proporciona además la célula genéticamente modificada para su uso en un procedimiento de inmunoterapia para tratar el cáncer.

10 Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un linfocito T humano genéticamente modificado que comprende en su genoma un gen de región constante alfa de TCR humano modificado, en el que el gen de la región constante alfa del TCR humano modificado comprende de 5 'a 3': (a) una región 5 'del gen de la región constante alfa del TCR humano; (b) un polinucleótido exógeno; y (c) una región 3' del gen de la región constante alfa del TCR humano. Además, la célula genéticamente modificada no tiene expresión en la superficie celular del TCR endógeno en comparación con una célula de control no modificada.

15 El polinucleótido exógeno comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico, en la que el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a ligando extracelular y uno o más dominios de señalización intracelular.

20 En una de tales realizaciones, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a ligando extracelular que tiene al menos un 95 %, o hasta un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 112, en la que el dominio de unión a ligando extracelular se une a CD19.

En otra de tales realizaciones, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de señalización citoplasmática intracelular que tiene al menos un 95 %, o hasta un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 113.

25 En otra de tales realizaciones, el receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de señalización coestimuladora intracelular que tiene al menos un 95 %, o hasta un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 114.

En otra de tales realizaciones, el receptor de antígeno quimérico comprende además un péptido señal. El péptido señal tiene al menos un 95 %, o hasta un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:115.

30 En otra de tales realizaciones, el receptor de antígeno quimérico comprende además un dominio de bisagra. El dominio de bisagra tiene al menos un 95 %, o hasta un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:116.

En otra de tales realizaciones, el receptor de antígeno quimérico comprende además un dominio transmembrana. El dominio transmembrana tiene al menos un 95 %, o hasta un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:117.

35 En otra de tales realizaciones, el receptor de antígeno quimérico tiene al menos un 95 %, o hasta un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:111.

En otra realización, el polinucleótido exógeno comprende una secuencia del promotor que dirige la expresión del polinucleótido exógeno. En una de tales realizaciones, la secuencia del promotor tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o hasta el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 118.

40 El polinucleótido exógeno se inserta en el gen TCR entre las posiciones 13 y 14 de la SEQ ID NO:3. En una de tales realizaciones, el gen de la región constante alfa del TCR humano modificado comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o hasta el 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 120.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula genéticamente modificada, tal como se describe en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto, la invención proporciona una célula genéticamente modificada, tal como se describe en el presente documento, para su uso como un medicamento. En uno de esos aspectos, el medicamento es útil en el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, el tratamiento del cáncer es la inmunoterapia.

50 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir un linfocito T humano genéticamente modificado que comprende un gen de región constante alfa TCR humano modificado, comprendiendo el procedimiento: (a) introducir en un linfocito T humano: (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa recombinante; o (ii) una proteína meganucleasa recombinante; en el que la meganucleasa recombinante produce un sitio de escisión en la secuencia de reconocimiento de la SEQ ID NO:3 dentro del gen de la

región constante alfa TCR humano; y (b) introducir en la célula una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende un polinucleótido exógeno que codifica un receptor de antígeno quimérico. La secuencia del polinucleótido exógeno se inserta en el gen de la región constante alfa del TCR humano en el sitio de escisión. Además, la célula genéticamente modificada no tiene expresión en la superficie celular del TCR endógeno en comparación con una célula de control no modificada.

En diversas realizaciones del procedimiento, la primera secuencia de ácido nucleico o la proteína meganucleasa recombinante se puede introducir en la célula antes de introducir el segundo ácido nucleico, o después de introducir el segundo ácido nucleico.

En una realización del procedimiento, la segunda secuencia de ácido nucleico comprende de 5' a 3': (a) un brazo de homología 5' que es homólogo a la secuencia 5' aguas arriba que flanquea el sitio de escisión; (b) el polinucleótido exógeno; y (c) un brazo de homología 3' que es homólogo a la secuencia 3' aguas abajo que flanquea el sitio de escisión. En tal realización, la secuencia del polinucleótido exógeno se inserta en el gen de la región constante alfa del TCR humano en el sitio de escisión por recombinación homóloga.

En otra realización del procedimiento, el segundo ácido nucleico carece de una homología sustancial con el sitio de escisión, y la secuencia del polinucleótido exógeno se inserta en el gen de la región constante alfa del TCR humano mediante unión de extremo no homóloga.

En otra realización del procedimiento, el polinucleótido exógeno comprende una primera secuencia del promotor que dirige la expresión del polinucleótido exógeno.

En otra realización del procedimiento, el primer ácido nucleico que codifica la meganucleasa recombinante se introduce en la célula usando un ARNm. En algunas realizaciones, el ARNm puede ser un ARNm policistrónico que comprende una secuencia codificante para al menos una nucleasa diseñada genéticamente descrita en el presente documento y una secuencia codificante para al menos una proteína adicional (por ejemplo, una segunda nucleasa). En realizaciones particulares, un ARNm policistrónico puede codificar dos o más nucleasas diseñadas descritas en el presente documento que se dirigen a diferentes secuencias de reconocimiento dentro del mismo gen (por ejemplo, el gen de la región constante del receptor de linfocitos T alfa). En otras realizaciones, un ARNm policistrónico puede codificar una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento y una segunda nucleasa que reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento diferente dentro del mismo gen (por ejemplo, el gen de región constante alfa del receptor de linfocitos T) o, como alternativa, reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento diferente dentro de otro gen de interés en el genoma. En dichas realizaciones, las células genéticamente modificadas producidas usando dicho ARNm policistrónico pueden tener múltiples genes inactivados simultáneamente. En realizaciones adicionales, un ARNm policistrónico puede codificar al menos una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento y una proteína adicional que es beneficiosa para la célula, mejora la eficacia de inserción de una secuencia exógena de interés en un sitio de escisión, y/o es beneficiosa en el tratamiento de una enfermedad.

En otra realización del procedimiento, al menos la segunda secuencia de ácido nucleico se introduce en la célula poniendo en contacto la célula con un vector vírico que comprende la segunda secuencia de ácido nucleico. En algunas realizaciones, tanto la primera secuencia de ácido nucleico como la segunda secuencia de ácido nucleico se introducen poniendo en contacto la célula con un único vector vírico que comprende tanto la primera secuencia de ácido nucleico como la segunda secuencia de ácido nucleico. Como alternativa, la célula se puede poner en contacto con un primer vector vírico que comprende la primera secuencia de ácido nucleico y un segundo vector vírico que comprende la segunda secuencia de ácido nucleico.

En dicha realización del procedimiento, en la que la segunda secuencia de ácido nucleico se introduce mediante un vector vírico, el segundo ácido nucleico puede comprender además una segunda secuencia promotora colocada en 5' aguas arriba del brazo de homología 5' o, como alternativa, colocada en 3' aguas abajo del brazo de homología 3'. En realizaciones en las que el segundo promotor se coloca en 3' aguas abajo del brazo de homología 3', el promotor se puede invertir.

En otra realización particular del procedimiento, al menos la segunda secuencia de ácido nucleico se introduce en la célula poniendo en contacto la célula con un vector de virus recombinante adenoasociado (AAV) que comprende la segunda secuencia de ácido nucleico. En algunas realizaciones, tanto la primera secuencia de ácido nucleico como la segunda secuencia de ácido nucleico se introducen poniendo en contacto la célula con un único AAV recombinante que comprende tanto la primera secuencia de ácido nucleico como la segunda secuencia de ácido nucleico. Como alternativa, la célula se puede poner en contacto con un primer AAV recombinante que comprende la primera secuencia de ácido nucleico y un segundo AAV recombinante que comprende la segunda secuencia de ácido nucleico.

En dicha realización del procedimiento, en el que la segunda secuencia de ácido nucleico es introducida por un vector de AAV recombinante, el segundo ácido nucleico puede comprender además una segunda secuencia promotora colocada en 5' aguas arriba del brazo de homología 5' o, como alternativa, colocada en 3' aguas abajo del brazo de homología 3'. En realizaciones en las que el segundo promotor se coloca en 3' aguas abajo del brazo de homología 3', el promotor se puede invertir.

En otra dicha realización del procedimiento, el vector de AAV recombinante es un vector de AAV autocomplementario.

En otra dicha realización del procedimiento, el vector de AAV recombinante puede tener cualquier serotipo. En una realización particular del procedimiento, el vector de AAV recombinante tiene un serotipo de AAV2. En otra realización particular del procedimiento, el vector de AAV recombinante tiene un serotipo de AAV6.

5 En otra realización del procedimiento, al menos la segunda secuencia de ácido nucleico se introduce en la célula usando un molde de ADN monocatenario.

10 En una realización particular del procedimiento, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa recombinante descrita en el presente documento se introduce en la célula mediante un ARNm, y la segunda secuencia de ácido nucleico que comprende un polinucleótido exógeno se introduce en la célula usando un vector vírico, preferentemente un vector de AAV recombinante, en el que la célula es un linfocito T humano, y en el que la secuencia de interés codifica un receptor de antígeno quimérico. En tal realización, el procedimiento produce un linfocito T genéticamente modificado que comprende un receptor de antígeno quimérico y no tiene expresión en la superficie celular del receptor endógeno de linfocitos T en comparación con una célula de control.

15 La meganucleasa recombinante reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento que consiste en la SEQ ID NO:3. Tal meganucleasa recombinante comprende una primera subunidad y una segunda subunidad, en la que la primera subunidad se une a un primer semisitio de reconocimiento de la secuencia de reconocimiento y comprende una primera región hipervariable (HVR1), y en la que la segunda subunidad se une a un segundo semisitio de reconocimiento de la secuencia de reconocimiento y comprende una segunda región hipervariable (HVR2) región.

20 En una dicha realización del procedimiento, la primera subunidad de meganucleasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad de secuencia con los restos 198-344 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18 o los restos 7-153 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27, y la segunda subunidad de meganucleasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad de secuencia con los restos 7-153 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18 o los restos 198-344 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27.

25 En otra dicha realización del procedimiento, la región HVR1 comprende Y en una posición correspondiente a: (a) posición 215 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18; o (b) posición 24 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27. En otra de tales realizaciones, la región HVR1 comprende G en una posición correspondiente a: (a) la posición 233 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18; o (b) la posición 42 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27. En otra de tales realizaciones, la región HVR1 comprende uno o más de Y y G en las posiciones correspondientes a (a) las posiciones 215 y 233, respectivamente, de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18; o (b) las posiciones 24 y 42, respectivamente, de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-27.

30 En otra dicha realización del procedimiento, la región HVR2 comprende T en una posición correspondiente a: (a) la posición 26 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18; o (b) la posición 217 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27. En otra de tales realizaciones, la región HVR2 comprende F o Y en una posición correspondiente a: (a) la posición 28 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18; o (b) la posición 219 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27. En otra de tales realizaciones, la región HVR2 comprende F en una posición correspondiente a: (a) la posición 38 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18; o (b) la posición 229 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27. En otra de tales realizaciones, la región HVR2 comprende S en una posición correspondiente a: (a) la posición 44 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18; o (b) la posición 235 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27. En otra de tales realizaciones, la región HVR2 comprende F o Y en una posición correspondiente a: (a) la posición 46 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18; o (b) la posición 237 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27. En otra de tales realizaciones, la región HVR2 comprende uno o más de T, F o Y, F, S, y F o Y, y R en las posiciones correspondientes a: (a) las posiciones 26, 28, 38, 44 y 46, respectivamente, de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18; o (b) las posiciones 217, 219, 229, 235 y 237, respectivamente, de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27.

35 En otra dicha realización del procedimiento, la región HVR1 comprende los restos 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-18 o los restos 24-79 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-27. En otra de tales realizaciones, la región HVR2 comprende los restos 24-79 de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-18 o los restos 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-27.

40 En otra dicha realización del procedimiento, la primera subunidad de meganucleasa comprende los restos 198-344 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18 o los restos 7-153 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27. En otra de tales realizaciones, la segunda subunidad de meganucleasa comprende los restos 7-153 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18 o los restos 198-344 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27.

45 En otra dicha realización del procedimiento, la meganucleasa recombinante es una meganucleasa de cadena sencilla que comprende un enlazador, en la que el enlazador se une covalentemente a la primera subunidad y a la segunda subunidad.

50 En otra dicha realización del procedimiento, la meganucleasa recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO:8-27.

55 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de

inmunoterapia para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, en el que dicha composición farmacéutica comprende una célula modificada genéticamente, tal como se describe en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una célula modificada genéticamente producida de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización del procedimiento, el cáncer que se va a tratar se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de origen de linfocitos B, cáncer de mama, cáncer gástrico, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, sarcoma de rhabdomio, leucemia y linfoma de Hodgkin.

En otra realización del procedimiento, el cáncer de origen de linfocitos B se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda de linaje B, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B y linfoma no Hodgkin de linfocitos B.

El CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular. En algunas realizaciones, el dominio o resto de unión a ligando extracelular puede estar en forma de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que proviene de un anticuerpo monoclonal, que proporciona especificidad para un epítipo o antígeno particular (por ejemplo, un epítipo o antígeno presente preferentemente en la superficie de una célula, tal como una célula cancerosa u otra célula o partícula que causa enfermedades). El scFv se puede conectar a través de una secuencia de enlazador. El dominio de unión al ligando extracelular puede ser específico para cualquier antígeno o epítipo de interés. En algunas realizaciones, el scFv puede ser humanizado. El dominio extracelular de un receptor de antígeno quimérico también puede comprender un autoantígeno (véase, Payne y col. (2016), *Science* 353(6295): 179-184), que puede ser reconocido por los receptores de linfocitos B específicos de autoantígeno en linfocitos B, dirigiendo así a los linfocitos T al direccionamiento y la destrucción específica de los linfocitos B autorreactivos en enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos. Dichos CAR se pueden denominar receptores de autoanticuerpos quiméricos (CAAR), y su uso está comprendido en la invención.

Los aspectos anteriores y otros aspectos y realizaciones de la presente invención se pueden entender más completamente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada y reivindicaciones. Determinadas características de la invención, que, en aras de la claridad, se han descrito en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una única realización. Todas las combinaciones de las realizaciones están específicamente abarcadas por la presente invención y se desvelan en el presente documento como si todas y cada una de las combinaciones se desvelasen de manera individual y explícita. En cambio, diversas características de la invención que, por brevedad, se han descrito en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las subcombinaciones de características enumeradas en las realizaciones también están específicamente abarcadas por la presente invención y se divulgan en el presente documento como si todas y cada una de las subcombinaciones se revelaran de manera individual y explícita en el presente documento. Las realizaciones de cada aspecto de la presente invención desveladas en el presente documento se aplican entre sí a cada aspecto de la invención *mutatis mutandis*.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Secuencias de reconocimiento de TRC en el gen de la región constante alfa de TRC humano. A) Cada secuencia de reconocimiento dirigida por una meganucleasa recombinante de la invención comprende dos semisitios de reconocimiento. Cada semisitio de reconocimiento comprende 9 pares de bases, separadas por una secuencia central de 4 pares de bases. La secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (SEQ ID NO:3) abarca los nucleótidos 187-208 de la región constante alfa de linfocitos T humanos (SEQ ID NO:1), y comprende dos semisitios de reconocimiento denominados TRC1 y TRC2. La secuencia de reconocimiento TRC 3-4 (SEQ ID NO:4) abarca los nucleótidos 93-114 de la región constante alfa de linfocitos T humanos (SEQ ID NO:1), y comprende dos semisitios de reconocimiento denominados TRC3 y TRC4. La secuencia de reconocimiento TRC 7-8 (SEQ ID NO:5) abarca los nucleótidos 118-139 de la región constante alfa de linfocitos T humanos (SEQ ID NO:1), y comprende dos semisitios de reconocimiento denominados TRC7 y TRC8. B) Las meganucleasas recombinantes de la invención comprenden dos subunidades, en las que la primera subunidad que comprende la región HVR1 se une a un primer semisitio de reconocimiento (por ejemplo, TRC1, TRC3 o TRC7) y la segunda subunidad que comprende la región HVR2 se une a un segundo semisitio de reconocimiento (por ejemplo, TRC2, TRC4 o TRC8). En realizaciones en las que la meganucleasa recombinante es una meganucleasa de cadena sencilla, la primera subunidad que comprende la región HVR1 se puede posicionar como subunidad N-terminal o C-terminal. Igualmente, la segunda subunidad que comprende la región HVR2 se puede posicionar como subunidad N-terminal o C-terminal.

Figura 2A-B. Alineación de aminoácidos de subunidades de unión a TRC1. A-B) Algunas meganucleasas recombinantes abarcadas por la invención comprenden una subunidad que se une al semisitio de reconocimiento TRC1 de 9 pares de bases de la SEQ ID NO:3. Se proporcionan alineamientos de secuencia de aminoácidos para las subunidades de unión a TRC1 (SEQ ID NO: 33-52) de las meganucleasas recombinantes establecidas en las SEQ ID NO: 8-27. Tal como muestra, la subunidad de unión a TRC1 de las SEQ ID NO: 8-18 comprende los restos 198-344, mientras que la subunidad de unión a TRC1 de la SEQ ID NO: 19-27 comprende los restos 7-153. Cada subunidad de unión a TRC1 comprende una región hipervariable de 56 aminoácidos tal como se indica. Los restos

variables dentro de la región hipervariable están sombreados, con los aminoácidos más frecuentes en cada posición más resaltados; los restos más frecuentes están en negrita, mientras que los segundos más frecuentes están en negrita y cursiva. Los restos fuera de la región hipervariable son idénticos en cada subunidad, con la excepción de un resto Q o E en la posición 80 o la posición 271 (véase, la Patente de los EE.UU. N.º 8.021.867).
 5 Todas las subunidades de unión a TRC1 proporcionadas en la Figura 2 comparten al menos el 90% de identidad de secuencia con la subunidad de unión a TRC1 (restos 198-344) de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE (SEQ ID NO:33). Los números de restos que se muestran son los de las SEQ ID NO:8-27.

Figura 3A-B. Alineación de aminoácidos de subunidades de unión a TRC2. A-B) Algunas meganucleasas recombinantes abarcadas por la invención comprenden una subunidad que se une al semisitio de reconocimiento TRC2 de 9 pares de bases de la SEQ ID NO:3. Se proporcionan alineaciones de secuencias de aminoácidos para las subunidades de unión a TRC2 (SEQ ID NO: 58-77) de las meganucleasas recombinantes establecidas en las SEQ ID NO: 8-27. Tal como muestra, la subunidad de unión a TRC2 de las SEQ ID NO: 8-18 comprende los restos 7-153, mientras que la subunidad de unión a TRC2 de las SEQ ID NO: 19-27 comprende los restos 198-344. Cada subunidad de unión a TRC2 comprende una región hipervariable de 56 aminoácidos tal como se indica. Los restos variables dentro de la región hipervariable están sombreados, con los aminoácidos más frecuentes en cada posición más resaltados; los restos más frecuentes están en negrita, mientras que los segundos más frecuentes están en negrita y cursiva. Los restos fuera de la región hipervariable son idénticos en cada subunidad, con las excepciones de un resto Q o E en la posición 80 o la posición 271 (véase, la Patente de EE.UU. N.º 8.021.867), y un resto R en la posición 330 de las meganucleasas TRC 1-2x.87 EE, TRC 1-2x.87 QE, TRC 1-2x.87 EQ, TRC 1-2x.87 y TRC 1-2x.163 (sombreado en gris y subrayado). Todas las subunidades de unión a TRC2 proporcionadas en la Figura 3 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la subunidad de unión a TRC2 (restos 7-153) de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE (SEQ ID NO:58). Los números de restos que se muestran son los de las SEQ ID NO:8-27.

Figura 4. Alineación de aminoácidos de las subunidades de unión a TRC3. Algunas meganucleasas recombinantes abarcadas por la invención comprenden una subunidad que se une al semisitio de reconocimiento de TRC3 de 9 pares de bases de la SEQ ID NO:4. Se proporcionan alineaciones de secuencias de aminoácidos para las subunidades de unión a TRC3 (SEQ ID NO:53 y 54) de las meganucleasas recombinantes establecidas en las SEQ ID NO: 28 y 29. Tal como muestra, la subunidad de unión a TRC3 de las SEQ ID NO: 28 y 29 comprende los restos 7-153. Cada subunidad de unión a TRC3 comprende una región hipervariable de 56 aminoácidos tal como se indica. Los restos variables dentro de la región hipervariable están sombreados. Los restos fuera de la región hipervariable son idénticos en cada subunidad, con las excepciones de un resto Q o E en la posición 80 (véase, la Patente de los EE.UU. N.º 8.021.867). Las subunidades de unión a TRC3 de las meganucleasas TRC 3-4x.3 y TRC 3-4x.19 comparten una identidad de secuencia del 97 %. Los números de restos que se muestran son los de las SEQ ID NO: 28 y 29.

Figura 5. Alineación de aminoácidos de las subunidades de unión a TRC4. Algunas meganucleasas recombinantes abarcadas por la invención comprenden una subunidad que se une al semisitio de reconocimiento de TRC4 de 9 pares de bases de la SEQ ID NO:4. Se proporcionan alineaciones de secuencias de aminoácidos para las subunidades de unión a TRC4 (SEQ ID NO:78 y 79) de las meganucleasas recombinantes establecidas en las SEQ ID NO:28 y 29. Tal como muestra, la subunidad de unión a TRC4 de las SEQ ID NO: 28 y 29 comprende los restos 198-344. Cada subunidad de unión a TRC4 comprende una región hipervariable de 56 aminoácidos tal como se indica. Los restos variables dentro de la región hipervariable están sombreados. Los restos fuera de la región hipervariable son idénticos en cada subunidad, con las excepciones de un resto Q o E en la posición 80 (véase, la Patente de los EE.UU. N.º 8.021.867). Las subunidades de unión a TRC4 de las meganucleasas TRC 3-4x.3 y TRC 3-4x.19 comparten una identidad de secuencia del 97 %. Los números de restos que se muestran son los de las SEQ ID NO: 28 y 29.

Figura 6A-B. Alineación de aminoácidos de subunidades de unión a TRC7. A-B) Algunas meganucleasas recombinantes abarcadas por la invención comprenden una subunidad que se une al semisitio de reconocimiento TRC7 de 9 pares de bases de la SEQ ID NO:5. Se proporcionan alineaciones de secuencias de aminoácidos para las subunidades de unión a TRC7 (SEQ ID NO: 55-57) de las meganucleasas recombinantes establecidas en las SEQ ID NO: 30-32. Tal como muestra, la subunidad de unión a TRC7 de la SEQ ID NO: 30 comprende los restos 7-153, mientras que la subunidad de unión a TRC7 de las SEQ ID NO:31 y 32 comprende los restos 198-344. Cada subunidad de unión a TRC7 comprende una región hipervariable de 56 aminoácidos tal como se indica. Los restos variables dentro de la región hipervariable están sombreados, con los aminoácidos más frecuentes en cada posición más resaltados; los restos más frecuentes están en negrita, mientras que los segundos más frecuentes están en negrita y cursiva. Los restos fuera de la región hipervariable son idénticos en cada subunidad, con la excepción de un resto Q o E en la posición 80 o la posición 271 (véase, la Patente de los EE.UU. N.º 8.021.867). Todas las subunidades de unión a TRC7 proporcionadas en la Figura 6 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la subunidad de unión a TRC7 (restos 7-153) de la meganucleasa TRC 7-8x.7 (SEQ ID NO:55). Los números de restos que se muestran son los de las SEQ ID NO:30-32.

Figura 7A-B. Alineación de aminoácidos de las subunidades de unión a TRC8. A-B) Algunas meganucleasas recombinantes abarcadas por la invención comprenden una subunidad que se une al semisitio de reconocimiento TRC8 de 9 pares de bases de la SEQ ID NO:5. Se proporcionan alineaciones de secuencias de aminoácidos para las subunidades de unión a TRC8 (SEQ ID NO: 80-82) de las meganucleasas recombinantes establecidas en las SEQ ID NO: 30-32. Tal como muestra, la subunidad de unión a TRC8 de la SEQ ID NO:30 comprende los restos 198-344, mientras que la subunidad de unión a TRC8 de las SEQ ID NO:31 y 32 comprende los restos 7-153. Cada subunidad de unión a TRC8 comprende una región hipervariable de 56 aminoácidos tal como se indica. Los

restos variables dentro de la región hipervariable están sombreados, con los aminoácidos más frecuentes en cada posición más resaltados; los restos más frecuentes están en negrita, mientras que los segundos más frecuentes están en negrita y cursiva. Los restos fuera de la región hipervariable son idénticos en cada subunidad, con la excepción de un resto Q o E en la posición 80 o la posición 271 (véase, la Patente de los EE.UU. N.º 8.021.867).
 5 Todas las subunidades de unión a TRC8 proporcionadas en la Figura 7 comparten al menos un 90% de identidad de secuencia con la subunidad de unión a TRC8 (restos 198-344) de la meganucleasa TRC 7-8x.7 (SEQ ID NO:80). Los números de restos que se muestran son los de las SEQ ID NO:30-32.

Figura 8. Esquema del ensayo indicador en células CHO para evaluar meganucleasas recombinantes dirigidas a secuencias de reconocimiento encontradas en la región constante alfa del receptor de linfocitos T (SEQ ID NO:1).
 10 Para las meganucleasas recombinantes descritas en el presente documento, se produjo una línea celular CHO en la que un casete indicador se integró de forma estable en el genoma de la célula. El casete indicador comprendía, en orden de 5' a 3': un promotor temprano de SV40; los 2/3 desde 5' del gen GFP; la secuencia de reconocimiento para una meganucleasa diseñada genéticamente de la invención (por ejemplo, la secuencia de reconocimiento TRC 1-2, la secuencia de reconocimiento TRC 3-4, o la secuencia de reconocimiento TRC 7-8); la secuencia de reconocimiento para la meganucleasa CHO-23/24 (WO/2012/167192); y los 2/3 desde 3' del gen GFP. Las células
 15 transfectadas de manera estable con este casete no expresaban GFP en ausencia de un agente inductor de ruptura de ADN. Las meganucleasas se introdujeron por transducción de ADN plasmídico o ARNm que codifica cada meganucleasa. Cuando se indujo una ruptura de ADN en cualquiera de las secuencias de reconocimiento de meganucleasa, las regiones duplicadas del gen GFP se recombinan entre sí para producir un gen GFP funcional. El porcentaje de células que expresan GFP se podría determinar por citometría de flujo como una medida indirecta de la frecuencia de escisión del genoma por las meganucleasas.

Figura 9. Eficiencia de meganucleasas recombinantes para reconocer y escindir secuencias de reconocimiento en la región constante alfa del receptor de linfocitos T humanos (SEQ ID NO:1) en un ensayo de indicador de células CHO. Cada una de las meganucleasas recombinantes establecidas en las SEQ ID NO:8-32 se diseñó genéticamente para apuntar a la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (SEQ ID NO: 3), la secuencia de reconocimiento TRC 3-4 (SEQ ID NO: 4), o la secuencia de reconocimiento TRC 7-8 (SEQ ID NO: 5), y se seleccionaron para determinar su eficacia en el ensayo de indicador de células CHO. Los resultados mostrados proporcionan el porcentaje de células que expresan GFP observadas en cada ensayo, que indica la eficacia de cada meganucleasa para escindir una secuencia de reconocimiento de TRC diana o la secuencia de reconocimiento CHO-23/24. Un control negativo (RHO 1-2 bs) se incluyó adicionalmente en cada ensayo. A)-C) Meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. D) Meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento TRC 3-4. E)-F) Meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento TRC 7-8. G) Variantes de la meganucleasa TRC 1-2x.87, en la que la Q en la posición 271 está sustituida con E (TRC 1-2x.87 QE), la Q en la posición 80 está sustituida con E (TRC 1-2x.87 EQ), o la Q en la posición 80 y la Q en la posición
 20 271 están ambos sustituidos con E (TRC 1-2x.87 EE).

Figura 10. Curso temporal de la eficacia de la meganucleasa recombinante en el ensayo indicador de células CHO. Las meganucleasas TRC 1-2x.87 QE, TRC 1-2x.87 EQ y TRC 1-2x.87 EE se evaluaron en el ensayo indicador CHO, con el porcentaje de células que expresan GFP determinado 1, 4, 6, 8 y 12 días después de la introducción de ARNm que codifica meganucleasa en las células indicadoras CHO.

Figura 11. Análisis de ADN genómico de células Jurkat después de la transfección con meganucleasas TRC 1-2. A las 72 horas después de la transfección con ARNm que codifica las meganucleasas TRC 1-2, se recolectó el ADN genómico y se realizó un ensayo de endonucleasa T7 para estimar la modificación genética en la secuencia de reconocimiento endógena de TRC 1-2.

Figura 12. Respuesta a la dosis de la expresión de meganucleasa TRC 1-2 en células Jurkat en la modificación genética en la secuencia de reconocimiento endógena de TRC 1-2. Las células Jurkat se transfectaron con 3 µg o 1 µg de un ARNm de meganucleasa TRC 1-2 dado. A las 96 horas, el ADN genómico se analizó usando un ensayo de endonucleasa T7.

Figura 13. Escisión de la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2 en linfocitos T humanos. A) Los linfocitos T CD3⁺ se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, luego se electroporaron con ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE. El ADN genómico se recogió a los 3 días y a los 7 días después de la transfección, y se analizó usando un ensayo de endonucleasa T7. B) Para determinar si las mutaciones en la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2 endógena fueron suficientes para eliminar la expresión superficial del receptor de linfocitos T, las células se analizaron por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD3. Las células de control (transfectadas con agua) y las células transfectadas con TRC 1-2x.87 EE se analizaron el día 3 y el día 7 después de la transfección, y se determinó el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ y CD3⁻.
 50
 55

Figura 14. Secuencias de ácido nucleico de delecciones representativas que se observaron en la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2 en linfocitos T humanos después de la expresión de meganucleasas TRC 1-2.
 60

Figura 15. Diagrama que ilustra elementos de secuencia de vectores de AAV recombinantes y su uso en combinación con una nucleasa diseñada genéticamente para insertar una secuencia de ácido nucleico exógeno en el gen endógeno de la región constante alfa del TCR.

Figura 16. Mapa del plásmido utilizado para producir el vector AAV405.
 Figura 17. Mapa del plásmido utilizado para producir el vector AAV406.
 Figura 18. Determinación del momento de la transfección de ARNm de meganucleasa y la transducción de AAV recombinante para mejorar la eficacia de transducción de AAV. Los linfocitos T CD3⁺ se electroporaron con ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE y a las 2, 4 u 8 horas después de la transfección, las células se transdujeron con un vector de AAV recombinante que codifica la GFP (GFP-AAV). La expresión de GFP en los
 65

linfocitos T se analizó por citometría de flujo a las 72 horas después de la transducción para determinar la eficiencia de la transducción.

Figura 19. Análisis de la inserción de una secuencia de ácido nucleico exógeno en linfocitos T humanos utilizando vectores de AAV recombinantes. Los linfocitos T CD3⁺ se transfectaron con ARNm de TRC 1-2x.87 EE y posteriormente se transdujeron (2 horas después de la transfección) con AAV405 o AAV406. Los controles de solo transducción se transfectaron de forma simulada (con agua) y se transdujeron con AAV405 o AAV406. Los controles de meganucleasa solo se transfectaron con TRC 1-2x.87 EE y luego se transdujeron de forma simulada (con agua) a las 2 horas después de la transfección. El ADN genómico se recolectó de los linfocitos T y el locus TRC 1-2 se amplificó por PCR usando cebadores que reconocieron secuencias más allá de la región de homología en los vectores de AAV. Los cebadores de PCR fuera de las regiones de homología solo permitieron la amplificación del genoma de linfocitos T, no de los vectores AAV. Los productos de PCR se purificaron y se digirieron con EagI. Después se analizó la escisión de los productos de PCR.

Figura 20. Caracterización de la inserción de EagI en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 de linfocitos T humanos usando AAV405. A) El producto de PCR no digerido generado a partir de experimentos anteriores se clonó en un vector como pCR. La PCR de colonias se realizó usando cebadores directos e inversos M13 y una porción de productos de PCR de células transfectadas con TRC 1-2x.87 EE y AAV405 se analizó por electroforesis en gel. El análisis muestra una mezcla de productos de PCR de longitud completa (aproximadamente 1600 pb), insertos más pequeños y plásmidos vacíos (aproximadamente 300 pb). B) En paralelo, otra porción de productos de PCR se digirió con EagI para determinar el porcentaje de clones que contienen el sitio de reconocimiento de EagI insertado en la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2. Los productos de PCR escindidos con EagI generaron fragmentos esperados de aproximadamente 700 y 800 pb.

Figura 21. Caracterización de la inserción de EagI en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 de linfocitos T humanos usando AAV406. A) El producto de PCR no digerido generado a partir de experimentos anteriores se clonó en un vector como pCR. La PCR de colonias se realizó usando cebadores directos e inversos M13 y una porción de productos de PCR de células transfectadas con TRC 1-2x.87 EE y AAV406 se analizó por electroforesis en gel. El análisis muestra una mezcla de productos de PCR de longitud completa (aproximadamente 1600 pb), insertos más pequeños y plásmidos vacíos (aproximadamente 300 pb). B) En paralelo, otra porción de productos de PCR se digirió con EagI para determinar el porcentaje de clones que contienen el sitio de reconocimiento de EagI insertado en la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2. Los productos de PCR escindidos con EagI generaron fragmentos esperados de aproximadamente 700 y 800 pb.

Figura 22. A) Secuencias de ácido nucleico de deleciones e inserciones representativas (es decir, indel) que se observaron en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 en linfocitos T humanos después de la expresión de meganucleasas TRC 1-2. B) Secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2 que confirma la inserción de la secuencia de ácido nucleico exógeno que comprende el sitio de restricción EagI.

Figura 23. Mejora de la eficiencia de transducción de AAV recombinante. La eficacia de la transducción se analizó adicionalmente optimizando el momento de la transfección de ARNm de meganucleasa y la posterior transducción de AAV. Los linfocitos T CD3⁺ se electroporaron con el ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE y posteriormente se transdujeron con GFP-AAV inmediatamente después de la transfección o 2 horas después de la transfección. Además, los linfocitos T restantes no estimulados se transdujeron con GFP-AAV. También se analizaron células transducidas de manera simulada. A las 72 horas tras la transducción, se analizó la expresión de GFP en las células por citometría de flujo para determinar la eficacia de transducción de AAV.

Figura 24. Mapa del plásmido utilizado para producir el vector AAV-CAR100 (AAV408).

Figura 25. Mapa del plásmido utilizado para producir el vector AAV-CAR763 (AAV412).

Figura 26. Inserción de la secuencia codificante del receptor de antígeno quimérico en el sitio de reconocimiento TRC 1-2 en linfocitos T humanos. Se desarrolló un ensayo basado en PCR para determinar si el molde de HDR AAV412 se utilizó para reparar roturas de doble cadena en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2.

Figura 27. Inserción de la secuencia codificante del receptor de antígeno quimérico en el sitio de reconocimiento TRC 1-2 en linfocitos T humanos. Se desarrolló un ensayo basado en PCR para determinar si el molde de HDR AAV408 se utilizó para reparar roturas de doble cadena en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. A) Productos de PCR generados usando un par de cebadores que solo amplifica un producto en el extremo 5' del locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 si el gen CAR se ha insertado en ese locus. B) Productos de PCR generados usando un par de cebadores que solo amplifica un producto en el extremo 3' del locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 si el gen CAR se ha insertado en ese locus.

Figura 28. PCR digital. A) Esquema de un ensayo de PCR digital desarrollado para determinar cuantitativamente la eficacia de inserción de la secuencia codificante del receptor de antígeno quimérico en el sitio de reconocimiento TRC 1-2 en linfocitos T humanos. B) Resultados de la PCR digital en ADN genómico de linfocitos T humanos electroporados con un ARN de meganucleasa TRC 1-2x.87EE y/o cantidades crecientes de AAV408.

Figura 29. Expresión en superficie celular del receptor de antígeno quimérico CD19 en linfocitos T humanos. El nivel de expresión del receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 se determinó en células que tenían el gen CAR insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 usando AAV408 como molde de HDR. La expresión en la superficie celular se analizó por citometría de flujo. A) Células que fueron electroporadas y transducidas de manera simulada (MDI - 0), y células que fueron electroporadas y transducidas de manera simulada con cantidades crecientes de AAV408. B) Células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas de manera simulada (MDI - 0), y células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas con cantidades crecientes de AAV408.

Figura 30. Mapa del plásmido utilizado para producir el vector AAV421.

Figura 31. Mapa del plásmido utilizado para producir el vector AAV422.

Figura 32. Inserción de la secuencia codificante del receptor de antígeno quimérico. Se usaron procedimientos de PCR para determinar si la secuencia codificante del receptor de antígeno quimérico introducida por AAV421 o AAV422 se insertó en el sitio de reconocimiento TRC 1-2 escindido por la meganucleasa TRC 1-2x.87EE. A) Análisis de inserción después de la transducción con AAV421. B) Análisis de inserción después de la transducción con AAV422.

Figura 33. Expresión en superficie celular del receptor de antígeno quimérico CD19 en linfocitos T humanos. El nivel de expresión del receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 se determinó en células que tenían el gen CAR insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 usando AAV421 como molde de HDR. La expresión en la superficie celular se analizó por citometría de flujo. A) Células que fueron electroporadas y transducidas de manera simulada (MDI - 0), y células que fueron electroporadas y transducidas de manera simulada con cantidades crecientes de AAV421. B) Células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas de manera simulada (MDI - 0), y células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas con cantidades crecientes de AAV421.

Figura 34. Expansión de linfocitos T humanos que expresan un receptor de antígeno quimérico de superficie celular. Se determinaron los procedimientos para expandir y enriquecer preferentemente una población de linfocitos T CD3⁺/CAR⁺ después de la electroporación con ARNm para la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y transducción con AAV421. A) Suplementación con IL-7 (10 ng/ml) e IL-15 (10 ng/ml). B) Suplementación con IL-7 (10 ng/ml) e IL-15 (10 ng/ml), e incubación con células IM-9 inactivadas con mitomicina C. C) Suplementación con IL-7 (10 ng/ml) e IL-15 (10 ng/ml), y dos incubaciones con células IM-9 inactivadas con mitomicina C.

Figura 35. Expresión en superficie celular del receptor de antígeno quimérico CD19 en linfocitos T humanos. El nivel de expresión del receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 se determinó en células que tenían el gen CAR insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 usando AAV422 como molde de HDR. La expresión en la superficie celular se analizó por citometría de flujo. A) Células que fueron electroporadas y transducidas de manera simulada (MDI - 0), y células que fueron electroporadas y transducidas de manera simulada con cantidades crecientes de AAV422. B) Células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas de manera simulada (MDI - 0), y células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas con cantidades crecientes de AAV422.

Figura 36. Expansión de linfocitos T humanos que expresan un receptor de antígeno quimérico de superficie celular. Se determinaron los procedimientos para expandir y enriquecer preferentemente una población de linfocitos T CD3⁺/CAR⁺ después de la electroporación con ARNm para la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y transducción con AAV422. A) Suplementación con IL-7 (10 ng/ml) e IL-15 (10 ng/ml). B) Suplementación con IL-7 (10 ng/ml) e IL-15 (10 ng/ml), e incubación con células IM-9 inactivadas con mitomicina C. C) Suplementación con IL-7 (10 ng/ml) e IL-15 (10 ng/ml), y dos incubaciones con células IM-9 inactivadas con mitomicina C.

Figura 37. Eficacia de inactivación de meganucleasas utilizando AAV de cadena sencilla. Se realizaron experimentos para examinar la eficacia de inactivación de dos meganucleasas en linfocitos T humanos cuando se transducían de manera simultánea con un vector de AAV monocatenario. A) Células electroporadas con ARNm para TRC 1-2x.87EE y transducidas con cantidades crecientes del AAV412 monocatenario. B) Células electroporadas con ARNm para una meganucleasa dirigida al gen de microglobulina beta-2 y transducidas con cantidades crecientes del AAV412 monocatenario. C) Células electroporadas con ARNm para TRC 1-2x.87EE y transducidas con cantidades crecientes del AAV422 monocatenario.

Figura 38. Actividad funcional de los linfocitos T CAR anti-CD19. A) Ensayo ELISPOT de IFN-gamma, en el que las células Raji CD19+ o las células U937 CD19⁻ fueron la población diana. B) Ensayo de destrucción celular en el que las células CD19+ marcadas con luciferasa fueron la diana.

Figura 39. Expresión de receptores de antígeno quiméricos después de la transducción moldes de donantes de ADN linealizadas. Estos experimentos generaron plásmidos que contienen un gen CAR anti-CD19 flanqueado por brazos de homología que son homólogos al locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Se usaron diferentes promotores en algunos plásmidos, y los brazos de homología fueron "cortos" (200 pb en el brazo de homología de 5' y 180 pb en el brazo de homología de 3') o "largos" (985 pb en el brazo de homología de 5' y 763 pb en el brazo de homología de 3'). Los plásmidos donadores de CAR se linealizaron en un sitio de restricción en la estructura principal del vector y se purificaron en gel. A) Tinción de fondo de CD37⁺/CAR⁺. B) Células electroporadas con ARNm de TRC 1-2x.87EE solo. C) Células coelectroporadas con ARNm de TRC 1-2x.87EE y un vector de brazo de homología largo con un promotor central EF1 α con un potenciador HTLV. D) Células coelectroporadas con ARNm de TRC 1-2x.87EE y un vector de brazo de homología corto con promotor central EF1 α (sin potenciador). E) Células electroporadas con un vector de brazo de homología larga con un promotor central EF1 α con un potenciador HTLV en ausencia de ARNm de TRC 1-2x.87EE. F) Células electroporadas con un vector de brazo de homología corto con promotor central EF1 α (sin potenciador) en ausencia de ARNm de TRC 1-2x.87EE. G) Células electroporadas con una construcción de brazo de homología larga que contiene un promotor MND que impulsa la expresión del CAR y un intrón en el extremo 5' del gen CAR, así como ARNm de TRC 1-2x.87EE. H) Células electroporadas con una construcción de brazo de homología larga que contiene un promotor MND que dirige la expresión del CAR y sin intrón, así como ARNm de TRC 1-2x.87EE. I) Células electroporadas con un plásmido de brazo de homología corto con el promotor MND y sin intrón, así como ARNm de TRC 1-2x.87EE. J) Células electroporadas con una construcción de brazo de homología largo que contiene un promotor MND que dirige la expresión del CAR y un intrón en el extremo 5' del gen CAR, pero no ARNm de TRC 1-2x.87EE. K) Células electroporadas con una construcción de brazo de homología largo que contiene un promotor MND que dirige la expresión del CAR y sin intrón, pero no ARNm de TRC 1-2x.87EE. L) Células electroporadas con un plásmido de

brazo de homología corto con el promotor MND y sin intrón, pero no ARNm de TRC 1-2x.87EE. M) Células electroporadas con una construcción de brazo de homología corto que contenía un promotor JeT, así como ARNm de TRC 1-2x.87EE. N) Células electroporadas con una construcción de brazo de homología largo que contenía un promotor de CMV, así como ARNm de TRC 1-2x.87EE. O) Células electroporadas con una construcción de brazo de homología corto que contenía un promotor JeT, pero no ARNm de TRC 1-2x.87EE. P) Células electroporadas con una construcción de brazo de homología largo que contenía un promotor de CMV, pero no ARNm de TRC 1-2x.87EE.

Figura 40. Análisis de PCR para determinar si la región codificante del receptor de antígeno quimérico administrada por construcciones de ADN linealizadas se insertó en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 en linfocitos T humanos.

Figura 41. Mapa del plásmido utilizado para producir el vector AAV423.

Figura 42. Expresión en superficie celular del receptor de antígeno quimérico CD19 en linfocitos T humanos. El nivel de expresión del receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 se determinó en células que tenían el gen CAR insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 usando AAV423 como molde de HDR. La expresión en la superficie celular se analizó por citometría de flujo. A) Células que fueron electroporadas y transducidas de manera simulada (MDI - 0), y células que fueron electroporadas y transducidas de manera simulada con cantidades crecientes de AAV423. B) Células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas de manera simulada (MDI - 0), y células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas con cantidades crecientes de AAV423.

Figura 43. Inserción de la secuencia codificante del receptor de antígeno quimérico. Se usaron procedimientos de PCR para determinar si la secuencia codificante del receptor de antígeno quimérico introducida por AAV423 se insertó en el sitio de reconocimiento TRC 1-2 escindido por la meganucleasa TRC 1-2x.87EE.

Figura 44. Análisis de fenotipo de linfocitos T con CAR anti-CD 19. A) Los linfocitos T con CAR se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87 EE, luego se transdujo con un vector AAV6 que comprende un casete de expresión de CAR anti-CD 19 dirigido por un promotor JeT y flanqueado por brazos de homología. Después de 5 días de cultivo con IL-2 (10 ng/ml), se analizó la expresión de CD3 en la superficie celular de las células y de CAR anti-CD 19 por citometría de flujo. B) las células CD3⁻ se enriquecieron por el agotamiento de células CD3⁺ usando perlas magnéticas anti-CD3. Las células agotadas se cultivaron durante 3 días en IL-15 (10 ng/ml) e IL-21 (10 ng/ml) y se volvieron a analizar para determinar la expresión en la superficie celular de CD3 y CAR anti-CD 19. C) La población purificada de linfocitos T CD3⁻ CD19-CAR se analizó mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células que eran CD4⁺ y CD8⁺. D) La población purificada de linfocitos T CD3⁻ CD19-CAR se analizaron adicionalmente mediante citometría de flujo para determinar si eran linfocitos T de memoria central, linfocitos T de memoria de transición, o linfocitos T efectores de memoria mediante tinción para CD62L y CD45RO.

Figura 45. Modelo de linfoma diseminado de Raji. Células Raji que expresan establemente luciferasa de luciérnaga (ffLuc)⁴⁴ se inyectaron por vía i.v. en ratones hembra NSG de 5-6 semanas de vida el día 1, a una dosis de 2,0 x 10⁵ células por ratón. El día 4, se inyectó a los ratones por vía i.v. con PBS o PBS que contenían linfocitos T con TCR KO de control editado de genes de las PBMC del mismo donante sano o PBS que contenía las dosis indicadas de linfocitos T con CAR preparados a partir del mismo donante. En los días indicados, los ratones vivos fueron inyectados por vía i.p. con sustrato de Luciferina (150 mg/kg en solución salina), anestesiado, y la actividad de luciferasa medida después de 7 minutos usando IVIS SpectrumCT® (Perkin Elmer, Waltham, MA). Los datos se analizaron y se exportaron con el programa informático Living Image 4.5.1 (Perkin Elmer, Waltham, MA). La intensidad de la señal de luminiscencia está representada por la radiación en p/seg/ cm²/sr.

Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de nucleótidos del gen de la región constante alfa del receptor de linfocitos T humanos (gen del NCBI con ID NO. 28755).

La SEQ ID NO: 2 establece la secuencia de aminoácidos codificada por la región constante alfa del receptor de linfocitos T humanos.

La SEQ ID NO: 3 establece la secuencia de aminoácidos de la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2.

La SEQ ID NO: 4 establece la secuencia de nucleótidos de la secuencia de reconocimiento de TRC 3-4.

La SEQ ID NO: 5 establece la secuencia de nucleótidos de la secuencia de reconocimiento de TRC 7-8.

La SEQ ID NO: 6 establece la secuencia de aminoácidos de I-Crel.

La SEQ ID NO: 7 establece la secuencia de aminoácidos del motivo LAGLIDADG.

La SEQ ID NO: 8 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE.

La SEQ ID NO: 9 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.87 QE.

La SEQ ID NO: 10 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EQ.

La SEQ ID NO: 11 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.87.

La SEQ ID NO: 12 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.6.

La SEQ ID NO: 13 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.20.

La SEQ ID NO: 14 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.55.

La SEQ ID NO: 15 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.60.

La SEQ ID NO: 16 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.105.

La SEQ ID NO: 17 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.163.

La SEQ ID NO: 18 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.113_3.

La SEQ ID NO: 19 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.5.

ES 2 803 728 T3

- La SEQ ID NO: 20 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.8.
 La SEQ ID NO: 21 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.25.
 La SEQ ID NO: 22 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.72.
 La SEQ ID NO: 23 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.80.
 5 La SEQ ID NO: 24 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.84.
 La SEQ ID NO: 25 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.120.
 La SEQ ID NO: 26 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.113_1.
 La SEQ ID NO: 27 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 1-2x.113_2.
 La SEQ ID NO: 28 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 3-4x.3.
 10 La SEQ ID NO: 29 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 3-4x.19.
 La SEQ ID NO: 30 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 7-8x.7.
 La SEQ ID NO: 31 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 7-8x.9.
 La SEQ ID NO: 32 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa TRC 7-8x.14.
 La SEQ ID NO: 33 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE.
 15 La SEQ ID NO: 34 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.87 QE.
 La SEQ ID NO: 35 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EQ.
 La SEQ ID NO: 36 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.87.
 La SEQ ID NO: 37 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.6.
 La SEQ ID NO: 38 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.20.
 20 La SEQ ID NO: 39 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.55.
 La SEQ ID NO: 40 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.60.
 La SEQ ID NO: 41 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.105.
 La SEQ ID NO: 42 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.163.
 La SEQ ID NO: 43 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.113_3.
 25 La SEQ ID NO: 44 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.5.
 La SEQ ID NO: 45 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.8.
 La SEQ ID NO: 46 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.25.
 La SEQ ID NO: 47 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.72.
 La SEQ ID NO: 48 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.80.
 30 La SEQ ID NO: 49 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.84.
 La SEQ ID NO: 50 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.120.
 La SEQ ID NO: 51 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.113_1.
 La SEQ ID NO: 52 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.113_2.
 La SEQ ID NO: 53 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 3-4x.3.
 35 La SEQ ID NO: 54 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 3-4x.19.
 La SEQ ID NO: 55 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 7-8x.7.
 La SEQ ID NO: 56 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 7-8x.9.
 La SEQ ID NO: 57 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 7-8x.14.
 La SEQ ID NO: 58 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE.
 40 La SEQ ID NO: 59 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.87 QE.
 La SEQ ID NO: 60 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EQ.
 La SEQ ID NO: 61 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.87.
 La SEQ ID NO: 62 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.6.
 La SEQ ID NO: 63 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.20.
 45 La SEQ ID NO: 64 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.55.
 La SEQ ID NO: 65 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.60.
 La SEQ ID NO: 66 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.105.
 La SEQ ID NO: 67 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.163.
 La SEQ ID NO: 68 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 1-2x.113_3.
 50 La SEQ ID NO: 69 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.5.
 La SEQ ID NO: 70 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.8.
 La SEQ ID NO: 71 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.25.
 La SEQ ID NO: 72 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.72.
 La SEQ ID NO: 73 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.80.
 55 La SEQ ID NO: 74 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.84.
 La SEQ ID NO: 75 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.120.
 La SEQ ID NO: 76 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.113_1.
 La SEQ ID NO: 77 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 1-2x.113_2.
 La SEQ ID NO: 78 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 3-4x.3.
 60 La SEQ ID NO: 79 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 3-4x.19.
 La SEQ ID NO: 80 establece los restos 198-344 de la meganucleasa TRC 7-8x.7.
 La SEQ ID NO: 81 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 7-8x.9.
 La SEQ ID NO: 82 establece los restos 7-153 de la meganucleasa TRC 7-8x.14.
 65 La SEQ ID NO: 83 establece la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido de la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2.
 La SEQ ID NO: 84 establece la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido de la secuencia de

reconocimiento de TRC 3-4.

La SEQ ID NO: 85 establece la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido de la secuencia de reconocimiento de TRC 7-8.

La SEQ ID NO: 86 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO:1.

5 La SEQ ID NO: 87 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 88 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

10 La SEQ ID NO: 89 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 90 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 91 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

15 La SEQ ID NO: 92 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 93 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

20 La SEQ ID NO: 94 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO:1 que comprende una inserción resultante de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 95 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO:1 que comprende una inserción resultante de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 96 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

25 La SEQ ID NO: 97 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 98 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

30 La SEQ ID NO: 99 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 100 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 101 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

35 La SEQ ID NO: 102 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 103 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

40 La SEQ ID NO: 104 establece los nucleótidos 162-233 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una delección que es resultado de la escisión y NHEJ.

La SEQ ID NO: 105 establece los nucleótidos 181-214 de la SEQ ID NO:1.

La SEQ ID NO: 106 establece los nucleótidos 181-214 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una secuencia de ácido nucleico exógeno insertada mediante recombinación homóloga.

La SEQ ID NO: 107 establece la secuencia de nucleótidos de un plásmido usado para generar el vector AAV405.

45 La SEQ ID NO: 108 establece la secuencia de nucleótidos de un plásmido usado para generar el vector AAV406.

La SEQ ID NO: 109 establece la secuencia de nucleótidos de un plásmido usado para generar el vector AAV-CAR100 (AAV408).

La SEQ ID NO: 110 establece la secuencia de nucleótidos de un plásmido usado para generar el vector AAV-CAR763 (AAV412).

50 La SEQ ID NO: 111 establece la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD 19.

La SEQ ID NO: 112 establece la secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a ligando extracelular anti-CD 19.

La SEQ ID NO: 113 establece la secuencia de aminoácidos de un dominio de señalización citoplasmática intracelular del receptor de antígeno quimérico.

55 La SEQ ID NO: 114 establece la secuencia de aminoácidos de un dominio coestimulador intracelular del receptor de antígeno quimérico.

La SEQ ID NO: 115 establece la secuencia de aminoácidos de un dominio de péptido señal del receptor de antígeno quimérico.

60 La SEQ ID NO: 116 establece la secuencia de aminoácidos de una región de bisagra del receptor de antígeno quimérico.

La SEQ ID NO: 117 establece la secuencia de aminoácidos de un dominio transmembrana del receptor de antígeno quimérico.

La SEQ ID NO: 118 establece la secuencia de nucleótidos de un promotor de núcleo EF-1 alfa.

La SEQ ID NO: 119 establece la secuencia de nucleótidos de un inserto de polinucleótido exógeno.

65 La SEQ ID NO: 120 establece la secuencia de nucleótidos del gen de la región constante alfa del TCR humano que comprende una secuencia de ácido nucleico exógeno insertada dentro de la secuencia de reconocimiento

TRC 1-2.

La SEQ ID NO: 121 establece la secuencia de nucleótidos del gen de la región constante alfa del TCR humano que comprende una secuencia de ácido nucleico exógeno insertada dentro de la secuencia de reconocimiento TRC 3-4.

5 La SEQ ID NO: 122 establece la secuencia de nucleótidos del gen de la región constante alfa del TCR humano que comprende una secuencia de ácido nucleico exógeno insertada dentro de la secuencia de reconocimiento TRC 7-8.

La SEQ ID NO: 123 establece la secuencia de ácido nucleico de un plásmido usado para generar el vector AAV421.

La SEQ ID NO: 124 establece la secuencia de ácido nucleico de un plásmido usado para generar el vector AAV422.

10 La SEQ ID NO: 125 establece la secuencia de ácido nucleico de un plásmido usado para generar el vector AAV423.

Descripción detallada de la invención

1.1 Referencias y definiciones

15 La presente invención puede realizarse de diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. Más bien, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta divulgación será minuciosa y completa, y transmitirá completamente el ámbito de la invención a los expertos en la técnica. Por ejemplo, las características ilustradas con respecto a una realización se pueden incorporar en otras realizaciones, y las características ilustradas con respecto a una realización particular se pueden eliminar de esa realización.

20 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. La terminología usada en la descripción de la invención en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitativa de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, "un", "uno", "una", o "el" puede significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una" célula puede significar una sola célula o una multiplicidad de células.

25 Tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique específicamente de otro modo, la palabra "o" se usa en el sentido inclusivo de "y/o" y no en el sentido exclusivo de "cualquiera/o".

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "meganucleasa" se refiere a una endonucleasa que se une al ADN bicatenario en una secuencia de reconocimiento que es mayor que 12 pares de bases. Preferentemente, la secuencia de reconocimiento para una meganucleasa de la invención es de 22 pares de bases. Una meganucleasa puede ser una endonucleasa que proviene de I-Crel, y puede referirse a una variante diseñada genéticamente de I-Crel que se ha modificado en relación con la I-Crel natural con respecto a, por ejemplo, la especificidad de unión al ADN, la actividad de escisión del ADN, la afinidad de unión al ADN o propiedades de dimerización. Los procedimientos para producir tales variantes modificadas de I-Crel se conoce en la técnica (por ejemplo, el documento WO 2007/047859). Una meganucleasa tal como se usa en el presente documento se une al ADN bicatenario como un heterodímero o como una "meganucleasa de cadena sencilla" en la que un par de dominios de unión a ADN se unen en un polipéptido único usando un enlazador peptídico. La expresión "endonucleasa autoguiada" es sinónimo del término "meganucleasa". Las meganucleasas de la invención son sustancialmente no tóxicas cuando se expresan en células, particularmente en linfocitos T humanos, de tal manera que las células se pueden transfectar y mantener a 37 °C sin observar efectos nocivos sobre la viabilidad celular o reducciones significativas en la actividad de escisión de meganucleasa cuando se mide usando los procedimientos descritos en el presente documento.

40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "meganucleasa de cadena sencilla" se refiere a un polipéptido que comprende un par de subunidades de nucleasa unidas por un enlazador. Una meganucleasa de cadena sencilla tiene la organización: Subunidad N-terminal - Enlazador - Subunidad C-terminal. Las dos subunidades de meganucleasa serán generalmente no idénticas en la secuencia de aminoácidos y reconocerán secuencias de ADN no idénticas. Por lo tanto, las meganucleasas monocatenarias suelen escindir secuencias de reconocimiento pseudopalindrómicas o no palindrómicas. Una meganucleasa de cadena sencilla se puede denominar "heterodímero de cadena sencilla" o "meganucleasa heterodimérica de cadena sencilla" aunque no es, de hecho, dimérica. En aras de la claridad, a menos que se especifique otra cosa, la expresión "meganucleasa" se puede referir a una meganucleasa dimérica o monocatenaria.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "enlazador" se refiere a una secuencia de péptidos exógenos usada para unir dos subunidades de meganucleasa en un solo polipéptido. Un enlazador puede tener una secuencia que se encuentra en proteínas naturales, o puede ser una secuencia artificial que no se encuentra en ninguna proteína natural. Un enlazador puede ser flexible y carecer de estructura secundaria o puede tener una propensión a formar una estructura tridimensional específica en condiciones fisiológicas. Un enlazador puede incluir, sin limitación, los abarcados por la Patente de Estados Unidos N.º 8.445.251. En algunas realizaciones, un enlazador puede tener una secuencia de aminoácidos que comprende los restos 154-195 de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-32.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término "TALEN" se refiere a una endonucleasa que comprende un dominio de unión a ADN que comprende 16-22 repeticiones de dominio TAL fusionadas a cualquier porción del dominio de nucleasa FokI.

Tal como se usa en el presente documento, el término "TALEN compacto" se refiere a una endonucleasa que comprende un dominio de unión a ADN con 16-22 repeticiones de dominio TAL fusionadas en cualquier orientación a cualquier porción catalíticamente activa del dominio de nucleasa de la endonucleasa autoguiada I-Tev1.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "CRISPR" se refiere a una endonucleasa basada en caspasa que comprende una caspasa, como Cas9, y un ARN guía que dirige la escisión del ADN de la caspasa mediante hibridación con un sitio de reconocimiento en el ADN genómico.

Tal como se usa en el presente documento, el término "megaTAL" se refiere a una nucleasa de cadena sencilla que comprende un dominio de unión al ADN efector de tipo activador de la transcripción (TALE) con una endonucleasa autoguiada diseñada genéticamente, específica de secuencia.

10 Tal como se usa en el presente documento, con respecto a una proteína, el término "recombinante" significa que tiene una secuencia de aminoácidos alterada como resultado de la aplicación de técnicas de ingeniería genética a los ácidos nucleicos que codifican la proteína y a las células u organismos que expresan la proteína. Con respecto a un ácido nucleico, el término "recombinante" significa que tiene una secuencia de ácido nucleico alterada como resultado de la aplicación de técnicas de ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética incluyen, pero sin limitación, PCR y tecnologías de clonación de ADN; transfección, transformación y otras tecnologías de transferencia de genes; recombinación homóloga; mutagénesis de sitio dirigido; y fusión de genes. De acuerdo con esta definición, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a una proteína natural, pero producida por clonación y expresión en un hospedador heterólogo, no se considera recombinante.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "tipo silvestre" se refiere al alelo natural más común (es decir, secuencia polinucleotídica) en la población de alelos del mismo tipo de gen, en el que un polipéptido codificado por el alelo de tipo silvestre tiene sus funciones originales. El término "tipo silvestre" también se refiere a un polipéptido codificado por un alelo de tipo silvestre. Los alelos (es decir, polinucleótidos) y polipéptidos de tipo silvestre se distinguen de alelos y polipéptidos mutantes o variantes, que comprenden una o más mutaciones y/o sustituciones relativas a la secuencia o secuencias de tipo silvestre. Mientras que un alelo o polipéptido de tipo silvestre puede conferir un fenotipo normal en un organismo, un alelo o polipéptido mutante o variante puede, en algunos casos, conferir un fenotipo alterado. Las nucleasas de tipo silvestre se distinguen de las nucleasas recombinantes o no naturales.

25 Tal como se usa en el presente documento con respecto a las proteínas recombinantes, el término "modificación" significa cualquier inserción, delección o sustitución de un resto de aminoácido en la secuencia recombinante con respecto a una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de tipo silvestre o natural).

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de reconocimiento" se refiere a una secuencia de ADN que está unida y escindida por una endonucleasa. En el caso de una meganucleasa, una secuencia de reconocimiento comprende un par de "semisitios" invertidos de 9 pares e bases que están separados por cuatro pares de bases. En el caso de una meganucleasa de cadena sencilla, el dominio N-terminal de la proteína contacta con un primer semisitio y el dominio C-terminal de la proteína contacta con un segundo semisitio. La escisión por una meganucleasa produce cuatro "salientes" de pares de bases en 3'. Los "salientes" o "extremos adhesivos" son segmentos cortos de ADN monocatenarios de cadena sencilla que se pueden producir mediante la escisión por endonucleasa de una secuencia de ADN bicatenario. En el caso de meganucleasas y meganucleasas de cadena sencilla derivadas de I-Crel, el saliente comprende las bases 10-13 de la secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases. En el caso de un TALEN compacto, la secuencia de reconocimiento comprende una primera secuencia CNNNGN que es reconocida por el dominio I-Tev1, seguido de un espaciador no específico de 4-16 pares de bases de longitud, seguido de una segunda secuencia de 16-22 pb de longitud que es reconocida por el dominio efector TAL (esta secuencia típicamente tiene una base de T en 5'). La escisión por un TALEN compacto produce dos salientes de pares de bases en 3'. En el caso de una CRISPR, la secuencia de reconocimiento es la secuencia, típicamente de 16-24 pares de bases, a la que el ARN guía se une a la escisión directa de Cas9. La escisión por una CRISPR produce extremos romos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sitio diana" o "secuencia diana" se refiere a una región del ADN cromosómico de una célula que comprende una secuencia de reconocimiento para una nucleasa.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "afinidad de unión al ADN" o "afinidad de unión" significa la tendencia de una meganucleasa a asociarse de manera no covalente con una molécula de ADN de referencia (por ejemplo, una secuencia de reconocimiento o una secuencia arbitraria). La afinidad de unión se mide por una constante de disociación, K_d . Tal como se usa en el presente documento, una nucleasa tiene afinidad de unión "alterada" si la K_d de la nucleasa para una secuencia de reconocimiento de referencia aumenta o disminuye mediante un cambio porcentual estadísticamente significativo con respecto a una nucleasa de referencia.

55 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "recombinación homóloga" o "RH" se refiere al proceso celular natural en el que se repara una rotura de ADN bicatenario usando una secuencia de ADN homóloga como molde de reparación (véase, por ejemplo, Cahill y col. (2006), *Front. Biosci.* 11:1958-1976). La secuencia de ADN homóloga puede ser una secuencia cromosómica endógena o un ácido nucleico exógeno que se suministró a la célula.

Tal como se usa en el presente documento, el término "unión de extremos no homólogos" o "NHEJ" se refiere al proceso celular natural en el que una ruptura de ADN bicatenario se repara mediante la unión directa de dos segmentos de ADN no homólogos (véase, por ejemplo, Cahill y col. (2006), *Front. Biosci.* 11:1958-1976). La reparación del ADN mediante uniones de extremos no homólogos es propensa a errores y con frecuencia da como resultado la adición o eliminación no secuenciada de secuencias de ADN en el sitio de reparación. En algunos casos, la escisión en una secuencia de reconocimiento diana que da como resultado NHEJ en un sitio de reconocimiento de diana. La escisión inducida por nucleasas de un sitio diana en la secuencia codificante de un gen seguido de reparación de ADN por NHEJ puede introducir mutaciones en la secuencia codificante, tales como las mutaciones de desplazamiento de marco, que alteran la función del gen. Por lo tanto, las nucleasas diseñadas genéticamente se pueden usar para inactivar eficazmente un gen en una población de células.

Tal como se usa en el presente documento, un "receptor de antígeno quimérico" o "CAR" se refiere a un receptor diseñado genéticamente que confiere o injerta especificidad para un antígeno en una célula inmunitaria efectora (por ejemplo, un linfocito T humano). Un receptor de antígeno quimérico típicamente comprende un dominio o resto de unión a ligando extracelular y un dominio intracelular que comprende uno o más dominios estimuladores que transducen las señales necesarias para la activación de los linfocitos T. En algunas realizaciones, el dominio o resto de unión a ligando extracelular puede estar en forma de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) que provienen de un anticuerpo monoclonal, que proporcionan especificidad para un epítipo o antígeno particular (por ejemplo, un epítipo o antígeno presente preferentemente en la superficie de una célula cancerosa u otra célula o partícula que causa la enfermedad). El dominio de unión al ligando extracelular puede ser específico para cualquier antígeno o epítipo de interés. En una realización particular, el dominio de unión a ligando es específico para CD19.

El dominio extracelular de un receptor de antígeno quimérico también puede comprender un autoantígeno (véase, Payne y col. (2016), *Science* 353 (6295): 179-184), que puede ser reconocido por los receptores de células B específicos de autoantígeno en linfocitos B, dirigiendo así a los linfocitos T al direccionamiento y la destrucción específica de los linfocitos B autorreactivos en enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos. Dichos CAR se pueden denominar receptores de autoanticuerpos quiméricos (CAAR), y su uso está comprendido en la invención.

Los scFv se pueden conectar a través de una secuencia de enlazador. El dominio de estimulación intracelular puede incluir uno o más dominios de señalización citoplasmáticos que transmiten una señal de activación a la célula efectora inmunitaria después de la unión al antígeno. Dichos dominios de señalización citoplasmática pueden incluir, sin limitación, CD3-zeta. El dominio estimulante intracelular también puede incluir uno o más dominios coestimuladores intracelulares que transmiten una señal proliferativa y/o de supervivencia celular después de la unión del ligando. Dichos dominios coestimuladores intracelulares pueden incluir, sin limitación, un dominio CD28, un dominio 4-1BB, un dominio OX40, o una combinación de los mismos. Un receptor de antígeno quimérico puede incluir además elementos estructurales adicionales, incluyendo un dominio transmembrana que está unido al dominio de unión al ligando extracelular a través de una bisagra o secuencia espaciadora.

Tal como se usa en el presente documento, un "receptor de linfocitos T exógeno" o "TCR exógeno" se refiere a un TCR cuya secuencia se introduce en el genoma de una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, un linfocito T humano) que puede o no expresar endógenamente el TCR. La expresión de un TCR exógeno en una célula efectora inmunitaria puede conferir especificidad para un epítipo o antígeno específico (por ejemplo, un epítipo o antígeno presente preferentemente en la superficie de una célula cancerosa u otra célula o partícula que causa enfermedades). Dichos receptores de linfocitos T exógenos pueden comprender cadenas alfa y beta o, como alternativa, pueden comprender cadenas gamma y delta. Los TCR exógenos útiles en la invención pueden tener especificidad para cualquier antígeno o epítipo de interés.

Tal como se usa en el presente documento, el término "expresión reducida" se refiere a cualquier reducción en la expresión del receptor de linfocitos T endógeno en la superficie celular de una célula genéticamente modificada en comparación con una célula de control. El término reducido también se puede referir a una reducción en el porcentaje de células en una población de células que expresan un polipéptido endógeno (es decir, un receptor endógeno de linfocitos T) en la superficie celular cuando se compara con una población de células de control. Tal reducción puede ser de hasta un 5 %, un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, o hasta un 100 %. En consecuencia, el término "reducido" abarca tanto una atenuación génica parcial y una atenuación génica completa del receptor endógeno de linfocitos T.

Tal como se usa en el presente documento con respecto tanto a las secuencias de aminoácidos como a las secuencias de ácidos nucleicos, las expresiones "porcentaje de identidad", "identidad de secuencia", "porcentaje de similitud", "similitud de secuencia" y similares se refieren a una medida del grado de similitud de dos secuencias basándose en una alineación de las secuencias que maximiza la similitud entre restos de aminoácidos alineados o nucleótidos, y que es una función del número de restos o de nucleótidos idénticos o similares, el número de restos o de nucleótidos totales, y la presencia y longitud de espacios en la alineación de la secuencia. Una variedad de algoritmos y programas informáticos están disponibles para determinar la similitud de secuencia utilizando parámetros estándar. Tal como se usa en el presente documento, la similitud de secuencia se mide usando el programa BLASTp para secuencias de aminoácidos y el programa BLASTn para secuencias de ácido nucleico, ambos están disponibles a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/), y se describen en, por ejemplo, Altschul y col. (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Gish y States (1993), *Nature Genet.* 3:266-272; Madden y col. (1996), *Meth.*

Enzymol.266:131-141; Altschul y col. (1997), Nucleic Acids Res. 25:33 89-3402); Zhang y col. (2000), J. Comput. Biol. 7(1-2):203-14. Tal como se usa en el presente documento, el porcentaje de similitud de dos secuencias de aminoácidos es la puntuación basada en los siguientes parámetros para el algoritmo BLASTp: tamaño de palabra=3; penalización por apertura de hueco=-11; penalización de extensión de hueco=-1; y matriz de puntuación=BLOSUM62.

5 Tal como se usa en el presente documento, el porcentaje de similitud de dos secuencias de ácido nucleico es la puntuación basada en los siguientes parámetros para el algoritmo BLASTn: tamaño de palabra=11; penalización por apertura de hueco=-5; penalización de extensión de hueco=-2; recompensa de coincidencia = 1; y penalización por falta de coincidencia=-3.

10 Tal como se usa en el presente documento con respecto a las modificaciones de dos proteínas o secuencias de aminoácidos, la expresión "que se corresponde con" se usa para indicar que una modificación especificada en la primera proteína es una sustitución del mismo resto de aminoácido que en la modificación en la segunda proteína, y que la posición del aminoácido de la modificación en las primeras proteínas corresponde o se alinea con la posición de aminoácidos de la modificación en la segunda proteína cuando las dos proteínas se someten a alineamientos de secuencia estándar (por ejemplo, usando el programa BLASTp). Por lo tanto, la modificación del resto "X" al aminoácido "A" en la primera proteína se corresponderá con la modificación del resto "Y" al aminoácido "A" en la segunda proteína si los restos X e Y se corresponden entre sí en una secuencia de alineación, y a pesar de que X e Y pueden ser números diferentes.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "semisito de reconocimiento", "semisito de secuencia de reconocimiento", o simplemente "semisito" significa una secuencia de ácido nucleico en una molécula de ADN bicatenario que es reconocida por un monómero de una meganucleasa homodimérica o heterodimérica, o por una subunidad de una meganucleasa de cadena sencilla.

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "región hipervariable" se refiere a una secuencia localizada dentro de un monómero o subunidad de meganucleasa que comprende aminoácidos con una variabilidad relativamente alta. Una región hipervariable puede comprender aproximadamente 50-60 restos contiguos, aproximadamente 53-57 restos contiguos, o preferentemente aproximadamente 56 restos. En algunas realizaciones, los restos de una región hipervariable se pueden corresponder a las posiciones 24-79 o 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-32. Una región hipervariable puede comprender uno o más restos que entran en contacto con bases de ADN en una secuencia de reconocimiento y se pueden modificar para alterar la preferencia de base del monómero o subunidad. Una región hipervariable también puede comprender uno o más restos que se unen a la cadena principal del ADN cuando la meganucleasa se asocia con una secuencia de reconocimiento de ADN bicatenario. Dichos restos se pueden modificar para que alteren la afinidad de unión de la meganucleasa por la cadena principal del ADN y la secuencia de reconocimiento de la diana. En diferentes realizaciones de la invención, una región hipervariable puede comprender entre 1-20 restos que presentan variabilidad y se pueden modificar para influir en la preferencia de base y/o la afinidad de unión al ADN. En realizaciones particulares, una región hipervariable comprende entre 25 30 aproximadamente 15-18 restos que presentan variabilidad y se pueden modificar para influir en la preferencia de base y/o la afinidad de unión al ADN. En algunas realizaciones, los restos variables dentro de una región hipervariable se corresponden con una o más de las posiciones 24, 26, 28, 29, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 66, 68, 70, 72, 73, 75 y 77 de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-32. En otras realizaciones, los restos variables dentro de una región hipervariable se corresponden con una o más de las posiciones 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 40 248, 257, 259, 261, 263, 264, 266 y 268 de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-32.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "gen de región constante alfa del receptor de linfocitos T" y "gen de región constante alfa del TCR" se usan indistintamente y se refieren al gen humano identificado por el gen con ID del NCBI NO. 28755 (SEQ ID NO:1).

45 Las expresiones "construcción de ADN recombinante", "construcción recombinante", "casete de expresión", "construcción de expresión", "construcción quimérica", "construcción", y "fragmento de ADN recombinante" se usan indistintamente en el presente documento y son polinucleótidos monocatenarios o bicatenarios. Una construcción recombinante comprende una combinación artificial de polinucleótidos monocatenarios o bicatenarios, entre ellos, sin limitación, secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por ejemplo, una construcción de ADN recombinante puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que 50 provienen de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes que provienen de la misma fuente y se disponen de manera diferente a la encontrada en la naturaleza. Tal construcción se puede usar por sí misma o se puede usar junto con un vector.

Tal como se usa en el presente documento, un "vector" o "vector de ADN recombinante" puede ser una construcción que incluye un sistema de replicación y secuencias que son capaces de transcripción y traducción de una secuencia 55 que codifica un polipéptido en una célula hospedadora dada. Si se usa un vector, entonces la elección del vector depende del procedimiento que se usará para transformar las células hospedadoras como es bien conocido por los expertos en la materia. Los vectores pueden incluir, sin limitación, vectores de plásmidos y vectores de AAV recombinantes, o cualquier otro vector conocido en esa técnica adecuada para administrar un gen que codifica una meganucleasa de la invención a una célula diana. El experto en la técnica conoce bien los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector para poder transformar con éxito, seleccionar y propagar células hospedadoras que comprenden cualquiera de los nucleótidos aislados o secuencias de ácido nucleico de la invención. 60

Tal como se usa en el presente documento, un "vector" también se puede referir a un vector vírico. Los vectores víricos pueden incluir, sin limitación, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, vectores adenovíricos y vectores de virus adenoasociados (AAV).

5 Tal como se usa en el presente documento, un ARNm "policistrónico" se refiere a un solo ARN mensajero que comprende dos o más secuencias codificantes (es decir, cistrones) y codifica más de una proteína. Un ARNm policistrónico puede comprender cualquier elemento conocido en la técnica que permita la traducción de dos o más genes de la misma molécula de ARNm, incluidos, pero sin limitación, un elemento IRES, un elemento T2A, un elemento P2A, un elemento E2A y un elemento F2A.

10 Tal como se usa en el presente documento, un "linfocito T humano" o "linfocito T" se refiere a un linfocito T aislado de un donante humano. Los linfocitos T humanos, y las células que provienen de los mismos, incluyen linfocitos T aislados que no se han pasado en cultivo, linfocitos T que han sido pasados y mantenidos en condiciones de cultivo celular sin inmortalización, y linfocitos T que han sido inmortalizados y se pueden mantener en condiciones de cultivo celular indefinidamente.

15 Tal como se usa en el presente documento, un "control" o "célula de control" se refiere a una célula que proporciona un punto de referencia para medir cambios en el genotipo o fenotipo de una célula genéticamente modificada. Una célula de control puede comprender, por ejemplo: (a) una célula de tipo silvestre, es decir, del mismo genotipo como material de partida para la alteración genética que dio como resultado la célula genéticamente modificada; (b) una célula del mismo genotipo que la célula modificada genéticamente pero que se ha transformado con una construcción nula (es decir, con una construcción que no tiene ningún efecto conocido sobre el rasgo de interés); o, (c) una célula genéticamente idéntica a la célula modificada genéticamente pero que no está expuesta a condiciones o estímulos o modificaciones genéticas adicionales que inducirían la expresión de un genotipo o fenotipo alterado.

20 Tal como se usa en el presente documento, la recitación de un intervalo numérico para una variable pretende transmitir que la invención se puede poner en práctica con la variable igual a cualquiera de los valores dentro de ese intervalo. Por lo tanto, para una variable que es inherentemente discreta, la variable puede ser igual a cualquier valor entero dentro del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. De manera similar, para una variable que es inherentemente continua, la variable puede ser igual a cualquier valor real dentro del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. Como ejemplo, y sin limitación, una variable que se describe que tiene valores entre 0 y 2 puede tomar los valores 0, 1 o 2 si la variable es inherentemente discreta, y puede tomar los valores 0,0, 0,1, 0,01, 0,001 o cualquier otro valor real ≥ 0 y ≤ 2 si la variable es inherentemente continua.

30 2.1 Principio de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las nucleasas diseñadas genéticamente se pueden utilizar para reconocer y escindir secuencias de reconocimiento encontradas dentro del gen de la región constante alfa del TCR humano (SEQ ID NO:1), de modo que NHEJ en el sitio de escisión altera la expresión de la subunidad de la cadena alfa del TCR y, en última instancia, la expresión del receptor de linfocitos T en la superficie celular. Además, de acuerdo con la invención, se inserta una secuencia de polinucleótidos exógena en el gen de la región constante alfa del TCR en el sitio de escisión de la nucleasa, por ejemplo por recombinación homóloga, de tal manera que una secuencia de interés se expresa de manera simultánea en la célula. Dichas secuencias exógenas codifican un receptor de antígeno quimérico.

40 Por lo tanto, la presente invención permite tanto la desactivación del receptor de linfocitos T endógenos como la expresión de un receptor de antígeno quimérico que se dirige a un único sitio de reconocimiento con una única nucleasa modificada. La invención proporciona un procedimiento simplificado para producir un linfocito T alogénico que expresa un CAR específico de antígeno y tiene una inactivación completa del TCR endógeno. Dichas células pueden presentar una inducción reducida o nula de la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) cuando se administra a un sujeto alogénico.

45 2.2 Nucleasas para reconocer y escindir secuencias de reconocimiento dentro del gen de región constante alfa del receptor de linfocitos T

50 Se sabe en la técnica que es posible usar una nucleasa específica del sitio para hacer una ruptura de ADN en el genoma de una célula viva, y que dicha ruptura de ADN puede dar como resultado una modificación permanente del genoma mediante la reparación de NHEJ mutagénico o mediante recombinación homóloga con una secuencia de ADN transgénico. NHEJ puede producir mutagénesis en el sitio de escisión, que da como resultado la inactivación del alelo. La mutagénesis asociada a NHEJ puede inactivar un alelo mediante la generación de codones de parada temprana, mutaciones de desplazamiento de marco que producen proteínas no funcionales anómalas, o podrían desencadenar mecanismos tales como la desintegración de ARNm mediada sin sentido. El uso de nucleasas para inducir mutagénesis a través de NHEJ se puede usar para que se dirija a una mutación específica o una secuencia presente en un alelo de tipo silvestre. Se sabe que el uso de nucleasas para inducir una ruptura de doble cadena en un locus diana estimula la recombinación homóloga, particularmente de secuencias de ADN transgénicas flanqueadas por secuencias que son homólogas a la diana genómica. De esta manera, las secuencias de ácido nucleico exógeno

se pueden insertar en un locus diana. Tales ácidos nucleicos exógenos pueden codificar, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico, un TCR exógeno, o cualquier secuencia o polipéptido de interés.

La invención se pone en práctica usando meganucleasas recombinantes.

5 En realizaciones preferidas, las nucleasas utilizadas para poner en práctica la invención son meganucleasas de cadena sencilla. Una meganucleasa de cadena sencilla comprende una subunidad N-terminal y una subunidad C-terminal unidas por un péptido enlazador. Cada uno de los dos dominios reconoce la mitad de la secuencia de reconocimiento (es decir, un semisitio de reconocimiento) y el sitio de escisión del ADN está en el medio de la secuencia de reconocimiento cerca de la interfaz de las dos subunidades. Las roturas de la cadena de ADN se compensan con cuatro pares de bases, de modo que la escisión del ADN por una meganucleasa genera un par de salientes de cadena sencilla de cuatro pares de bases en 3'.

10 Las meganucleasas recombinantes de la invención se han diseñado genéticamente para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (SEQ ID NO:3). Tales meganucleasas recombinantes se denominan colectivamente en el presente documento como "meganucleasas TRC 1-2". Se proporcionan ejemplos de meganucleasas TRC 1-2 en las SEQ ID NO:8-27.

15 También se desvelan meganucleasas recombinantes que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento TRC 3-4 (SEQ ID NO:4). Tales meganucleasas recombinantes se denominan colectivamente en el presente documento como "meganucleasas TRC 3-4". Se proporcionan ejemplos de meganucleasas TRC 3-4 en las SEQ ID NO:28 y 29.

20 También se desvelan meganucleasas recombinantes que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento TRC 7-8 (SEQ ID NO:5). Tales meganucleasas recombinantes se denominan colectivamente en el presente documento como "meganucleasas TRC 7-8". Se proporcionan ejemplos de meganucleasas TRC 7-8 en las SEQ ID NO:30-32.

25 Las meganucleasas recombinantes de la divulgación comprenden una primera subunidad, que comprende una primera región hipervariable (HVR1) y una segunda subunidad, que comprende una segunda región hipervariable (HVR2). Además, la primera subunidad se une a un primer semisitio de reconocimiento en la secuencia de reconocimiento (por ejemplo, el semisitio TRC1, TRC3 o TRC7), y la segunda subunidad se une a un segundo semisitio de reconocimiento en la secuencia de reconocimiento (por ejemplo, el semisitio TRC2, TRC4, o TRC8). En realizaciones en las que la meganucleasa recombinante es una meganucleasa de cadena sencilla, la primera y la segunda subunidades se pueden orientar de manera que la primera subunidad, que comprende la región HVR1 y se une al primer semisitio, se posiciona como la subunidad N-terminal, y la segunda subunidad, que comprende la región HVR2 y se une al segundo semisitio, se posiciona como la subunidad C-terminal. En realizaciones alternativas, la primera y la segunda subunidades se pueden orientar de manera que la primera subunidad, que comprende la región HVR1 y se une al primer semisitio, se posiciona como la subunidad C-terminal, y la segunda subunidad, que comprende la región HVR2 y se une al segundo semisitio, se posiciona como la subunidad N-terminal. Los ejemplos de meganucleasas TRC 1-2 de la invención se proporcionan en la Tabla 1. Se proporcionan ejemplos de meganucleasas TRC 3-4 en la Tabla 2. Se proporcionan ejemplos de meganucleasas TRC 7-8 en la Tabla 3.

35 **Tabla 1.** Meganucleasas recombinantes ejemplares diseñadas genéticamente para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (SEQ ID NO:3)

Meganucleasa	SEQ ID AA	Restos de subunidad TRC1	SEQ ID de subunidad TRC1	*% de subunidad TRC1	Restos de subunidad TRC2	SEQ ID de subunidad TRC2	*% de subunidad TRC2
TRC 1-2x.87 EE	8	198-344	33	100	7-153	58	100
TRC 1-2x.87 QE	9	198-344	34	100	7-153	59	99,3
TRC 1-2x.87 EQ	10	198-344	35	99,3	7-153	60	100
TRC 1-2x.87	11	198-344	36	99,3	7-153	61	99,3
TRC 1-2x.6	12	198-344	37	99,3	7-153	62	94,6
TRC 1-2x.20	13	198-344	38	99,3	7-153	63	91,2
TRC 1-2x.55	14	198-344	39	95,9	7-153	64	91,8
TRC 1-2x.60	15	198-344	40	91,8	7-153	65	91,2
TRC 1-2x.105	16	198-344	41	95,2	7-153	66	95,2
TRC 1-2x.163	17	198-344	42	99,3	7-153	67	99,3

(continuación)

Meganucleasa	SEQ ID AA	Restos de subunidad TRC1	SEQ ID de subunidad TRC1	*% de subunidad TRC1	Restos de subunidad TRC2	SEQ ID de subunidad TRC2	*% de subunidad TRC2
TRC 1-2x.113_3	18	198-344	43	99,3	7-153	68	91,2
TRC 1-2x.5	19	7-153	44	99,3	198-344	69	93,2
TRC 1-2x.8	20	7-153	45	92,5	198-344	70	92,5
TRC 1-2x.25	21	7-153	46	99,3	198-344	71	98,6
TRC 1-2x.72	22	7-153	47	99,3	198-344	72	92,5
TRC 1-2x.80	23	7-153	48	99,3	198-344	73	92,5
TRC 1-2x.84	24	7-153	49	95,2	198-344	74	98,6
TRC 1-2x.120	25	7-153	50	99,3	198-344	75	92,5
TRC 1-2x.113_1	26	7-153	51	100	198-344	76	92,5
TRC 1-2x.113_2	27	7-153	52	99,3	198-344	77	92,5

* "% de subunidad TRC1" y "% de subunidad TRC2" representan la identidad de secuencia de aminoácidos entre las regiones de subunidad de unión a TRC1 y unión a TRC2 de cada meganucleasa y las regiones de subunidad de unión a TRC1 y TRC2, respectivamente, de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE.

Tabla 2. Meganucleasas recombinantes ejemplares diseñadas genéticamente para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento TRC 3-4 (SEQ ID NO:4)

Meganucleasa	SEQ ID AA	Restos de subunidad TRC3	SEQ ID de subunidad TRC3	*% de subunidad TRC3	Restos de subunidad TRC4	SEQ ID de subunidad TRC4	% de subunidad TRC4
TRC 3-4x.3	28	7-153	53	100	198-344	78	100
TRC 3-4x.19	29	7-153	54	96,6	198-344	79	96,6

* "% de subunidad TRC3" y "% de subunidad TRC4" representan la identidad de secuencia de aminoácidos entre las regiones de subunidad de unión a TRC3 y de unión a TRC4 de cada meganucleasa y las regiones de subunidad de unión a TRC3 y de unión a TRC4, respectivamente, de la meganucleasa TRC 3-4x.3.

Tabla 3. Meganucleasas recombinantes ejemplares diseñadas genéticamente para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento TRC 7-8 (SEQ ID NO:5)

Meganucleasa	SEQ ID AA	Restos de subunidad TRC7	SEQ ID de subunidad TRC7	*% de subunidad TRC7	Restos de subunidad TRC8	SEQ ID de subunidad TRC8	% de subunidad TRC8
TRC 7-8x.7	30	7-153	55	100	198-344	80	100
TRC 7-8x.9	31	198-344	56	97,3	7-153	81	91,2
TRC 7-8x.14	32	198-344	57	97,9	7-153	82	90,5

* "% de subunidad TRC7" y "% de subunidad TRC8" representan la identidad de secuencia de aminoácidos entre las regiones de subunidad de unión a TRC7 y de unión a TRC8 de cada meganucleasa y las regiones de subunidad de unión a TRC7 y de unión a TRC8, respectivamente, de la meganucleasa TRC 7-8x.7.

2.3 Procedimientos para producir células genéticamente modificadas

La invención proporciona procedimientos para producir células genéticamente modificadas usando nucleasas modificadas genéticamente que reconocen y escinden las secuencias de reconocimiento que se encuentran dentro del gen de la región constante alfa TCR humana (SEQ ID NO:1). La escisión en tales secuencias de reconocimiento puede permitir NHEJ en el sitio de escisión y la expresión alterada de la subunidad de la cadena alfa del receptor de

5

10

linfocitos T humanos, lo que lleva a una expresión y/o función reducida del receptor de linfocitos T en la superficie celular. Además, la escisión en tales secuencias de reconocimiento puede permitir además la recombinación homóloga de secuencias de ácido nucleico exógenas directamente en el gen de la región constante alfa de TCR.

5 Las meganucleasas recombinantes de la invención se pueden administrar a una célula en forma de proteína o, preferentemente, como un ácido nucleico que codifica la meganucleasa recombinante. Dicho ácido nucleico puede ser ADN (por ejemplo, ADN plasmídico circular o linealizado o productos de PCR) o ARN. Para realizaciones en las que la secuencia codificante de meganucleasa recombinante se administra en forma de ADN, debería estar operativamente unido a un promotor para facilitar la transcripción del gen de la meganucleasa. Los promotores de mamíferos adecuados para la invención incluyen promotores constitutivos tales como el promotor temprano de citomegalovirus (CMV) (Thomsen y col. (1984), Proc Natl Acad Sci EE.UU. 81 (3): 659-63) o el promotor temprano de SV40 (Benoist y Chambon (1981), Nature. 290 (5804): 304-10) así como promotores inducibles tales como el promotor inducible por tetraciclina (Dingermann y col. (1992), Mol Cell Biol. 12(9):4038-45).

15 En algunas realizaciones, el ARNm que codifica la meganucleasa recombinante se administra a la célula porque esto reduce la probabilidad de que el gen que codifica la meganucleasa recombinante se integre en el genoma de la célula. Tal ARNm que codifica una meganucleasa recombinante se puede producir usando procedimientos conocidos en la técnica tales como transcripción *in vitro*. En algunas realizaciones, el ARNm se tapa usando 7-metil-guanosina. En algunas realizaciones, el ARNm puede estar poliadenilado.

20 En realizaciones particulares, un ARNm que codifica una meganucleasa recombinante de la invención puede ser un ARNm policistrónico que codifica dos o más nucleasas que se expresan simultáneamente en la célula. Un ARNm policistrónico puede codificar dos o más nucleasas de la invención que se dirigen a diferentes secuencias de reconocimiento en el mismo gen diana. Como alternativa, un ARNm policistrónico puede codificar al menos una nucleasa descrita en el presente documento y al menos una nucleasa adicional que se dirige a una secuencia de reconocimiento separada posicionada en el mismo gen, o que se dirige a una segunda secuencia de reconocimiento posicionada en un segundo gen de modo que se produzcan sitios de escisión en ambos genes. Un ARNm policistrónico puede comprender cualquier elemento conocido en la técnica que permita la traducción de dos o más genes (es decir, cistrones) de la misma molécula de ARNm, incluidos, pero sin limitación, un elemento IRES, un elemento T2A, un elemento P2A, un elemento E2A y un elemento F2A.

30 Las proteínas nucleasas purificadas se pueden administrar a las células para escindir el ADN genómico, lo que permite la recombinación homóloga o la unión de extremos no homólogos en el sitio de escisión con una secuencia de interés, mediante una variedad de mecanismos diferentes conocidos en la técnica.

35 En algunas realizaciones, las proteínas meganucleasas recombinantes, o ADN/ARNm que codifica las meganucleasas recombinantes, se acoplan a un péptido penetrante celular o un ligando de direccionamiento para facilitar la captación celular. Los ejemplos de péptidos penetrantes de células conocidos en la técnica incluyen poliarginina (Jearawiriyapaisarn, y col. (2008) Mol Ther. 16:1624-9), péptido TAT del virus VIH (Hudecz y col. (2005), Med. Res. Rev. 25: 679-736), MPG (Simeoni, y col. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2717-2724), Pep-1 (Deshayes y col. (2004) Biochemistry 43: 7698-7706, y HSV-1 VP-22 (Deshayes y col. (2005) Cell Mol Life Sci. 62:1839-49. En una realización alternativa, meganucleasas recombinantes, o ADN/ARNm que codifica meganucleasas recombinantes, se acoplan de forma covalente o no covalente a un anticuerpo que reconoce un receptor específico de la superficie celular expresado en las células diana de manera que la proteína nucleasa/ADN/ARNm se une a las células diana y e internaliza. Como alternativa, la proteína/ADN/ARNm de meganucleasa recombinante se puede acoplar covalentemente o no covalentemente al ligando natural (o una porción del ligando natural) para dicho receptor de superficie celular. (McCall, y col. (2014) Tissue Barriers. 2(4):e944449; Dinda, y col. (2013) Curr Pharm Biotechnol. 14:1264-74; Kang, y col. (2014) Curr Pharm Biotechnol. 15(3):220-30; Qian y col. (2014) Expert Opin Drug Metab Toxicol. 10(11):1491-508).

45 En algunas realizaciones, las proteínas meganucleasas recombinantes, o ADN/ARNm que codifica las meganucleasas recombinantes, están acoplados covalentemente o, preferentemente, no covalentemente a una nanopartícula o encapsulado dentro de dicha nanopartícula utilizando procedimientos conocidos en la técnica (Sharma y col. (2014) Biomed Res Int. 2014). Una nanopartícula es un sistema de suministro a nanoescala cuya escala de longitud es <1 µm, preferentemente <100 nm. Dichas nanopartículas se pueden diseñar utilizando un núcleo compuesto de metal, lípido, polímero, o macromolécula biológica, y se pueden unir o encapsular múltiples copias de las proteínas, ARNm o ADN de la meganucleasa recombinante con el núcleo de nanopartículas. Esto aumenta el número de copias de la proteína/ARNm/ADN que se administra a cada célula y, por lo tanto, aumenta la expresión intracelular de cada meganucleasa recombinante para maximizar la probabilidad de que se corten las secuencias de reconocimiento diana. La superficie de tales nanopartículas se puede modificar adicionalmente con polímeros o lípidos (por ejemplo, quitosán, polímeros catiónicos, o lípidos catiónicos) para formar una nanopartícula de núcleo cubierto cuya superficie confiere funcionalidades adicionales para mejorar el suministro celular y la absorción de la carga útil (Jian y col. (2012) Biomaterials. 33 (30): 7621-30). Las nanopartículas se pueden acoplar adicionalmente y de manera ventajosa a moléculas de direccionamiento para dirigir la nanopartícula al tipo de célula apropiado y/o aumentar la probabilidad de absorción celular. Los ejemplos de tales moléculas de direccionamiento incluyen anticuerpos específicos para los receptores de la superficie celular y los ligandos naturales (o porciones de los ligandos naturales) para los receptores de la superficie celular.

- 5 En algunas realizaciones, las meganucleasas recombinantes o el ADN/ARNm que codifica las meganucleasas recombinantes, están encapsulados dentro de los liposomas o forman complejos con lípidos catiónicos (véase, por ejemplo, Lipofectamine™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA; Zuris y col. (2015) *Nat Biotechnol.* 33: 73-80; Mishra y col. (2011) *J Drug Deliv.* 2011:863734). Las formulaciones de liposomas y lipoplex pueden proteger la carga útil de la degradación y facilitar la absorción celular y la eficiencia de la administración a través de la fusión y/o la alteración de las membranas celulares de las células.
- 10 En algunas realizaciones, las proteínas meganucleasas recombinantes, o ADN/ARNm que codifica las meganucleasas recombinantes, se encapsulan dentro de armazones poliméricos (por ejemplo, PLGA) o forman complejos usando polímeros catiónicos (por ejemplo, PEI, PLL) (Tamboli y col. (2011) *Ther Deliv.* 2 (4): 523-536).
- 15 En algunas realizaciones, las proteínas meganucleasas recombinantes, o ADN/ARNm que codifica las meganucleasas recombinantes, se combinan con moléculas anfífilas que se autoensamblan en micelas (Tong y col. (2007) *J Gene Med.* 9 (11): 956-66). Las micelas poliméricas pueden incluir una cubierta micelar formada con un polímero hidrofílico (por ejemplo, polietilenglicol) que puede prevenir la agregación, enmascarar las interacciones de carga y reducir las interacciones inespecíficas fuera de la célula.
- 20 En algunas realizaciones, las proteínas meganucleasas recombinantes, o ADN/ARNm que codifica las meganucleasas recombinantes, se formulan en una emulsión o una nanoemulsión (es decir, que tiene un diámetro de partícula promedio de <1 nm) para la administración a la célula. El término "emulsión" se refiere a, sin limitación, cualquier dispersión o gotitas de aceite en agua, agua en aceite, agua en aceite en agua o aceite en agua en aceite, incluidas las estructuras lipídicas que se pueden formar como resultado de fuerzas hidrófobas que llevan los restos apolares (por ejemplo, largas cadenas de hidrocarburos) lejos del agua y los grupos de cabeza polar hacia el agua, cuando una fase inmiscible en agua se mezcla con una fase acuosa. Estas otras estructuras lipídicas incluyen, pero sin limitación, vesículas lipídicas unilamelares, paucilamelares y multilamelares, micelas y fases lamelares. Las emulsiones se componen de una fase acuosa y una fase lipofílica (que normalmente contiene un aceite y un disolvente orgánico). Las emulsiones también contienen frecuentemente uno o más tensioactivos. Las formulaciones de nanoemulsión son bien conocidas, por ejemplo, tal como se describe en las solicitudes de patente de EE.UU. N.º 2002/0045667 y 2004/0043041, y la patente de EE.UU. N.º 6.015.832, 6.506.803, 6.635.676 y 6.559.189.
- 25 En algunas realizaciones, las proteínas meganucleasas recombinantes, o ADN/ARNm que codifica las meganucleasas recombinantes, están unidos covalentemente o asociados no covalentemente a, conjugados poliméricos multifuncionales, dendrímeros de ADN y dendrímeros poliméricos (Mastorakos y col. (2015) *Nanoscale.* 7 (9): 3845-56; Cheng y col. (2008) *J Pharm Sci.* 97(1): 123-43). La generación de dendrímeros puede controlar la capacidad y el tamaño de la carga útil, y puede proporcionar una alta capacidad de carga útil. Además, la presentación de múltiples grupos de superficie se puede aprovechar para mejorar la estabilidad y reducir las interacciones inespecíficas.
- 30 En algunas realizaciones, los genes que codifican una meganucleasa recombinante se introducen en una célula utilizando un vector vírico. Tales vectores son conocidos en la técnica e incluyen vectores lentivíricos, vectores adenovíricos y vectores de virus adenoasociados (AAV) (revisados en Vannucci, y col. (2013) *New Microbiol.* 36:1-22). Los vectores de AAV recombinantes útiles en la invención pueden tener cualquier serotipo que permita la transducción del virus en la célula y la inserción del gen de la nucleasa en el genoma celular. En realizaciones particulares, los vectores de AAV recombinantes tienen un serotipo de AAV2 o AAV6. Los vectores de AAV recombinantes también pueden ser autocomplementarios de modo que no requieren síntesis de ADN de segunda cadena en la célula hospedadora (McCarty, y col. (2001) *Gene Ther.* 8:1248-54).
- 35 Si los genes de la meganucleasa recombinante se administran en forma de ADN (por ejemplo, plásmido) y/o a través de un vector vírico (por ejemplo, AAV) deben estar operativamente enlazados a un promotor. En algunas realizaciones, este puede ser un promotor vírico tal como promotores endógenos del vector vírico (por ejemplo, el LTR de un vector lentivírico) o los promotores tempranos conocidos de citomegalovirus o virus SV40. En una realización preferida, los genes de nucleasa están operativamente unidos a un promotor que dirige la expresión génica preferentemente en la célula diana (por ejemplo, un linfocito T humano).
- 40 La invención proporciona además la introducción de un ácido nucleico exógeno en la célula, de tal manera que la secuencia de ácido nucleico exógeno se inserta en el gen de la región constante de TRC alfa en un sitio de escisión de nucleasa. En algunas realizaciones, el ácido nucleico exógeno comprende un brazo de homología en 5' y un brazo de homología en 3' para promover la recombinación de la secuencia de ácido nucleico en el genoma celular en el sitio de escisión de la nucleasa.
- 45 Los ácidos nucleicos exógenos de la invención se pueden introducir en la célula por cualquiera de los medios tratados anteriormente. En una realización particular, los ácidos nucleicos exógenos se introducen por medio de un vector vírico, tal como un lentivirus, retrovirus, adenovirus, o preferentemente un vector de AAV recombinante. Los vectores de AAV recombinantes útiles para introducir un ácido nucleico exógeno pueden tener cualquier serotipo que permita la transducción del virus en la célula y la inserción de la secuencia de ácido nucleico exógeno en el genoma celular. En realizaciones particulares, los vectores de AAV recombinantes tienen un serotipo de AAV2 o AAV6. Los vectores de AAV recombinantes también pueden ser autocomplementarios, de modo que no requieran la síntesis de ADN de segunda cadena en la célula hospedadora.
- 50
- 55

En otra realización particular, se puede introducir un ácido nucleico exógeno en la célula usando un molde de ADN monocatenario. El ADN monocatenario puede comprender el ácido nucleico exógeno y, en realizaciones preferidas, puede comprender brazos de homología en 5' y 3' para promover la inserción de la secuencia de ácido nucleico en el sitio de escisión de nucleasa por recombinación homóloga. El ADN monocatenario puede comprender además una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de 5' de AAV en la secuencia 5' aguas arriba del brazo de homología de 5', y una secuencia ITR de 3' de AAV en la secuencia 3' aguas abajo del brazo de homología de 3'.

En otra realización particular, los genes que codifican una endonucleasa de la invención y/o una secuencia exógena de ácido nucleico de la invención se pueden introducir en la célula mediante transfección con un molde de ADN linealizado. En algunos ejemplos, un ADN plasmídico que codifica una endonucleasa y/o una secuencia de ácido nucleico exógeno puede ser digerido por una o más enzimas de restricción de modo que el ADN plasmídico circular se linealice antes de la transfección en la célula.

Cuando se administra a una célula, un ácido nucleico exógeno de la invención se puede unir operativamente a cualquier promotor adecuado para la expresión del polipéptido codificado en la célula, incluyendo aquellos promotores de mamíferos y promotores inducibles tratados anteriormente. Un ácido nucleico exógeno de la invención también se puede unir operativamente a un promotor sintético. Los promotores sintéticos pueden incluir, sin limitación, el promotor JeT (WO 2002/012514).

Los linfocitos T humanos pueden requerir activación antes de la introducción de una meganucleasa y/o una secuencia de ácido nucleico exógeno. Por ejemplo, los linfocitos T se pueden poner en contacto con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 que son solubles o conjugados con un soporte (es decir, perlas) durante un período de tiempo suficiente para activar las células.

Las células genéticamente modificadas de la invención se pueden modificar adicionalmente para expresar uno o más genes suicidas inducibles, cuya inducción provoca la muerte celular y permite la destrucción selectiva de las células *in vitro* o *in vivo*. En algunos ejemplos, un gen suicida puede codificar un polipéptido citotóxico, un polipéptido que tiene la capacidad de convertir un profármaco no tóxico en un fármaco citotóxico, y/o un polipéptido que activa una vía de genes citotóxicos dentro de la célula. Es decir, un gen suicida es un ácido nucleico que codifica un producto que causa la muerte celular por sí mismo o en presencia de otros compuestos. Un ejemplo representativo de dicho gen suicida es uno que codifica la timidina quinasa del virus del herpes simple. Ejemplos adicionales son genes que codifican la timidina quinasa del virus varicela zóster y el gen bacteriano de la citosina desaminasa que puede convertir la 5-fluorocitosina en el compuesto altamente tóxico 5-fluorouracilo. Los genes suicidas también incluyen como ejemplos no limitantes genes que codifican caspasa-9, caspasa-8 o citosina desaminasa. En algunos ejemplos, la caspasa-9 se puede activar utilizando un inductor químico específico de dimerización (CID, por sus siglas en inglés). Un gen suicida también puede codificar un polipéptido que se expresa en la superficie de la célula que las hace sensibles a los anticuerpos monoclonales terapéuticos y/o citotóxicos. En ejemplos adicionales, un gen suicida puede codificar un polipéptido antigénico recombinante que comprende un motivo antigénico reconocido por el mAb anti-CD20 Rituximab y un epítipo que permite la selección de células que expresan el gen suicida. Véase, por ejemplo, el polipéptido RQR8 descrito en el documento WO2013153391, que comprende dos epítipos de unión a Rituximab y un epítipo de unión a QBEnd10. Para tal gen, se puede administrar Rituximab a un sujeto para inducir el agotamiento celular cuando sea necesario.

2.4 Composiciones farmacéuticas

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula genéticamente modificada de la invención, o una población de células genéticamente modificadas de la invención, y un vehículo farmacéutico. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden preparar de acuerdo con técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Remington, *The Science And Practice of Pharmacy* (21^a ed. 2005). En la fabricación de una formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, las células se mezclan típicamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y la composición resultante se administra a un sujeto. El vehículo debe, por supuesto, ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente en la formulación y no debe ser perjudicial para el sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además uno o más agentes adicionales útiles en el tratamiento de una enfermedad en el sujeto. En realizaciones adicionales, cuando la célula genéticamente modificada es un linfocito T humano genéticamente modificado (o una célula que se obtiene del mismo), las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir además moléculas biológicas, tales como las citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21), que promueven la proliferación celular y el injerto *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas que comprenden células genéticamente modificadas de la invención se pueden administrar en la misma composición que un agente adicional o molécula biológica o, como alternativa, se pueden coadministrar en composiciones separadas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles para tratar cualquier estado de enfermedad que pueda ser dirigido por inmunoterapia adoptiva de linfocitos T. En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en el tratamiento del cáncer. Dichos cánceres pueden incluir, sin limitación, carcinoma, linfoma, sarcoma, blastomas, leucemia, cánceres de origen de células B, cáncer de mama, cáncer gástrico, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, sarcoma de rabdomio, leucemia y linfoma de Hodgkin. En determinadas

realizaciones, los cánceres de origen de células B incluyen, sin limitación, leucemia linfoblástica aguda de linaje B, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B y linfoma no Hodgkin de linfocitos B.

2.5 Procedimientos para producir vectores de AAV recombinantes

También se desvelan vectores de AAV recombinantes para su uso en los procedimientos de la invención. Los vectores de AAV recombinantes se producen típicamente en líneas celulares de mamíferos tales como HEK-293. Dado que los genes víricos *cap* y *rep* se eliminan del vector para evitar que su autorreplicación deje espacio para que se administren los genes terapéuticos (por ejemplo, el gen de endonucleasa), es necesario proporcionar estos *en trans* en la línea celular de empaquetamiento. Además, es necesario proporcionar los componentes "auxiliares" (por ejemplo, adenovíricos) necesarios para soportar la replicación (Cots D, Bosch A, Chillon M (2013) *Curr. Gene Ther.* 13 (5): 370-81). Con frecuencia, los vectores de AAV recombinantes se producen usando una triple transfección en la que se transfecta una línea celular con un primer plásmido que codifica los componentes "auxiliares", un segundo plásmido que comprende los genes *cap* y *rep*, y un tercer plásmido que comprende las ITR víricas que contienen la secuencia de ADN que interviene para ser empaquetada en el virus. Las partículas víricas que comprenden un genoma (ITR y genes interviniendo de interés) encerrado en una cápside se aíslan de las células mediante ciclos de congelación-descongelación, ultrasonidos, detergente u otros medios conocidos en la técnica. Después, las partículas se purifican usando centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio o cromatografía de afinidad y posteriormente se administran al gen o a los genes de interés para las células, tejidos o un organismo tal como un paciente humano.

Debido a que las partículas de AAV recombinantes generalmente se producen (fabrican) en las células, se deben tomar precauciones al poner en práctica la presente invención para garantizar que la endonucleasa específica del sitio NO se exprese en las células de empaquetamiento. Debido a que los genomas víricos de la invención comprenden una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa, cualquier endonucleasa expresada en la línea celular de empaquetamiento será capaz de escindir el genoma vírico antes de que se pueda empaquetar en partículas víricas. Esto dará como resultado una eficacia de empaquetamiento reducida y/o el empaquetamiento de genomas fragmentados. Se pueden usar varios enfoques para prevenir la expresión de endonucleasa en las células de empaquetamiento, que incluyen:

1. La endonucleasa se puede colocar bajo el control de un promotor específico de tejido que no está activo en las células de empaquetamiento. Por ejemplo, si se desarrolla un vector vírico para la administración de (un) gen (o genes) de endonucleasa al tejido muscular, se puede utilizar un promotor específico del músculo. Los ejemplos de promotores específicos del músculo incluyen C5-12 (Liu, y col. (2004) *Hum Gene Ther.* 15:783-92), el promotor de creatina quinasa (MCK) específico de músculo (Yuasa, y col. (2002) *Gene Ther.* 9:1576-88), o el promotor del músculo liso 22 (SM22) (Haase, y col. (2013) *BMC Biotechnol.* 13:49-54). Los ejemplos de promotores específicos del SNC (de neuronas) incluyen los promotores NSE, Sinapsina y MeCP2 (Lentz, y col. (2012) *Neurobiol Dis.* 48:179-88). Los ejemplos de promotores específicos del hígado incluyen promotores de albúmina (tales como Palb), α 1-antitripsina humana (tales como Pa1AT) y hemopexina (tales como Phpx) (Kramer, MG y col., (2003) *Mol. Therapy* 7:375-85). Los ejemplos de promotores específicos para el ojo incluyen opsinina y promotores K12 específicos para el epitelio corneal (Martin KRG, Klein RL y Quigley HA (2002) *Methods* (28): 267-75) (Tong Y, y col., (2007) *J Gene Med*, 9:956-66). Estos promotores u otros promotores específicos de tejido conocidos en la técnica, no son altamente activos en las células HEK-293 y, por lo tanto, no se espera que produzca niveles significativos de expresión del gen de endonucleasa en células de empaquetamiento cuando se incorporan a los vectores víricos de la presente invención. De manera similar, los vectores víricos de la presente invención contemplan el uso de otras líneas celulares con el uso de promotores específicos de tejido incompatibles (es decir, la conocida línea celular HeLa (célula epitelial humana) y que utiliza el promotor de hemopexina específico del hígado). Otros ejemplos de promotores específicos de tejido incluyen: sarcomas sinoviales PDZD4 (cerebelo), C6 (hígado), ASB5 (músculo), PPP1R12B (corazón), SLC5A12 (riñón), regulación del colesterol APOM (hígado), ADPRHL1 (corazón) y síndromes de malformación monogénica TP73L (músculo). (Jacox E, y col., (2010) *PLoS One* v.5 (8): e12274).

2. Como alternativa, el vector se puede empaquetar en células de una especie diferente en la que no es probable que se exprese la endonucleasa. Por ejemplo, las partículas víricas se pueden producir en células microbianas, de insectos o plantas que usan promotores de mamíferos, tales como los promotores tempranos conocidos de citomegalovirus o virus SV40, que no son activos en las células de empaquetamiento no de mamíferos. En una realización preferida, las partículas víricas se producen en células de insectos utilizando el sistema de baculovirus tal como se describe por Gao y col. (Gao, H., y col. (2007) *J. Biotechnol.* 131(2):138-43). Es poco probable que una endonucleasa bajo el control de un promotor de mamíferos se exprese en estas células (Airenne, KJ, y col. (2013) *Mol. Ther.* 21(4):739-49). Además, las células de insecto utilizan diferentes motivos de empalme de ARNm que las células de mamífero. Por lo tanto, es posible incorporar un intrón de mamífero, tal como el intrón de la hormona del crecimiento humano (HGH) o el intrón del antígeno T grande del SV40, en la secuencia codificante de una endonucleasa. Debido a que estos intrones no se empalman eficientemente a partir de transcripciones pre-ARNm en células de insectos, las células de insecto no expresarán una endonucleasa funcional y empaquetarán el genoma de longitud completa. Por el contrario, las células de mamífero a las que se administran las partículas de AAV recombinantes resultantes empalmarán adecuadamente el pre-ARNm y expresarán la proteína endonucleasa funcional. Haifeng Chen ha informado sobre el uso de los intrones de antígeno T grande de HGH y SV40 para atenuar la expresión de las proteínas tóxicas barnasa y el fragmento A de la toxina de la difteria en las células de empaquetamiento de insectos, permitiendo la producción de vectores de AAV recombinantes que

transportan estos genes de toxina (Chen, H (2012) Mol Ther Nucleic Acids. 1 (11): e57).

3. El gen de la endonucleasa se puede unir operativamente a un promotor inducible de modo que se requiera un inductor de molécula pequeña para la expresión de la endonucleasa. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen el sistema Tet-On (Clontech; Chen H., y col., (2015) BMC Biotechnol. 15(1):4) y el sistema RheoSwitch (Intrexon; Sowa G., y col., (2011) Spine, 36 (10): E623-8). Ambos sistemas, así como otros sistemas similares conocidos en la técnica, se basan en factores de transcripción inducibles por ligando (variantes del represor Tet y Ecdisona, respectivamente) que activan la transcripción en respuesta a un activador de molécula pequeña (Doxiciclina o Ecdisona, respectivamente). La práctica de la presente invención usando tales activadores de transcripción inducibles por ligando incluye: 1) colocar el gen de la endonucleasa bajo el control de un promotor que responde al factor de transcripción correspondiente, el gen de endonucleasa tiene (un) sitio (o sitios) de unión para el factor de transcripción; y 2) incluir el gen que codifica el factor de transcripción en el genoma vírico empaquetado. El último paso es necesario porque la endonucleasa no se expresará en las células o tejidos diana después del suministro de AAV recombinante si el activador de la transcripción no se proporciona también a las mismas células. El activador de la transcripción induce la expresión del gen de la endonucleasa solo en células o tejidos que se tratan con el activador de molécula pequeña afín. Este enfoque es ventajoso porque permite que la expresión del gen de la endonucleasa se regule de manera espacio-temporal seleccionando cuándo y a qué tejidos se administra el inductor de molécula pequeña. Sin embargo, el requisito de incluir el inductor en el genoma vírico, que tiene una capacidad de carga significativamente limitada, crea un inconveniente para este enfoque.

4. En otra realización preferida, las partículas de AAV recombinantes se producen en una línea celular de mamífero que expresa un represor de la transcripción que impide la expresión de la endonucleasa. Los represores de la transcripción son conocidos en la técnica e incluyen el represor Tet, el represor Lac, el represor Cro y el represor Lambda. Muchos receptores de hormonas nucleares, tales como el receptor de ecdisona, también actúan como represores de la transcripción en ausencia de su ligando de hormonas afines. Para poner en práctica la invención actual, las células de empaquetamiento se transfectan/transducen con un vector que codifica un represor de la transcripción y el gen de la endonucleasa en el genoma vírico (vector de empaquetamiento) está operativamente unido a un promotor que se modifica para que comprenda sitios de unión para el represor de manera que el represor silencia al promotor. El gen que codifica el represor de la transcripción se puede colocar en una variedad de posiciones. Se puede codificar en un vector separado; se puede incorporar al vector de empaquetado fuera de las secuencias ITR; se puede incorporar al vector cap/rep o al vector auxiliar adenovírico; o, lo más preferentemente, se puede integrar de manera estable en el genoma de la célula de empaquetamiento de manera que se exprese constitutivamente. Los procedimientos para modificar promotores comunes de mamíferos para incorporar sitios represores de la transcripción son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Chang y Roninson modificaron los promotores constitutivos fuertes de CMV y RSV comprenden operadores para el represor Lac y mostraron que la expresión génica de los promotores modificados estaba muy atenuada en las células que expresan el represor (Chang BD y Roninson IB (1996) Gene 183:137-42). El uso de un represor de la transcripción no humano asegura que la transcripción del gen de la endonucleasa se reprimirá solo en las células de empaquetamiento que expresan el represor y no en las células o tejidos diana transducidos con el vector de AAV recombinante resultante.

2.6 Variantes de nucleasa diseñadas genéticamente

Se desvelan nucleasas diseñadas genéticamente, y particularmente las meganucleasas recombinantes, y sus variantes. Además se desvelan polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica las meganucleasas recombinantes descritas en el presente documento, y variantes de tales polinucleótidos.

Tal como se usa en el presente documento, "variantes" pretende significar secuencias sustancialmente similares. Se pretende que una "variante" de polipéptido signifique un polipéptido que proviene del polipéptido "natural" mediante delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos en la proteína natural y/o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en el polipéptido natural. Tal como se usa en el presente documento, un polinucleótido o polipéptido "natural" comprende una secuencia original a partir de la cual se obtienen las variantes. Las variantes de los polipéptidos abarcadas por las realizaciones son biológicamente activas. Es decir, continúan poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína natural; es decir, la capacidad de reconocer y escindir secuencias de reconocimiento que se encuentran en la región constante alfa del receptor de linfocitos T humanos (SEQ ID NO:1), que incluyen, por ejemplo, la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (SEQ ID NO:3), la secuencia de reconocimiento TRC 3-4 (SEQ ID NO:4) y la secuencia de reconocimiento TRC 7-8 (SEQ ID NO:5). Dichas variantes pueden, por ejemplo, ser resultado de la manipulación humana. Las variantes biológicamente activas de un polipéptido natural (por ejemplo, las SEQ ID NO:8-32), o las variantes biológicamente activas de las subunidades de unión del semisitio de reconocimiento descritas en el presente documento (por ejemplo, la SEQ ID NO:33-82), tendrán al menos aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 % o aproximadamente el 99 %, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del polipéptido natural o de la subunidad natural, según lo determinado por los programas de alineación de secuencia y los parámetros descritos en otra parte del presente documento. Una variante biológicamente activa de un polipéptido o subunidad puede diferir de ese polipéptido o

subunidad en tan solo unos 1-40 restos de aminoácidos, tan poco como alrededor de 1-20, tan poco como alrededor de 1-10, tan poco como alrededor de 5, tan poco como 4, 3, 2 o incluso 1 resto de aminoácido.

Los polipéptidos se pueden alterar de varias maneras, incluidas las sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los procedimientos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica.

5 Por ejemplo, las variantes de la secuencia de aminoácidos se pueden preparar mediante mutaciones en el ADN. Los procedimientos para mutagénesis y alteraciones de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:488-492; Kunkel y col. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; la patente de EE.UU. N.º 4.873.192; Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York) y las referencias allí citadas. Se pueden encontrar directrices sobre las sustituciones
10 de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff y col. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Las sustituciones conservativas, tales como intercambiar un aminoácido con otro que tenga propiedades similares, pueden ser óptimas.

Se ha identificado previamente un número sustancial de modificaciones de aminoácidos en el dominio de reconocimiento de ADN de la meganucleasa I-Crel de tipo silvestre (por ejemplo, el documento US 8.021.867) que,
15 individualmente o en combinación, da como resultado meganucleasas recombinantes con especificidades alteradas en bases individuales dentro del semisitio de la secuencia de reconocimiento de ADN, de tal modo que las meganucleasas resultantes diseñadas racionalmente tienen especificidades de semisitio diferentes de la enzima de tipo silvestre. La Tabla 4 proporciona posibles sustituciones que se pueden realizar en un monómero o subunidad de meganucleasa recombinante para mejorar la especificidad basada en la base presente en cada posición del semisitio
20 (-1 a -9) de un semisitio de reconocimiento.

Tabla 4.

Pos.	Base de cadena sentido favorecida										
	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
-1	Y75 L75* C75* Y139* C46* A46*	R70* H75* R75* H46* K46* R46*	K70 E70* E75* E46* D46*	Q70* C70 L70 Y75* Q75* H75* H139 Q46* H46*				T46*			G70 A70 S70 G46*
-2	Q70 T44* A44* V44* 144* L44* N44*	E70 D70 K44* R44*	H70 D44* E44*	Q44*	C44*						
-3	Q68 C24* I24*	E68 F68 K24* R24*	R68	M68 C68 L68 F68		H68		Y68	K68		
-4	A26* Q77	E77 K26*	R77 E26*					S77 Q26*			S26*
-5		E42	R42			K28*	C28* Q42				M66 K66

(continuación)

Pos.	Base de cadena sentido favorecida										
	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
-6	Q40 C28*	E40 R28*	R40	C40 I40 V40 C79 I79 V79 Q28*	A40 A79 A28* H28*						S40 S28*
-7	N30* Q38	E38 K30* R30*	K38 R38 E30*	I38 L38			C38				H38 N38 Q30*
-8	F33 Y33	E33 D33	F33 H33	L33 V33 I33 F33 C33		R32*	R33				
-9		E32	R32	L32				D32			S32
			K32	V32 A32 C32				I32			N32 H32 Q32 T32

- Para los polinucleótidos, una "variante" comprende una deleción y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios dentro del polinucleótido natural. Un experto en la materia reconocerá que las variantes de los ácidos nucleicos desveladas en el presente documento se construirán de manera que se mantenga el marco de lectura abierto. Para los polinucleótidos, las variantes conservativas incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos descritos en el presente documento. Las variantes de polinucleótidos incluyen polinucleótidos que se obtienen sintéticamente, tales como los generados, por ejemplo, usando mutagénesis de sitio dirigido pero que todavía codifican una meganucleasa recombinante desvelada en el presente documento. En general, las variantes de un polinucleótido particular desvelado en el presente documento tendrán al menos aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más de identidad de secuencia para ese polinucleótido particular según lo determinado por los programas de alineación de secuencia y los parámetros descritos en otra parte del presente documento. Las variantes de un polinucleótido particular (es decir, el polinucleótido de referencia) también se pueden evaluar mediante la comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por una variante de polinucleótido y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia.
- No se espera que las deleciones, inserciones y sustituciones de las secuencias de proteínas incluidas en el presente documento produzcan cambios radicales en las características del polipéptido. Sin embargo, cuando es difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, deleción o inserción antes de hacerlo, un experto en la materia apreciará que el efecto se evaluará mediante el cribado del polipéptido para determinar su capacidad de reconocer y escindir preferentemente secuencias de reconocimiento que se encuentran dentro del gen de la región constante del receptor de linfocitos T humanos (SEQ ID NO: 1).

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes. Los ejemplos que no están dentro del ámbito de las reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos.

30 Ejemplo 1

Caracterización de meganucleasas que reconocen y escinden secuencias de reconocimiento de TRC1. Meganucleasas que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento TRC 1-2

Las meganucleasas recombinantes (SEQ ID NO: 8-27), denominadas colectivamente en el presente documento como "meganucleasas TRC 1-2" se diseñaron genéticamente para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (SEQ ID NO: 3), que está presente en la región constante alfa del receptor de linfocitos T humanos. Cada meganucleasa recombinante TRC 1-2 comprende una señal de localización de nucleasa N-terminal que proviene del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia de enlazador y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad en cada meganucleasa TRC 1-2 se une al semisitio de reconocimiento TRC1 de la SEQ ID NO: 3, mientras que una segunda subunidad se une al semisitio de reconocimiento de TRC2 (véase la Figura 1A).

Tal como se ilustra en las Figuras 2 y 3, las subunidades de unión a TRC1 y las subunidades de unión a TRC2 comprenden, cada una, una región hipervariable de 56 pares de bases, denominadas HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a TRC1 son idénticas fuera de la región HVR1 excepto en la posición 80 o la posición 271 (que comprende un resto Q o E), y están altamente conservadas dentro de la región HVR1. De manera similar, las subunidades de unión a TRC2 también son idénticas fuera de la región HVR2, excepto en la posición 80 o la posición 271 (que comprende un resto Q o E), y en la posición 330 de las meganucleasas TRC 1-2x.87 EE, TRC 1-2x.87 QE, TRC 1-2x.87 EQ, TRC 1-2x.87 y TRC 1-2x.163, que comprenden un resto R (gris sombreado y subrayado). Al igual que la región HVR1, la región HVR2 también está altamente conservada.

Las regiones de unión a TRC1 de la SEQ ID NO:8-27 se ilustran en la Figura 2 y se proporcionan como las SEQ ID NO: 33-52, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NO:33-52 comparte al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:33, que es la región de unión a TRC1 de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE (SEQ ID NO:8). Las regiones de unión a TRC2 de la SEQ ID NO:8-27 se ilustran en la Figura 3 y se proporcionan como las SEQ ID NO:58-77, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NO:58-77 comparte al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:58, que es la región de unión a TRC2 de la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE (SEQ ID NO:8).

2. Meganucleasas que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento TRC 3-4

Las meganucleasas recombinantes (SEQ ID NO: 28 y 29), denominadas colectivamente en el presente documento "TRC 3-4 meganucleasas", se diseñaron genéticamente para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento TRC 3-4 (SEQ ID NO: 4), que está presente en la región constante alfa del receptor de linfocitos T humanos. Cada meganucleasa recombinante TRC 3-4 comprende una señal de localización de nucleasa N-terminal que proviene del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia de enlazador y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad en cada meganucleasa TRC 3-4 se une al semisitio de reconocimiento TRC3 de la SEQ ID NO: 4, mientras que una segunda subunidad se une al semisitio de reconocimiento de TRC4 (véase la Figura 1A).

Tal como se ilustra en las Figuras 4 y 5, las subunidades de unión a TRC3 y las subunidades de unión a TRC4 comprenden, cada una, una región hipervariable de 56 pares de bases, denominadas HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a TRC3 son idénticas fuera de la región HVR1 excepto en la posición 80 o la posición 271 (que comprende un resto Q o E), y están altamente conservadas dentro de la región HVR1. De manera similar, Las subunidades de unión a TRC4 también son idénticas fuera de la región HVR2 excepto en la posición 80 o la posición 271 (que comprende un resto Q o E), y están altamente conservadas dentro de la región HVR2.

Las regiones de unión a TRC3 de las SEQ ID NO:28 y 29 se ilustran en la Figura 4 y se proporcionan como las SEQ ID NO:53 y 54, respectivamente. Las SEQ ID NO:53 y 54 comparten el 96,6 % de identidad de secuencia. Las regiones de unión a TRC4 de las SEQ ID NO:28 y 29 se ilustran en la Figura 5 y se proporcionan como las SEQ ID NO:78 y 79, respectivamente. Las SEQ ID NO: 78 y 79 también comparten el 96,6 % de identidad de secuencia.

3. Meganucleasas que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento TRC 7-8

Las meganucleasas recombinantes (SEQ ID NO: 30-32), denominadas colectivamente en el presente documento como "meganucleasas TRC 7-8" se diseñaron genéticamente para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento TRC 7-8 (SEQ ID NO: 5), que está presente en la región constante alfa del receptor de linfocitos T humanos. Cada meganucleasa recombinante TRC 7-8 comprende una señal de localización de nucleasa N-terminal que proviene del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia de enlazador y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad en cada meganucleasa TRC 7-8 se une al semisitio de reconocimiento TRC7 de la SEQ ID NO: 5, mientras que una segunda subunidad se une al semisitio de reconocimiento de TRC8 (véase la Figura 1A).

Tal como se ilustra en las Figuras 6 y 7, las subunidades de unión a TRC7 y las subunidades de unión a TRC8 comprenden, cada una, una región hipervariable de 56 pares de bases, denominadas HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a TRC7 son idénticas fuera de la región HVR1 excepto en la posición 80 o la posición 271 (que comprende un resto Q o E), y están altamente conservadas dentro de la región HVR1. De manera similar, las subunidades de unión a TRC8 también son idénticas fuera de la región HVR2 excepto en la posición 80 o la posición

271 (que comprende un resto Q o E), y están altamente conservadas dentro de la región HVR2.

Las regiones de unión a TRC7 de la SEQ ID NO:30-32 se ilustran en la Figura 6 y se proporcionan como las SEQ ID NO:55-57, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NO:55-57 comparte al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:55, que es la región de unión a TRC7 de la meganucleasa TRC 7-8x.7 (SEQ ID NO:30). Las regiones de unión a TRC8 de las SEQ ID NO:30-32 se ilustran en la Figura 7 y se proporcionan como las SEQ ID NO:80-82, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NO:80-82 comparte al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:80, que es la región de unión a TRC8 de la meganucleasa TRC 7-8x.7 (SEQ ID NO: 30).

4. Escisión de secuencias de reconocimiento de región constante alfa del receptor de linfocitos T humanos en un ensayo de indicador de células CHO

Para determinar si las meganucleasas TRC 1-2, TRC 3-4 y TRC 7-8 podrían reconocer y escindir sus respectivas secuencias de reconocimiento (las SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente), cada meganucleasa recombinante se evaluó usando el ensayo de indicador de células CHO descrito previamente (véase el documento WO/2012/167192 y la Figura 8). Para realizar los ensayos, se produjeron líneas indicadoras de células CHO que portaban un casete de expresión génica de proteína verde fluorescente no funcional (GFP) integrado en el genoma de las células. El gen GFP en cada línea celular fue interrumpido por un par de secuencias de reconocimiento de manera que la escisión intracelular de cualquiera de las secuencias de reconocimiento por una meganucleasa estimularía un evento de recombinación homóloga que daría como resultado un gen GFP funcional.

En las líneas celulares indicadoras CHO desarrolladas para este estudio, una secuencia de reconocimiento insertada en el gen GFP fue la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (SEQ ID NO: 3), la secuencia de reconocimiento TRC 3-4 (SEQ ID NO: 4) o la secuencia de reconocimiento TRC 7-8 (SEQ ID NO: 5). La segunda secuencia de reconocimiento insertada en el gen GFP fue una secuencia de reconocimiento CHO-23/24, que es reconocida y escindida por una meganucleasa de control llamada "CHO-23/24". Las células indicadoras de CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2 y la secuencia de reconocimiento de CHO-23/24 se denominan en el presente documento "células TRC 1-2". Las células indicadoras de CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento de TRC 3-4 y la secuencia de reconocimiento de CHO-23/24 se denominan en el presente documento "células TRC 3-4". Las células indicadoras de CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento de TRC 7-8 y la secuencia de reconocimiento de CHO-23/24 se denominan en el presente documento "células TRC 7-8".

Las células indicadoras de CHO se transfectaron con ADN plasmídico que codifica sus correspondientes meganucleasas recombinantes (por ejemplo, las células TRC 1-2 se transfectaron con ADN plasmídico que codifica las meganucleasas TRC 1-2) o que codifica la meganucleasa CHO-23/34. En cada ensayo, las células indicadoras 4×10^5 CHO se transfectaron con 50 ng de ADN plasmídico en una placa de 96 pocillos usando Lipofectamina 2000 (ThermoFisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A las 48 horas después de la transfección, las células se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas para GFP en comparación con un control negativo no transfectado (TRC 1-2bs). Tal como se muestra en la Figura 9, se descubrió que las meganucleasas TRC 1-2, TRC 3-4 y TRC 7-8 producen células positivas para GFP en líneas celulares que comprenden su secuencia de reconocimiento correspondiente a frecuencias que exceden significativamente el control negativo.

La eficacia de las meganucleasas TRC 1-2x.87 QE, TRC 1-2x.87 EQ, y TRC 1-2x.87 EE también se determinó de una manera dependiente del tiempo. En este estudio, las células TRC 1-2 (1×10^6) se electroporaron con 1×10^6 copias de ARNm de meganucleasa por célula usando un BioRad Gene Pulser Xcell de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A los 1, 4, 6, 8 y 12 días posteriores a la transfección, las células se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas para GFP. Tal como se muestra en la Figura 10, cada meganucleasa TRC 1-2 exhibió una alta eficiencia a los 2 días después de la transfección, con más del 50 % de células positivas para GFP observadas. Este efecto persistió durante el período de 12 días, sin evidencia de toxicidad celular observada.

5. Conclusiones

Estos estudios demostraron que las meganucleasas TRC 1-2, las meganucleasas TRC 3-4 y las meganucleasas TRC 7-8 abarcadas por la invención pueden dirigirse y escindir de manera eficaz sus respectivas secuencias de reconocimiento en las células.

Ejemplo 2

Escisión de secuencias de reconocimiento de TRC en linfocitos T y supresión de la expresión de receptor de linfocitos T de superficie celular

1. Escisión de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 en células Jurkat

Este estudio demostró que las meganucleasas TRC 1-2 abarcadas por la invención podrían escindir la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 en las células Jurkat (una línea celular de linfocitos T humanos inmortalizados). Se electroporaron 1×10^6 células Jurkat con 8×10^6 copias de un ARNm de meganucleasa TRC 1-2 dado por célula usando un BioRad Gene Pulser Xcell de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A las 72 horas después de la transfección,

se recolectó ADN genómico (ADNg) de las células y se realizó un ensayo de endonucleasa I T7 (T7E) para estimar la modificación genética en la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2 endógena (Figura 11). En el ensayo T7E, el locus TRC 1-2 se amplifica por PCR usando cebadores que flanquean la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Si hay indels (inserciones o deleciones aleatorias) dentro del locus TRC 1-2, el producto de PCR resultante consistirá en una mezcla de alelos de tipo silvestre y alelos mutantes. El producto de PCR se desnaturaliza y se deja que se vuelva a hibridar lentamente. La rehibridación lenta permite la formación de heterodúplex que consisten en alelos mutantes y de tipo silvestre, que dan como resultado en bases y/o abultamientos no coincidentes. La enzima T7E1 se escinde en sitios que no coinciden, dando como resultado productos de escisión que se pueden visualizar mediante electroforesis en gel. La Figura 11 demuestra claramente que trece versiones diferentes de las meganucleasas TRC 1-2 generaron resultados positivos en el ensayo T7E1, que indica la generación eficaz de indels en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 endógena.

Para examinar más a fondo las propiedades de escisión de las meganucleasas TRC 1-2, se realizó un experimento de dosis-respuesta en células Jurkat. Se electroporaron $1e^6$ células Jurkat con 3 μ g o 1 μ g de un ARNm de meganucleasa TRC 1-2 dado por célula usando un BioRad Gene Pulser Xcell de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A las 96 horas tras la transfección, se recolectó el ADNg y el ensayo T7E1 se realizó tal como se describió anteriormente. Tal como se observa en la Figura 12, quince diferentes meganucleasas TRC 1-2 mostraron escisión en el sitio de reconocimiento endógeno de TRC 1-2, incluyendo tres versiones diferentes de la meganucleasa TRC 1-2x.87. La TRC 1-2x.87 EE funcionó especialmente bien, generando una señal fuerte en el ensayo T7E1 con poca o ninguna toxicidad en las células Jurkat.

2. Escisión de la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2 en linfocitos T humanos

Este estudio demostró que las meganucleasas de TRC 1-2 abarcadas por la invención podrían escindir la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2 en linfocitos T humanos obtenidos de un donante. Los linfocitos T CD3 + se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, luego se electroporaron con ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE utilizando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A los 3 días y 7 días después de la transfección, se recolectó el ADNg y el ensayo T7E1 se realizó tal como se describió anteriormente. La Figura 13A demuestra que TRC 1-2x.87 EE introdujo eficazmente mutaciones en la secuencia de reconocimiento endógena de TRC 1-2 en linfocitos T humanos, lo que indica que la meganucleasa reconoció y escindió la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. La intensidad de los productos de escisión no parece cambiar entre el día 3 y el día 7 después de la transfección, lo que sugiere poca o ninguna toxicidad debido a la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE. Para determinar si las mutaciones en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 endógena fueron suficientes para eliminar la expresión superficial del receptor de linfocitos T, las células se analizaron por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD3. La Figura 13B muestra que aproximadamente el 50 % de los linfocitos T transfectados se tiñeron negativamente para CD3, lo que indica la desactivación del receptor de linfocitos T. La población CD3 negativa no cambió significativamente entre el día 3 y el día 7 después de la transfección, lo que indica además toxicidad escasa o nula asociada con la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE, o la pérdida de la expresión del receptor de linfocitos T.

Para verificar que la pérdida de expresión de CD3 se debió a mutaciones en el sitio de reconocimiento TRC 1-2, el ADNg se recogió de linfocitos T transfectados y el locus del sitio de reconocimiento TRC 1-2 se amplificó por PCR. Los productos de PCR se clonaron en el vector pCR-romo usando el kit de clonación de PCR Zero Blunt (Thermo Fisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se recogieron colonias individuales y se secuenciaron los plásmidos mini-preparados. La Figura 14 muestra secuencias de varias deleciones representativas que se observaron en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Las secuencias observadas son típicas de deleciones resultantes de la reparación de unión de extremos no homólogos de roturas de doble cadena de ADN generadas por endonucleasas.

Además de TRC 1-2x.87 EE, otras meganucleasas TRC 1-2 pudieron inactivar receptor de linfocitos T en linfocitos T humanos, incluidas TRC 1-2x.55 y TRC 1-2x.72, aunque en menor medida que la inactivación observada previamente para TRC 1-2x.87 EE (Tablas 5 y 6). TRC 1-2x.72 Q47E lleva una mutación en el sitio activo de la meganucleasa (aminoácido 47) y sirve como control negativo.

Tabla 5.

% de células CD3 ⁺		
Meganucleasa	Día 3	Día 6
TRC 1-2x.72 Q47E	0,38	1,1
TRC 1-2x.55	3,11	10,84

Tabla 6.

% de células CD3 ⁺		
Meganucleasa	Día 3	Día 5
TRC 1-2x.72 Q47E	0,29	0,4
TRC 1-2x.72	2,09	4,19

3. Conclusiones

Estos estudios demostraron que las meganucleasas TRC 1-2 abarcadas por la invención pueden reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 en ambas células Jurkat (una línea celular de linfocitos T inmortalizados) y en linfocitos T obtenidos de un donante humano. Además, estos estudios demostraron que NHEJ ocurre en el sitio de escisión de meganucleasa, tal como lo demuestra la aparición de indels. Además, Se demostró que las meganucleasas TRC 1-2 reducen la expresión en la superficie celular del receptor de linfocitos T en linfocitos T humanos obtenidos de un donante.

Ejemplo 3

1. Vectores de AAV recombinantes para introducir ácidos nucleicos exógenos en linfocitos T humanos

1. Vectores de AAV recombinantes

En el presente estudio, se diseñaron dos vectores de AAV recombinantes (denominados AAV405 y AAV406) para introducir una secuencia de ácido nucleico exógena, que comprende un sitio de restricción EagI, en el genoma de los linfocitos T humanos en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 mediante recombinación homóloga. Cada vector de AAV recombinante se preparó usando un protocolo de triple transfección, en el que una línea celular se transfecta con un primer plásmido que codifica componentes "auxiliares" (por ejemplo, adenovíricos) necesarios para dar soporte a la replicación, un segundo plásmido que comprende los genes *cap* y *rep*, y un tercer plásmido que comprende las repeticiones terminales invertidas víricas (ITR) que contienen la secuencia de ADN de intervención que se va a empaquetar en el virus (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico exógena) (véase, Cots D, Bosch A, Chillon M (2013) Curr. Gene Ther. 13 (5): 370-81). La Figura 15 ilustra el enfoque general para usar vectores de AAV recombinantes para introducir una secuencia de ácido nucleico exógena en el genoma celular en el sitio de escisión de la nucleasa.

El AAV405 se preparó usando el plásmido ilustrado en la Figura 16 (SEQ ID NO: 107). Tal como muestra, el plásmido AAV405 generalmente comprende secuencias para una 5' ITR, una secuencia potenciadora y promotora de CMV, un brazo de homología de 5', una secuencia de ácido nucleico que comprende el sitio de restricción de EagI, una secuencia de señal de poli(A) SV40, un brazo de homología de 3' y una ITR de 3'. El AAV406 se preparó usando el plásmido ilustrado en la Figura 17 (SEQ ID NO: 108). Tal como muestra, el plásmido AAV406 comprende secuencias similares a las de AAV405, pero carece de las secuencias potenciadoras y promotoras de CMV aguas arriba del brazo de homología de 5'. Los estudios actuales de AAV incluyeron además el uso de un vector de AAV que codifica GFP (GFP-AAV), que se incorporó como control positivo para la eficacia de transducción de AAV.

2. Introducción de secuencias de ácido nucleico exógenas en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2

Para probar si los moldes de AAV serían adecuados para la reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés) después de la generación de una ruptura de doble cadena con meganucleasas TRC 1-2, se realizaron una serie de experimentos utilizando linfocitos T humanos. En el primer experimento, se determinó el momento de la electroporación con ARN de TRC 1-2 y la transducción con vectores AAV recombinantes. Los linfocitos T CD3⁺ humanos se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, luego se electroporaron con ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE (1 µg) usando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A las 2, 4 u 8 horas después de la transfección, se transdujo a las células con GFP-AAV (1e⁵ genomas víricos por célula). Las células se analizaron por citometría de flujo para la expresión de GFP a las 72 horas después de la transducción. Tal como se muestra en la Figura 18, la mayor eficacia de transducción se observó cuando las células se transdujeron a las 2 horas después de la transfección (88 % de células positivas para GFP). La eficacia de la transducción disminuyó significativamente a medida que aumentó el tiempo entre la transfección y la transducción, con el 78 % de células positivas para GFP a las 4 horas y el 65 % de células positivas para GFP a las 8 horas.

Habiendo determinado que se produjo una transducción vírica eficaz cuando las células se transdujeron 2 horas después de la transfección, los vectores AAV405 y AAV406 se usaron como moldes de HDR en linfocitos T humanos. Los linfocitos T CD3⁺ se estimularon y se transfectaron con 1 µg de ARNm de TRC 1-2x.87 EE tal como se describió anteriormente. A las 2 horas después de la transfección, las células se transdujeron con AAV405 o AAV406 (1e⁵ genomas víricos por célula). Como controles de solo transducción, las células se transfectaron por simulación (con agua) y se transdujeron con AAV405 o AAV406 (1e⁵ genomas víricos por célula). Para un control de meganucleasa

solo, las células se transfectaron con TRC 1-2x.87 EE y luego se transdujeron de forma simulada (con agua) a las 2 horas después de la transfección.

Para determinar si los vectores AAV sirvieron como moldes de HDR, el ADN_g se recolectó de las células y el locus TRC 1-2 se amplificó por PCR usando cebadores que reconocieron secuencias más allá de la región de homología en los vectores de AAV. Los cebadores de PCR fuera de las regiones de homología solo permitieron la amplificación del genoma de linfocitos T, no de los vectores AAV. Los productos de PCR se purificaron y se digirieron con EagI. La Figura 19 muestra la escisión de los productos de PCR amplificados a partir de células que se transfectaron con TRC 1-2x.87 EE y se transdujeron con cualquier vector AAV (véase las flechas), lo que indica la inserción del sitio EagI en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. EagI no escinde los productos de PCR de todas las poblaciones de células de control, lo que demuestra que la inserción del sitio EagI requiere la creación de una ruptura de doble cadena de ADN por una meganucleasa TRC 1-2.

Para definir mejor la inserción del sitio EagI en los linfocitos T humanos, se examinaron productos individuales del producto de PCR a granel. El producto de PCR no digerido generado a partir del experimento anterior se clonó en el vector pCR-romo usando el kit de clonación de PCR Zero Blunt (Thermo Fisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR de colonias se realizó usando cebadores M13 directos e inversos (el pCR contundente contiene sitios de cebado M13 directo e inverso que flanquean el inserto) y una porción de productos de PCR de células transfectadas con TRC 1-2x.87 EE y AAV405 o AAV406 se analizaron mediante electroforesis en gel (Figuras 20A y 21A, respectivamente). En ambos casos, hay una mezcla de productos de PCR de longitud completa (aproximadamente 1600 pb), insertos más pequeños y algunos plásmidos vacíos (aproximadamente 300 pb). En este ensayo, las bandas más pequeñas que las de longitud completa pero más grandes que los plásmidos vacíos son a menudo secuencias que contienen grandes deleciones dentro de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. En paralelo, otra porción de productos de PCR se digirió con EagI para determinar el porcentaje de clones que contienen el sitio de reconocimiento de EagI insertado en la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2. Las Figuras 20B y 21B muestran que varios productos de PCR se escindieron con EagI (por ejemplo, Figura 20B, segunda fila, 6 carriles desde la izquierda), generando los fragmentos esperados de aproximadamente 700 y 800 pb. Estos geles permiten que la estimación de la inserción de EagI sea aproximadamente del 25 % y del 6 % para AAV405 y AAV406, respectivamente (ajustado para vectores vacíos).

Para confirmar las observaciones de la electroforesis en gel de productos de PCR sin cortar y digerir con EagI, se secuenció la porción restante de cada producto de PCR. La Figura 22A muestra secuencias de varias deleciones e inserciones representativas que se observaron en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Estas secuencias son típicas de secuencias resultantes de la reparación de unión de extremos no homólogos de roturas de doble cadena de ADN generadas por endonucleasas. Todos los productos de PCR que se escindieron con EagI contenían un sitio EagI insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (Figura 22B).

3. Eficacia de transducción de AAV mejorada

A la luz de la observación de que la transducción de AAV fue más eficaz cuando se llevó a cabo 2 horas después de la transfección que cuando se llevó a cabo más tarde, se realizó un experimento para optimizar el tiempo de transfección y transducción. Los linfocitos T CD3⁺ humanos se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, luego se electroporó con la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE (1 µg) usando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Inmediatamente después de la transfección o 2 horas después de la transfección, se transdujo a las células con GFP-AAV (1e⁵ genomas víricos por célula). Además, las células no estimuladas se transdujeron con GFP-AAV (1e⁵ genomas víricos por célula). A las 72 horas tras la transducción, la expresión de GFP en las células se analizó mediante citometría de flujo. La Figura 23 muestra que la transducción de GFP-AAV realizada 2 horas después de la transfección dio como resultado un 90 % de células positivas para GFP, pero esa transducción inmediatamente después de la transfección dio como resultado un 98 % de células positivas para GFP. Los linfocitos T restantes parecían refractivos a la transducción de AAV, con aproximadamente el 0 % de células positivas para GFP. Las células no transducidas también mostraron aproximadamente el 0 % de células positivas para GFP.

4. Sumario

Estos estudios demuestran que los vectores de AAV se pueden usar junto con meganucleasas recombinantes para incorporar una secuencia de ácido nucleico exógena en un sitio de escisión en la región constante alfa de TCR mediante recombinación homóloga.

Ejemplo 4

Vectores de AAV recombinantes para introducir ácidos nucleicos exógenos que codifican un receptor de antígeno quimérico en linfocitos T humanos

1. Vectores de AAV recombinantes

En el presente estudio, se diseñaron dos vectores de AAV recombinantes (denominados AAV-CAR100 y AAV-CAR763) para introducir una secuencia de ácido nucleico exógena, que codifica un receptor de antígeno quimérico,

en el genoma de los linfocitos T humanos en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 mediante recombinación homóloga. Cada vector de AAV recombinante se preparó usando el protocolo de triple transfección descrito anteriormente.

5 El AAV-CAR100 (también denominado en el presente documento AAV408) se preparó usando el plásmido ilustrado en la Figura 24 (SEQ ID NO:109). Tal como muestra, el AAV-CAR100 (AAV408) está diseñado para producir un vector de AAV autocomplementario, y generalmente comprende secuencias para un 5' ITR, un brazo de homología de 5', una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico anti-CD 19, una secuencia de señal de poli(A) SV40, un brazo de homología de 3' y una ITR de 3'. El AAV-CAR763 (también denominado en el presente documento AAV412) se preparó usando el plásmido ilustrado en la Figura 25 (SEQ ID NO:110). Tal como muestra, el plásmido AAV-CAR763 (AAV412) generalmente comprende las mismas secuencias que AAV-CAR100 (AAV408), pero está diseñado para producir un vector de AAV monocatenario. Debido a que un vector de AAV monocatenario puede acomodar una carga útil más grande, el brazo de homología de 5' y el brazo de homología de 3' son más largos en AAV-CAR763 (AAV412) que en AAV-CAR100 (AAV408). Los estudios actuales de AAV incluirán además el uso de un vector de AAV que codifica la GFP (GFP-AAV), que se incorporará como un control positivo para la eficiencia de transducción de AAV.

2. Introducción de una secuencia del receptor de antígeno quimérico en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2

Se realizarán estudios para determinar la eficacia del uso de vectores de AAV recombinantes para insertar una secuencia de receptor de antígeno quimérico en el gen de la región constante de TCR alfa mientras, simultáneamente, se inactiva la expresión en la superficie celular del receptor TCR endógeno.

20 Para confirmar la eficacia de la transducción, se obtendrán linfocitos T CD3 + humanos y se estimularán con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 3 días, luego se electroporaron con ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE (1 µg) usando el Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células serán transducidas con GFP-AAV (1e⁵ genomas víricos por célula) inmediatamente después de la transfección tal como se describió anteriormente. La expresión de GFP en las células se analizará por citometría de flujo a las 72 horas después de la transducción para determinar la eficacia de la transducción.

25 Los vectores AAV-CAR100 (AAV408) y AAV-CAR763 (AAV412) se usarán luego como moldes de HDR en linfocitos T humanos para la inserción de la secuencia del receptor de antígeno quimérico anti-CD 19. Los linfocitos T CD3+ humanos se estimularán y se transfectarán con 1 µg de ARNm de TRC 1-2x.87 EE tal como se describió anteriormente. Después, las células se transducirán con AAV-CAR100 (AAV408) o AAV-CAR763 (AAV412) (1e⁵ genomas víricos por célula) ya sea inmediatamente después de la transfección o en 0-8 horas de la transfección. Como controles de solo transducción, las células serán transfectadas por simulación (con agua) y transducidas con AAV-CAR100 (AAV408) o AAV-CAR763 (AAV412) (1e⁵ genomas víricos por célula). Para un control de meganucleasa solo, las células se transfectarán con ARNm que codifica TRC 1-2x.87 EE y luego se transducidas por simulación (con agua) inmediatamente después de la transfección.

35 La inserción de la secuencia del receptor de antígeno quimérico se confirmará mediante la secuenciación del sitio de escisión en el gen de región constante alfa de TCR. La expresión en la superficie celular del receptor de antígeno quimérico se confirmará mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-Fab o anti-CD19. La inactivación del receptor de linfocitos T endógeno en la superficie celular se determinará mediante citometría de flujo tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 5

Inserción y expresión del receptor de antígeno quimérico

1. Inserción de la secuencia del receptor de antígeno quimérico en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2

45 En el presente estudio, los presentes inventores probaron si AAV puede proporcionar moldes de HDR que se pueden usar para insertar una secuencia de receptor de antígeno quimérico en el gen de la región constante alfa de TCR y, simultáneamente, inactivar la expresión en la superficie celular del receptor TCR endógeno. En el primer experimento, se estimularon linfocitos T CD3+ humanos (1e⁶ células) y se electroporaron con ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE (2 µg) tal como se describe anteriormente, luego se transdujeron inmediatamente con AAV412 (1e⁵ genomas víricos/célula). Como controles, las células fueron electroporadas de manera simulada, luego se transdujeron con AAV412 o se electroporaron con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE, luego se transdujeron de manera simulada. Se incluyó un control adicional de células electroporadas de manera simulada y transducidas de manera simulada.

55 Se desarrolló un ensayo basado en PCR para determinar si el molde de HDR de AAV se utilizó para reparar roturas de doble cadena en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Se usaron tres conjuntos de pares de cebadores para el análisis por PCR. El primer conjunto fue diseñado para amplificar una región con los brazos de homología de AAV412. Dado que este primer conjunto de cebadores (denominado "región de brazos homólogos internos/CAR" en la Tabla 7) se encuentra dentro de la región de homología, amplificará el locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 no modificado del genoma (349 pb), la entrada del vector AAV412 (2603 pb) o la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 en la que se insertó el gen CAR (2603 pb). El segundo conjunto de cebadores (denominado "brazo de

homología externo de 5'" en la Tabla 7) incluye un cebador que hibrida dentro de la región CAR del molde de HDR de AAV412, un cebador que hibrida en el genoma humano, fuera del brazo de homología de 5' del molde de HDR de AAV412 y amplificará un fragmento de 1872 pb solo si el gen CAR se insertó con éxito en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. El tercer conjunto de cebadores (denominado "brazo de homología externo de 3'" en la Tabla 7) incluye un cebador que hibrida dentro de la región CAR del molde de HDR de AAV412, y un cebador que hibrida en el genoma humano, fuera del brazo de homología de 3' del molde de HDR de AAV412. De manera similar al segundo conjunto de cebadores, el tercer conjunto de cebadores amplificará un fragmento de 1107 pb solo si el gen CAR se insertó con éxito en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Tomados en conjunto, los productos de PCR de los tres conjuntos de cebadores indicarán si la secuencia CAR está presente en las células (grupo de cebadores 1) y si se ha insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 (grupos de cebadores 2 y 3).

El día 4 después de la transducción, las células se analizaron usando los pares de cebadores de PCR descritos anteriormente. Brevemente, se recolectaron aproximadamente 3.000 células, se sedimentaron, se lisaron y se realizó una PCR para determinar si el gen CAR se insertó en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Los productos de PCR se redisolviéron en un gel de agarosa, se muestra en la Figura 26 (las descripciones de los carriles se pueden encontrar en la Tabla 7). Los carriles 1-3 son productos de PCR de la muestra que fue electroporada con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y transducida de manera simulada.

Como cabía esperar, el primer par de cebadores ("región de brazos homólogos internos/CAR") amplificó el locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 no modificado, generando una banda de 349 pb que se muestra en el carril 1. Los carriles 2 y 3 se corresponden con pares de cebadores que solo generan un producto si el gen CAR se ha insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2, y no muestran productos. Los carriles 7-9 representan muestras que fueron electroporadas y transducidas de manera simulada y muestran las mismas bandas que el control de ARNm de TRC 1-2x.87EE solo descrito anteriormente. Los carriles 4-6 muestran productos de PCR de la muestra que se electroporó con ARNm de TRC 1-2x.87EE y se transdujo con AAV412. El carril 4 muestra dos bandas generadas por el primer par de cebadores ("región de brazos homólogos internos/CAR"), lo que indica que la amplificación del locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 no modificado del genoma (349 pb) y la entrada del vector AAV412 (2603 pb) o la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 en la que se insertó el gen CAR (2603 pb). Los carriles 5 y 6 muestran productos generados por los pares de cebadores que solo amplifican productos si la secuencia de ácido nucleico CAR se ha insertado en el sitio de reconocimiento TRC 1-2x.87EE. Ambas bandas tienen el tamaño previsto (1872 y 1107 pb, respectivamente). Los carriles 10-12 representan la muestra que se sometió a electroporación de manera simulada y se transdujo con AAV412. El carril 10 muestra dos bandas generadas por el primer par de cebadores ("región de brazos homólogos internos/CAR"), lo que indica la amplificación del locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 no modificada del genoma (349 pb) y la entrada del vector AAV412 (2603 pb). Los carriles 11 y 12 se corresponden con pares de cebadores que solo generan un producto si el gen CAR se ha insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2, y no muestran productos. La ausencia de bandas en los carriles 11 y 12 (que incluyen cebadores fuera del brazo de homología) indica que la banda de 2603 pb en el carril 10 se generó a partir de la amplificación de la entrada de AAV412.

Tomados en conjunto, el análisis de PCR demuestra claramente que los genes CAR se introducen en el sitio de reconocimiento TRC 1-2x.87EE cuando tanto el ARNm de TRC 1-2x.87EE como el AAV412 están presentes en las células. Por lo tanto, los presentes inventores concluyen que AAV412 sirve para producir moldes de HDR adecuados que se pueden usar para insertar un gen CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2x.87EE.

En un segundo experimento, los linfocitos T CD3+ humanos se estimularon y se electroporaron con ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87 EE tal como se describe anteriormente, luego se transdujeron inmediatamente con cantidades crecientes de AAV408 (0 µl, 3,125 µl, 6,25 µl, 12,5 µl o 25 µl, que se corresponde con aproximadamente 0, 3,125e³, 6,250e³, 1,25e⁴ y 2,5e⁴ genomas víricos/célula). Como controles, las células fueron electroporadas de manera simulada, luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV408. Los controles adicionales incluyeron células que fueron electroporadas por simulación y transducidas por simulación, así como las células que se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron por simulación. En el día 4 después de la transducción, las células se recolectaron y se analizaron tal como se describe anteriormente, pero solo usando los pares de cebadores que amplificaron un producto solo si el gen CAR se ha insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Los productos de PCR se redisolviéron en geles de agarosa, tal como se muestra en la Figura 27. La Figura 27A muestra los productos de PCR generados usando el par de cebadores descrito anteriormente ("brazo de homología externo de 5'" que solo amplifica un producto en el extremo 5' del locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 si el gen CAR se ha insertado en ese lugar. La Figura 27B muestra los productos de PCR generados usando el par de cebadores descrito anteriormente ("brazo de homología externo de 3'" que solo amplifica un producto en el extremo 3' del locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 si el gen CAR se ha insertado en ese lugar. Las descripciones de los carriles se pueden encontrar en la Tabla 8. Los carriles 1-5 en las Figuras 27A y 27B representan las muestras que fueron electroporadas de manera simulada o electroporadas de manera simulada y luego transducidas de manera simulada. No se ven productos de PCR en células electroporadas de manera simulada, lo que indica que los moldes de HDR producidos por AAV408 no pueden insertar el gen CAR en la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2 en ausencia de ARNm de TRC 1-2x.87EE. El carril 6 representa la muestra que se sometió a electroporación con ARNm de TRC 1-2x.87EE y se transdujo de manera simulada. No hay productos de PCR visibles, lo que indica que el gen CAR no se había insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Los carriles 7-10 representan muestras que se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE y se transdujeron con

cantidades crecientes de AAV408. Las bandas de tamaño apropiado para cada PCR son evidentes, lo que indica que AAV408 puede producir donantes de HDR para reparar la secuencia de reconocimiento TRC 1-2, lo que da como resultado la inserción del gen CAR.

Tabla 7.

Muestra	Nucleofección	Virus	PCR	Tamaño del producto
		(100k MDI)		
1	TRC1-2x87EE	---	Región de brazos homólogos internos / CAR	Genómico = 349 pb
				+ CD19 = 2603 pb
2	TRC1-2x87EE	---	Brazo de homología externo de 5'	1872 pb
3	TRC1-2x87EE	---	Brazo de homología externo de 3'	1107 pb
4	TRC1-2x87EE	AAV412	Región de brazos homólogos internos / CAR	Genómico = 349 pb
				+ CD19 = 2603 pb
5	TRC1-2x87EE	AAV412	Brazo de homología externo de 5'	1872 pb
6	TRC1-2x87EE	AAV412	Brazo de homología externo de 3'	1107 pb
7	Simulación (agua)	---	Región de brazos homólogos internos / CAR	Genómico = 349 pb
				+ CD19 = 2603 pb
8	Simulación (agua)	---	Brazo de homología externo de 5'	1872 pb
9	Simulación (agua)	---	Brazo de homología externo de 3'	1107 pb
10	Simulación (agua)	AAV412	Región de brazos homólogos internos / CAR	Genómico = 349 pb
				+ CD19 = 2603 pb
11	Simulación (agua)	AAV412	Brazo de homología externo de 5'	1872 pb
12	Simulación (agua)	AAV412	Brazo de homología externo de 3'	1107 pb

5

Tabla 8.

Muestra	Nucleofección	Virus (AAV408)
		µl
1	Simulación (agua)	0
2	Simulación (agua)	3,125
3	Simulación (agua)	6,25
4	Simulación (agua)	12,5
5	Simulación (agua)	25
6	TRC1-2x87EE	0
7	TRC1-2x87EE	3,125
8	TRC1-2x87EE	6,25
9	TRC1-2x87EE	12,5
10	TRC1-2x87EE	25

Los ensayos basados en PCR descritos anteriormente son útiles para determinar si el gen CAR se había insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2, pero no dan información sobre eficacia. Para determinar la eficacia de la inserción de CAR, los presentes inventores desarrollaron un ensayo digital basado en PCR (el esquema se muestra en la Figura 28A). En este ensayo, se utilizan dos conjuntos de cebadores. El primer conjunto amplifica una secuencia de genes irrelevante y sirve como una secuencia de referencia para controlar el número de molde. El segundo conjunto consiste en un cebador que se hibrida dentro del gen CAR y un cebador que se hibrida fuera del brazo de homología

10

de 3', de modo que un producto solo se amplifica si el gen CAR se ha insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Una sonda marcada con VIC hibrida dentro del amplicón generado a partir del primer conjunto de cebadores y la sonda marcada con FAM hibrida dentro del amplicón generado por el segundo conjunto de cebadores. Al dividir el número de amplicones detectados por la sonda marcada con FAM entre el número de amplicones de secuencia de referencia detectados por la sonda marcada con VIC, es posible cuantificar con precisión el porcentaje de loci de la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2 que se modificaron mediante la inserción del gen CAR.

La Figura 28B muestra los resultados del ensayo de PCR digital para muestras que fueron electroporadas por simulación y luego transducidas, electroporada con ARNm de TRC 1-2x.87EE luego transducidas por simulación, o electroporadas con ARNm de TRC 1-2x.87EE luego transducidas con cantidades en aumento de AAV408. La PCR digital se realizó usando ADN genómico aislado de células aproximadamente 1 semana después de la transducción. De acuerdo con las observaciones de la PCR descrita en la Figura 27, se descubrió que ambas muestras de control (solo transducción o solo electroporación) tenían un gen CAR insertado al 0% en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2x.87EE. Se descubrió que las muestras se electroporaron con ARNm que codificaba TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con cantidades en aumento de AAV408 tenían entre aproximadamente el 1,5 % y el 7 %. El ensayo se realizó en dos instrumentos diferentes (marcados QX200 y QS3D) y mostró una concordancia notable, que demuestra la sensibilidad y la precisión de este ensayo basado en PCR digital.

2. Expresión del receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 en linfocitos T

Además de determinar si la inserción de CAR se produjo a nivel molecular, los presentes inventores buscaron determinar el nivel de expresión del receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 en células que tenían el gen CAR insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 usando AAV408 como molde de HDR. Además, los presentes inventores examinaron la eficacia en la que la inserción del CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2x.87EE dio como resultado la desactivación del receptor de linfocitos T. Las muestras descritas anteriormente y analizadas en las Figuras 27 y 28 también se analizaron para la expresión de CAR y CD3 por citometría de flujo. Aproximadamente 4 días después de la transducción, las células se marcaron con anticuerpos que reconocen el CAR anti-CD 19 (anti-Fab-Alexa647) o CD3 (CD3-BB515) y se analizaron por citometría de flujo. La Figura 29A muestra gráficos de citometría de flujo, con marcaje anti-CAR mostrado en el eje Y y marcaje anti-CD3 mostrado en el eje X. Las células que se electroporaron por simulación y se transdujeron por simulación (MDI-0) fueron abrumadoramente CD3⁺/CAR⁻ (el cuadrante inferior derecho, 98,7 %). Las células que se electroporaron de manera simulada y luego se transdujeron con cantidades en aumento de AAV408 parecían esencialmente idénticas a las células de control, con las poblaciones de CD3⁺/CAR⁻ al 98,8 %, 99,99 % y 99,1 %. Por lo tanto, los presentes inventores concluyen que el virus AAV408 solo no está dirigiendo la expresión de niveles detectables de CAR, ni es capaz de alterar la expresión del receptor de linfocitos T.

La Figura 29B muestra gráficos de citometría de flujo para muestras que se electroporaron con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron de manera simulada o las células que se electroporaron con TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV408. Las células que se electroporaron y luego se transdujeron de manera simulada muestran el 47,1% de células CD3⁻, lo que indica la inactivación eficaz del complejo receptor de linfocitos T. El marcaje de fondo con el CAR anti-CD 19 era muy bajo, con el 0,6 % en la población CD3⁻ y el 0,78 % en la población CD3⁺. Las muestras que se electroporaron con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV408 mostraron marcaje de CAR en la población CD3⁻, que variaba del 2,09 % al 5,9 %. También hubo un ligero aumento en el marcaje de CAR en la población CD3⁺, que variaba del 1,08 % al 1,91 %. Los presentes inventores no determinaron la causa del aumento de células CAR⁺ en la población CD3⁺, aunque es posible que el CAR se haya insertado en el alelo del receptor de linfocitos T no expresado (solo un alelo de la cadena alfa del receptor de linfocitos T se expresa y se incorpora al complejo del receptor de linfocitos T).

Estos datos se correlacionaron bien con el ensayo cuantitativo basado en PCR digital descrito anteriormente. Por ejemplo, a la MDI más alta de AAV408 (2,5e⁴ genomas víricos/célula), el ensayo de PCR digital mostró aproximadamente el 6 % de inserción de CAR, y el ensayo de citometría de flujo mostró el 5,9 % de células CAR⁺/CD3⁻. Si se tiene en cuenta la población de CAR⁺/CD3⁻, los datos siguen siendo bastante comparables, con el ensayo de citometría de flujo que muestra aproximadamente el 7,8 % de CAR⁺ en comparación con el 6 % por PCR digital.

Ejemplo 6

Caracterización de vectores AAV adicionales

1. Inserción de una secuencia del receptor de antígeno quimérico en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2

Habiendo demostrado que los vectores AAV podrían proporcionar moldes de HDR adecuados para insertar genes CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2x.87EE, los presentes inventores buscaron optimizar la configuración del vector AAV. Los presentes inventores generaron un vector que se podría usar para producir genomas de AAV autocomplementarios que incluían el casete de expresión del gen CAR dirigido por un promotor JeT, flanqueado por regiones cortas de homología con el locus de secuencia de reconocimiento TRC 1-2 y las ITR de AAV.

Este vector se conoce como AAV421 (Figura 30; SEQ ID NO:123). Se necesitaron brazos de homología cortos debido a la capacidad de empaquetado limitada del AAV autocomplementario. Además, los presentes inventores generaron

un vector que se podría usar para producir genomas de AAV de cadena simple que incluyen el casete de expresión del gen CAR dirigido por un promotor CMV, flanqueado por largos brazos de homología y las ITR de AAV. Este vector se conoce como AAV422 (Figura 31; SEQ ID NO:124). Dado que los genomas de AAV monocatenarios tienen una mayor capacidad de carga, los presentes inventores pudieron utilizar brazos de homología más largos que en el vector autocomplementario.

Para probar si AAV421 y AAV422 fueron útiles para dirigir la inserción del gen CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2, se llevaron a cabo varios experimentos similares a los descritos anteriormente en linfocitos T CD3⁺ humanos. En un primer experimento, los linfocitos T CD3⁺ humanos (1e⁶ células) se electroporaron de forma simulada y luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV421 o 422, o se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE (2 µg) y luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV421 o AAV422. Las MDI AAV422 fueron significativamente más altas que las de AAV421 en este experimento que en los experimentos descritos anteriormente (las MDI aproximadas fueron de 1.25e⁴, 2.5e⁴, 5e⁴ y 1e⁵ genomas víricos/célula) porque los experimentos anteriores con AAV408 sugirieron que las MDI más altas darían como resultado una inserción de CAR más eficaz. El reservorio de virus AAV421 no se concentró lo suficiente como para permitir títulos significativamente más altos que en los experimentos descritos anteriormente. Como controles, las células fueron electroporadas (de manera simulada o con ARNm de TRC 1-2x.87EE) y luego transducidas de manera simulada. Como componente adicional de este experimento, se realizó una condición de "gran escala", en la que se electroporaron 10e⁶ células (10 veces más que un experimento típico) con ARNm de TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con AAV422 (2.5e⁴ genomas víricos/célula). Finalmente, los presentes inventores también probaron un segundo reservorio de virus de AAV421 para compararlo con el reservorio de virus primario.

La inserción del CAR se determinó por PCR tal como se describe anteriormente, utilizando pares de cebadores que solo amplifican productos si el gen CAR se ha insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2x.87EE. La PCR se resolvió mediante gel de agarosa, se muestra en la Figura 32A y 32B (las descripciones de los carriles se pueden encontrar en las Tablas 9 y 10). La muestra 1 en la Figura 32A se electroporó de manera simulada y luego se transdujo de manera simulada, y las muestras 2-5 se electroporaron de manera simulada y luego se transdujeron con AAV421. El gel muestra que ninguna de estas muestras generó productos de PCR, lo que indica que AAV421, en ausencia de ARNm de TRC 1-2x.87EE, no puede impulsar la inserción del gen CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Además, la muestra de control que se sometió a electroporación con ARNm de TRC 1-2x.87EE y luego se transdujo de manera simulada (muestra 6), no mostró ningún producto de PCR. Las muestras 7-10 en la Figura 32A se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE, luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV421. El gel muestra bandas de PCR para productos que se extienden más allá del brazo de homología de 5' y de 3' (las dos bandas debajo de cada número de muestra), lo que demuestra la integración del gen CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Por último en la Figura 32A, los carriles 11 y 12 representan muestras que se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con AAV422, ya sea comenzando con 1e⁶ o 10e⁶ células/muestra, respectivamente. La presencia de ambas bandas de PCR (más grande en el primer conjunto, debido a que se utilizó un cebador diferente para dar cuenta de un brazo de homología más largo) indica la inserción exitosa del gen CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2.

La muestra 1 en la Figura 32B se electroporó de manera simulada y luego se transdujo de manera simulada, y las muestras 2-5 se electroporaron de manera simulada y luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV422 (Tabla 10). El gel muestra que ninguna de estas muestras generó productos de PCR, lo que indica que AAV422, en ausencia de ARNm de TRC 1-2x.87EE, no puede impulsar la inserción del gen CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Las muestras 7-10 en la Figura 32B se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE, luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV422. El gel muestra bandas de PCR para productos que se extienden más allá del brazo de homología de 5' y 3', lo que demuestra la integración del gen CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Finalmente, la muestra 11 representa la muestra que se electroporó con ARNm de TRC 1-2x.87EE y luego se transdujo con un AAV421 de un reservorio de virus diferente al de las muestras que se muestran en la Figura 32A. La presencia de bandas indica la inserción del gen CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 y confirma la reproducibilidad entre diferentes reservorios de virus. Tomados en conjunto, la Figura 32 demuestra claramente que tanto AAV421 como AAV422 son capaces de generar moldes de HDR adecuados para insertar el gen CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2.

Tabla 9.

Muestra	Nucleofección	AAV	µl	MDI
		Virus	AAV	(aproximado)
1	Simulación (agua)	421	0	0
2	Simulación (agua)	421	3,125	3906

(continuación)

Muestra	Nucleofección	AAV	µl	MDI
		Virus	AAV	(aproximado)
3	Simulación (agua)	421	6,25	7813
4	Simulación (agua)	421	12,5	15625
5	Simulación (agua)	421	25	31250
6	TRC1-2x87EE	421	0	0
7	TRC1-2x87EE	421	3,125	3906
8	TRC1-2x87EE	421	6,25	7813
9	TRC1-2x87EE	421	12,5	15625
10	TRC1-2x87EE	421	25	31250
11	TRC1-2x87EE	422	6,25	25000
12	TRC1-2x87EE	422	62,5	25000
	Gran escala			

Tabla 10.

Muestra	Nucleofección	AAV	µl	MDI
		Virus	AAV	(aproximado)
1	Simulación (agua)	422	0	0
2	Simulación (agua)	422	3,125	12500
3	Simulación (agua)	422	6,25	25000
4	Simulación (agua)	422	12,5	50000
5	Simulación (agua)	422	25	100000
6	TRC1-2x87EE	422	0	0
7	TRC1-2x87EE	422	3,125	12500
8	TRC1-2x87EE	422	6,25	25000
9	TRC1-2x87EE	422	12,5	50000
10	TRC1-2x87EE	422	25	100000
11	TRC1-2x87EE	421B	25	10000

2. Expresión del receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 en linfocitos T usando AAV421

5 En este caso, los presentes inventores buscaron determinar el nivel de expresión del receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 en células que tenían el gen CAR insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 usando AAV421. Las muestras descritas anteriormente y analizadas en las Figuras 32A también se analizaron para la expresión de CAR y CD3 por citometría de flujo. Aproximadamente 4 días después de la transducción, las células se marcaron con anticuerpos que reconocen el CAR anti-CD 19 o CD3 y se analizaron por citometría de flujo. La Figura 33A muestra

10 gráficos de citometría de flujo para células que fueron electroporadas y transducidas con AAV421, junto con células de control que fueron electroporadas de manera simulada y transducidas de manera simulada. Las células que se electroporaron por simulación y se transdujeron por simulación (MDI-0) fueron abrumadoramente CD3⁺/CAR⁻ (el cuadrante inferior derecho, 98,8 %). Las células que se electroporaron de manera simulada y luego se transdujeron con cantidades en aumento de AAV421 parecían esencialmente idénticas a las células de control, con las poblaciones de CD3⁺/CAR⁻ al 98,8 %, 98,6 %, 98,8 % y 97,9 %. Por lo tanto, los presentes inventores concluyen que el virus

15 AAV421 por sí solo no está dirigiendo la expresión de niveles detectables de CAR, ni es capaz de alterar la expresión del receptor de linfocitos T.

La Figura 33B muestra gráficos de citometría de flujo para muestras que se electroporaron con ARNm TRC 1-2x.87EE

y luego se transdujeron de manera simulada o las células que se electroporaron con TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV421. Las células que se electroporaron y luego se transdujeron de manera simulada muestran el 56,7 % de células CD3⁻, lo que indica la inactivación eficaz del complejo receptor de linfocitos T. El marcaje de fondo con el CAR anti-CD 19 era muy bajo, con el 0,48 % en la población CD3⁻ y el 0,36 % en la población CD3⁺. Las muestras que se electroporaron con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV412 mostraron cantidades significativas de marcaje de CAR en la población CD3⁻, que variaba del 4,99 % al 13,4 %. También hubo un ligero aumento en el marcaje de CAR en la población CD3⁺, que variaba del 1,27 % al 3,95 %. Tal como se ha mencionado anteriormente, es posible que el gen CAR se haya insertado en el alelo del receptor de linfocitos T no expresado. También en contraste con los experimentos con AAV408, la población CAR⁺ estaba mucho mejor definida, con una intensidad de fluorescencia media más alta, lo que sugiere que el promotor JeT promueve una mayor expresión que el promotor central eF1α.

Al evaluar la inserción del gen CAR utilizando AAV421 junto con TRC 1-x.87EE, los presentes inventores buscaron determinar un procedimiento que les permitiese expandir y enriquecer preferentemente la población CD3⁻/CAR⁺. Del experimento descrito anteriormente y mostrado en la Figura 33, los presentes inventores utilizaron células que se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE (2 µg) y luego se transdujeron con AAV421 (3,13e⁴ genomas víricos/célula). Las muestras de control fueron electroporadas de manera simulada y transducidas de manera simulada, electroporadas de manera simulada y transducidas con AAV421, o electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas de manera simulada, tomadas del experimento descrito anteriormente y mostrado en la Figura 33. Como un procedimiento de enriquecimiento y expansión de control, estas células se incubaron durante 6 días en medio de crecimiento completo suplementado con IL-7 e IL-15 (ambas a 10 ng/ml). Luego, las células se marcaron con anticuerpos contra el anti-CD 19 CAR y CD3 y se analizaron por citometría de flujo (Figura 34A). Las células que fueron electroporadas de manera simulada y transducidas de manera simulada mostraron bajos niveles de tinción de fondo en el cuadrante de CD3⁻/CAR⁺ (0,13 %). La población CD3⁻/CAR⁺ era esencialmente la misma en muestras que se electroporaron de manera simulada y luego se transdujeron con AAV o se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron de manera simulada (0,16 % y 0,55 %, respectivamente). Las células que se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE y se transdujeron de manera simulada tenían una población CD3⁻/CAR⁻ del 53,2 %, muy cerca de la cantidad teñida en la primera parte de este experimento que se muestra en la Figura 33B (56,7 %). Las células que se electroporaron con TRC 1-2x.87EE y se transdujeron con AAV mostraron 12,6 % de células CD3⁻/CAR⁺, casi idéntico al marcaje original de estas células que se muestra en la Figura 33 (13,4 %), lo que demuestra que la mezcla de IL-7 e IL-15 es insuficiente para enriquecer o expandir la población específica de células CD3⁻/CAR⁺.

Los presentes inventores buscaron a continuación enriquecer la población CD3⁻/CAR⁺ de una manera específica de antígeno incubando las 4 muestras descritas anteriormente con células IM-9, que presentan CD19 en la superficie celular. Las células IM-9 se inactivaron mediante pretratamiento con mitomicina C y se incubaron con muestras a una proporción de 1:1 durante 6 días en presencia de IL-7 e IL-15 (10 ng/ml). Las células se marcaron entonces con anticuerpos contra CD3 y el CAR anti-CD 19 y se analizaron por citometría de flujo (Figura 34B). Las células que se electroporaron de manera simulada y se transdujeron de manera simulada mostraron bajos niveles de tinción de fondo en el cuadrante CD3⁻/CAR⁺ (0,2 %). La población CD3⁻/CAR⁺ fue la misma en muestras que fueron electroporadas de manera simulada y luego transducidas con AAV (0,2 %) y ligeramente más altas en células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas de manera simulada (1,24 %). El aumento en las células CD3⁻/CAR⁺, el control de TRC 1-2x.87EE solo se considera de fondo ya que nunca se introdujo ácido nucleico de CAR en el sistema. Las células que se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE y se transdujeron de manera simulada tenían una población CD3⁻/CAR⁻ del 42,5 %, que es significativamente menor de lo que era antes de la expansión (56,7 %, Figura 33) lo que sugiere que las células CD⁺ pueden tener una ventaja de crecimiento en este sistema. Sin embargo, las células que fueron electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas con AAV mostraron el 49,9 % de células CD3⁻/CAR⁺, un aumento considerable en comparación con el marcaje original de esta células que se muestra en la Figura 33 (13,4 %), lo que demuestra que la incubación de esta muestra con células IM-9 en presencia de IL-7 e IL-15 es bastante eficaz para enriquecer y expandir la población CD3⁻/CAR⁺. La población CD3⁻/CAR⁺ también se expandió bajo estas condiciones, con la muestra electroporada de manera simulada/transducida con AAV y la muestra electroporada con TRC 1-2x.87EE/transducida con AV que muestra el 2,53 % y el 15,3 % de CD3⁺/CAR⁺, respectivamente.

En las células que se electroporaron con TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con AAV421, el 24,2 % de la población CD3⁻ era CAR⁺ antes de la expansión (Figura 33B). Después de la incubación en medio suplementado con IL-7 e IL-15, ese 25,3 % de las células CD3⁻ eran CAR⁺ (Figura 34A), lo que indica que la proporción entre la activación genética y la desactivación genética no cambió. Sin embargo, después de la incubación con células IM-9 además de IL-7 e IL-15, más del 80 % (80,35 %, Figura 34B) de las células CD3⁻ eran CAR⁺, lo que demuestra que la incubación con células IM-9 dio como resultado un enriquecimiento específico de antígeno.

Dado que la mitomicina C inactiva las células de manera muy potente y las células IM-9 no persistieron por mucho tiempo en el cultivo mixto, los presentes inventores razonaron que una segunda infusión de células IM-9 podría aumentar aún más el enriquecimiento de células CD3⁻/CAR⁺. Algunas de las células descritas anteriormente y mostradas en la Figura 34B se mezclarían con células IM-9 recientes (pretratadas con mitomicina C) en medio que contenía IL-7 e IL-15 y se incubaron otros 6 días. Luego, las células se tiñeron para CD3 y CAR anti-CD 19 y se analizaron por citometría de flujo (Figura 34C). El porcentaje de células CD3⁻/CAR⁺ en cualquiera de las muestras de

control permanecieron esencialmente sin cambios en comparación con la primera ronda de enriquecimiento en las células IM-9.

5 Sin embargo, las células que se electroporaron con TRC 1-2x.87EE y se transdujeron con AAV421 mostraron un enriquecimiento significativo de la población de CD3⁺/CAR⁺, aumentando desde el 49,9 % (después de la primera ronda si la incubación con células IM-9, Figura 34B) al 65,7 % (Figura 34C). Cabe destacar que, el 93,75 % de la población CD3⁺ era CAR⁺, lo que indica mayor expansión específica de antígeno.

3. Expresión del receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 en linfocitos T usando AAV422

10 También examinamos la expresión del CAR anti-CD19 a partir de células en las que se usó AAV422 para proporcionar el molde de HDR (descrito anteriormente, resultados de PCR mostrados en la Figura 32B). Aproximadamente 4 días después de la transducción, las células se marcaron con anticuerpos que reconocen el CAR anti-CD 19 o CD3 y se analizaron por citometría de flujo. La Figura 35A muestra gráficos de citometría de flujo para células que fueron electroporadas y transducidas con cantidades crecientes de AAV422, junto con células de control que fueron electroporadas de manera simulada y transducidas de manera simulada. Las células que se electroporaron por simulación y se transdujeron por simulación (MDI-0) fueron abrumadoramente CD3⁺/CAR⁻ (el cuadrante inferior derecho, 98,8 %). Las células que se electroporaron de manera simulada y luego se transdujeron con cantidades en aumento de AAV422 parecían esencialmente idénticas a las células de control, con las poblaciones de CD3⁺/CAR⁻ al 98,6 %, 98,6 %, 98,9 % y 98,4 %. Por lo tanto, el vector AAV422 solo no está impulsando niveles detectables de expresión de CAR, ni es capaz de alterar la expresión del receptor de linfocitos T.

20 La Figura 35B muestra gráficos de citometría de flujo para muestras que se electroporaron con ARNm TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron de manera simulada o las células que se electroporaron con TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV422. Las células que se electroporaron y luego se transdujeron de manera simulada muestran el 59,3 % de células CD3⁻, lo que indica la inactivación eficaz del complejo receptor de linfocitos T. El marcaje de fondo con el CAR anti-CD 19 era muy bajo, con el 1,47 % en la población CD3⁻ y el 0,52 % en la población CD3⁺. Las muestras que se electroporaron con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV422 mostraron cantidades significativas de marcaje de CAR en la población CD3⁻, que variaba del 14,7 % al 20,3 %. También hubo un ligero aumento en el marcaje de CAR en la población CD3⁺, que variaba del 2,3 % al 2,7 %.

30 Sorprendentemente, los presentes inventores observaron un aumento notable en la eficiencia de inactivación del receptor de linfocitos T en presencia de AAV422. La eficacia total de inactivación de CD3 con el aumento de AAV422 fue del 71,6 %, 74,9 %, 77,8 % y del 74,4 % en comparación con el 59,3 % en la electroporación de TRC 1-2x.87EE solo. Por el contrario, la eficacia total de eliminación de CD3 con el aumento de AAV421 fue del 56,99 %, 56,62 %, 57,4 % y del 55,4 % en comparación con el 57,18 % en la electroporación de TRC 1-2x.87EE solo (Figura 33B). Por lo tanto, parece que la electroporación con TRC 1-2x.87EE en presencia de genomas de AAV monocatenarios, pero no genomas de AAV autocomplementarios, da como resultado un aumento en la eficacia global de inactivación de la nucleasa TRC 1-2x.87EE. Debido a este aumento, el porcentaje de células CD3⁻ que son CAR⁺ no es significativamente diferente entre las células transducidas con AAV421 y AAV422 a pesar de los números más altos de células CD3⁺/CAR⁺. El porcentaje más alto de células CD3⁻ que eran CAR⁺ usando AAV421 fue del 24,18% (MDI = 3,13e⁴ genomas víricos/célula) en comparación con el 26,48 % con AAV422 (MDI = 1e⁵ genomas víricos/célula). Esta observación es particularmente interesante considerando la gran diferencia en MDI entre AAV421 y AAV422.

40 El concepto de utilizar células IM-9 para enriquecer específicamente las células CD3⁺/CAR⁺ se probó usando células de este experimento. De nuevo, en lugar de probar todo el panel, los presentes inventores solo intentaron enriquecer cualquiera de las células electroporadas de manera simulada y luego transducidas con AAV422 o electroporadas con TRC 1-2x.87EE y luego transducidas con AAV422 (2,5e⁴ genomas víricos/célula) en un nuevo experimento. La Figura 36A muestra gráficos de citometría de flujo aproximadamente el día 4 después de la transducción. Las células electroporadas/transducidas de manera simulada mostraron tinción de fondo de células CD3⁺/CAR⁺ al 0,13 %. En comparación, las células electroporadas con TRC 1-2x.87EE y transducidas con AAV422 mostraron el 4,44 % de células CD3⁺/CAR⁺. Las células se incubaron con células IM-9 (pretratadas con mitomicina) en presencia de IL-7 e IL-15 durante 6 días tal como se describió anteriormente, luego se analizaron por citometría de flujo. La Figura 36B muestra que la incubación con células IM-9 aumentó considerablemente la población de CD3⁺/CAR⁺ en células transducidas con AAV422 a 35,8 %. Las células CAR⁺ constituyen el 45,2 % del total de la población CD3⁺; en comparación con el 6,69 % antes del enriquecimiento (Figura 36A). Como en el caso anterior, los presentes inventores lo enriquecieron con una segunda adición de células IM-9 (Figura 36C). Dos rondas de incubación con células IM-9 dieron como resultado el 65,1 % de células CD3⁺/CAR⁺. Las células CAR⁺ constituyen el 78,25 % del total de la población CD3⁺, lo que indica un enriquecimiento significativo dependiente de antígeno de células CD3⁺/CAR⁺.

55 Estos datos, junto con los datos presentados anteriormente, demuestran claramente que las células que han tenido un gen CAR anti-CD 19 insertado en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2 se pueden enriquecer con éxito mediante incubación con células IM-9 en presencia de IL-7 e IL-15, y pueden dar como resultado una población CD3⁺ que supera el 90 % de CAR⁺ en tan solo 12 días de cultivo.

4. Aumento de la eficacia de inactivación observada cuando se utilizan vectores AAV de cadena sencilla

En el presente estudio, los presentes inventores siguen la observación de que los vectores AAV monocatenarios aumentaron la eficacia de inactivación de la nucleasa TRC 1-2x.87EE. En un primer experimento, las células se electroporaron con TRC 1-2x.87EE (2 µg) y se transdujeron de manera simulada o se transdujeron con cantidades crecientes de AAV412 (6,25e⁴, 1,25e⁴, 2,5e⁴ o 5e⁴ genomas víricos/célula). En el día 4 después de la transducción, las células se marcaron con un anticuerpo contra CD3 y se analizaron por citometría de flujo (Figura 37A). En las células transducidas de manera simulada, el 20,7 % son CD3⁻ en comparación con el 21,6 %, 23,7 %, 25,5 % y el 25 % con AAV412 en aumento, lo que indica que la eficiencia de inactivación de TRC 1-2x.87EE es hasta un 23 % mayor en presencia de AAV412 (el 25,5 % en comparación con el 20,7 %).

Para determinar si este aumento en la eficiencia de inactivación fue específica de la nucleasa, en un experimento adicional, las células se electroporaron con ARNm (2 µg) que codifica una nucleasa dirigida al gen de la β2-microglobulina y se transdujeron de manera simulada o se transdujeron con cantidades en aumento de AAV412. Las células se tiñeron para β2-microglobulina en el día 4 después de la transducción y se analizaron por citometría de flujo (Figura 37B). En las células transducidas de manera simulada, la eficiencia de inactivación de β2-microglobulina fue del 64,5% y aumentó en las células transducidas al 68,6%, 70,7 %, 77,2 % y al 82,5 % con cantidades crecientes de AAV412, lo que demuestra un aumento en la eficacia de eliminación de hasta el 27,9 % (el 82,5 % en comparación con el 64,5 %).

En un experimento paralelo, las células se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE y se transdujeron de manera simulada o se transdujeron con AAV422 (usando las mismas MDI que AAV412). Las células se marcaron con un anticuerpo contra CD3 y las células se analizaron por citometría de flujo (Figura 37C). Las células transducidas de manera simulada mostraron un 62,2 % de inactivación del receptor de linfocitos T, y con cantidades en aumento de AAV, la frecuencia de inactivación del receptor de linfocitos T aumentó al 72,6 %, 75,5 %, 78,3 % y 75,1 %. En este caso, la presencia de AAV422 aumenta la eficacia de inactivación de TRC 1-2x.87EE hasta en un 25,8 % (el 78,3 % en comparación con el 62,2 %). Llama la atención que el aumento en el porcentaje de eficacia de inactivación es casi idéntico entre estos tres experimentos, usando dos nucleasas diferentes y dos vectores AAV diferentes. Tomados en conjunto, estos datos indican fuertemente que la transducción de células con vectores AAV de cadena sencilla aumenta la eficacia de inactivación de nuestras nucleasas, independientemente de la carga de nucleasa o AAV.

5. Actividad de los linfocitos T que expresan receptor de antígeno quimérico anti-CD 19

Los experimentos anteriores demuestran claramente la generación de linfocitos T con CAR mediante electroporación de células con ARNm de TRC 1-2x.87EE, después, transducción inmediatamente de las células con AAV421, y que estas células se pueden enriquecer para una población CD3⁺/CAR⁺ por cocultivo con células IM-9 que expresan CD19. A continuación, los presentes inventores examinaron la actividad de estos linfocitos T con CAR contra las células diana. En el primer experimento, las células descritas anteriormente y mostradas en la Figura 34C se usaron en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma, en el que las células Raji CD19⁺ o las células U937 CD19⁻ fueron la población diana. Tal como se muestra en la Figura 38A, cuando los linfocitos T con CAR anti-CD 19 se incubaron con células U937, no secretaron IFN-gamma independientemente de la proporción dianas:efectoras. La incubación de linfocitos T con CAR con células Raji, sin embargo, dio como resultado altos niveles de secreción de IFN-gamma, de manera dependiente de la dosis, lo que indica que la secreción de IFN-gamma es específica de antígeno.

Estos linfocitos T con CAR también se usaron en un ensayo de destrucción celular en el que las células Raji marcadas con luciferasa eran la diana. Brevemente, los linfocitos T con CAR se incubaron con células Raji marcadas con luciferasa en una proporción de 10:1. En varios puntos de tiempo, las células se lavaron y se lisaron para medir la actividad de luciferasa como una medida de cuántas células quedaban. Las células de control mostraron una actividad de luciferasa mayor de 5500 unidades arbitrarias (Figura 38B). La incubación conjunta durante 2, 3, 4 y 5 horas dio como resultado una disminución de la actividad de luciferasa a 4598, 3292, 2750 y 1932 unidades arbitrarias, respectivamente. Por lo tanto, dentro de las 5 horas de la coincubación, la actividad de luciferasa se redujo aproximadamente un 65 %, lo que indica una fuerte actividad citolítica de los linfocitos T con CAR.

Tomados en conjunto, estos datos demuestran que los linfocitos T con CAR anti-CD 19 generados de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento son eficaces para destruir las células CD19⁺.

Ejemplo 7

ADN plasmídico linealizado

1. Expresión del receptor de antígeno quimérico a partir de ADN plasmídico linealizado

Dado que los moldes de HDR producidos por AAV son moléculas de ADN lineales, los presentes inventores hipotetizan que el ADN lineal de cualquier fuente puede ser un molde de HDR adecuado para insertar un gen de CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Para probar esto, los presentes inventores generaron varios plásmidos que contienen un gen de CAR anti-CD 19 flanqueado por brazos de homología que son homólogos al locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2. Se usaron diferentes promotores en algunos plásmidos, y los brazos de homología fueron "cortos" (200 pb en el brazo de homología 5' y 180 pb en el brazo de homología 3') para imitar los vectores AAV autocomplementados, o "largos" (985 pb en el brazo de homología 5' y 763 pb en el brazo de homología 3') para imitar los vectores AAV de cadena sencilla. Los plásmidos con brazos de homología cortos están marcados como "pDS" y

aquellos con brazos de homología largos están marcados como "pDI". Además, algunos plásmidos contenían un intrón aguas arriba del gen CAR.

Los plásmidos donadores de CAR se linealizaron en un sitio de restricción en el esqueleto del vector y se purificaron en gel. Los linfocitos T CD3⁺ se electroporaron con el plásmido donador de CAR linealizado solo (cantidades variables entre 500 ng y 1000 ng, dependiendo de la concentración del plásmido linealizado purificado), o se coelectroporaron con ARNm de TRC 1-2.87EE (2 µg). Como controles, las células se electroporaron de forma simulada o se electroporaron con TRC 1-2x.87EE solo. Los gráficos en la Figura 39 están marcados con descripciones para todas las electroporaciones. Aproximadamente 4 días después de la electroporación, las células se marcaron con anticuerpos contra CD3 y el CAR anti-CD 19 y se analizaron por citometría de flujo (Figura 39). La Figura 39A muestra la tinción de fondo de CD3⁺/CAR⁺ del 0,15 %. Cabe señalar que la tinción de fondo de CD3⁺/CAR⁺ fue inusualmente alta al 4,31 %. La Figura 39B muestra células que se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE solo, lo que demuestra un 60,8 % de inactivación de CD3. Las Figuras 39C y 39D representan muestras que se coelectroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE y el vector de brazo de homología larga con un promotor central EF1α con un potenciador HTLV o el vector de brazo de homología corto con promotor de núcleo EF1α (sin potenciador). Resulta interesante que, el donante de CAR linealizado con el promotor central EF1α solo generó una población de CD3⁺/CAR⁺ del 2,38 %, mientras que el vector que alberga el promotor central EF1α con el potenciador HTLV no generó un porcentaje significativo de células CD3⁺/CAR⁺. Las células que se electroporaron con estos dos vectores en ausencia de ARNm de TRC 1-2x.87EE no mostraron un aumento significativo en la población de CD3⁺/CAR⁺ (Figura 39E y 39F). El aumento en la población CD3⁺/CAR⁺ con el vector promotor central EF1α en presencia de TRC 1-2x.87EE sugirió que un plásmido linealizado podría servir como molde de HDR para reparar roturas de doble cadena en la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2.

Las Figuras 39G y 39H muestran dos construcciones de brazo de homología largo que contienen un promotor MND que impulsa la expresión del gen CAR. Una de estas construcciones, mostrada en la Figura 39G, también contiene un intrón en el extremo 5' del gen CAR. Sorprendentemente, el plásmido del brazo de homología larga con un promotor MND e intrón mostró una expresión CAR significativa (Figura 39G, 4,14 % de CD3⁺/CAR⁺) mientras que la construcción sin intrón (Figura 39H) no mostró una expresión CAR detectable cuando se electrolevó con ARNm de TRC 1-2x.87EE. Un plásmido del brazo de homología corto con el promotor MND, pero sin intrón, también se probó con ARNm de TRC 1-2x.87EE y no demostró ninguna expresión de CAR (Figura 39I). Ninguna de las construcciones que contienen promotores MND generó células CAR⁺ en ausencia de ARNm TRC 1-2x.87EE (Figuras 39J, 39K y 39L).

Por último en este experimento, los presentes inventores probaron una construcción de brazo de homología corto que contenía un promotor JeT que impulsaba la expresión del CAR y una construcción de brazo de homología "largo" con un promotor CMV que impulsaba la expresión del CAR. Solo, ninguno de estos plásmidos linealizados dio como resultado células CAR⁺ significativas (Figura 39O y 39P). Cuando las células se coelectroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87EE, la construcción que contiene JeT mostró el 2,69 % de células CD3⁺/CAR⁺ y la construcción que contiene CMV produjo el 2,7 % de células CD3⁺/CAR⁺.

Los gráficos de flujo que se muestran en la Figura 39 demuestran claramente que el ADN plasmídico linealizado que codifica el CAR, flanqueado por brazos de homología, puede servir como moldes de HDR para reparar roturas de ADN causadas por TRC 1-2x.87EE, dando como resultado la inserción del ácido nucleico CAR. Está claro que la fuerza del promotor juega un papel importante en la expresión del CAR, y algunos promotores impulsan una expresión más eficaz cuando hay un intrón en el gen.

Para confirmar que la inserción del CAR utilizando construcciones de ADN linealizadas era específica del locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2, los presentes inventores analizaron las células tal como se describió anteriormente utilizando cebadores que se ubicaron dentro del CAR y fuera de los brazos de homología (Figura 40, Tabla 11). Las muestras 1 y 2 son productos de PCR de células que se electroporaron de manera simulada o se electroporaron con solo ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE. De acuerdo con los resultados que se muestran anteriormente, no hay bandas de PCR presentes que indiquen la falta de gen CAR en el sitio de reconocimiento TRC 1-2. Las muestras 3, 4 y 5 provienen de células que se coelectroporaron con TRC 1-2x.87EE y un plásmido de homología de CAR linealizado (nombres de muestras en la Figura 40). Cada muestra presenta dos bandas de PCR del tamaño predicho que indica la inserción del casete de expresión del gen CAR en el sitio de reconocimiento TRC 1-2. Las muestras 6, 7 y 8 son de células que se electroporaron con los mismos plásmidos de homología de CAR linealizados que las muestras 3, 4 y 5 pero sin ARNm de TRC 1-2x.87EE. Como cabía esperar, no hay bandas de PCR presentes. Las muestras 9 y 10 son productos de PCR de células que fueron electroporadas de forma simulada o electroporadas con solo ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y no muestran bandas de PCR. Las muestras 11, 12, 13 y 14 provienen de células que se coelectroporaron con TRC 1-2x.87EE y un plásmido de homología de CAR linealizado (nombres de muestras en la Figura 40). Cada muestra presenta dos bandas de PCR del tamaño predicho que indica la inserción del gen CAR en el sitio de reconocimiento TRC 1-2. Las muestras 15, 16, 17 y 18 son de células que se electroporaron con los mismos plásmidos de homología CAR linealizados que las muestras 11, 12, 13 y 14 pero sin ARNm de TRC 1-2x.87EE. Como cabía esperar, no hay bandas de PCR presentes.

Las Figuras 39 y 40 demuestran claramente que la coelectroporación de los linfocitos T CD3⁺ humanos con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y un plásmido de homología CAR linealizado es un procedimiento eficaz para insertar el gen CAR en la secuencia de reconocimiento TRC 1-2.

Tabla 11.

Muestra	Nucleofección	Plásmido linealizado
1	Simulación (agua)	---
2	TRC1-2x87EE	---
3	TRC1-2x87EE	pDS EF1- α núcleo
4	TRC1-2x87EE	pDS 200 MND NC
5	TRC1-2x87EE	pDS 200 JET NC
6	Simulación (agua)	pDS EF1- α núcleo
7	Simulación (agua)	pDS 200 MND NC
8	Simulación (agua)	pDS 200 JET NC
9	Simulación (agua)	---
10	TRC1-2x87EE	---
11	TRC1-2x87EE	pDI EF1- α NC
12	TRC1-2x87EE	pDI MND intrón NC
13	TRC1-2x87EE	pDI MND NC
14	TRC1-2x87EE	pDI CMV 985 NC 763
15	Simulación (agua)	pDI EF1- α NC
16	Simulación (agua)	pDI MND intrón NC
17	Simulación (agua)	pDI MND NC
18	Simulación (agua)	pDI CMV 985 NC 763
19	Simulación (agua)	---
20	TRC1-2x87EE	---
21	TRC1-2x87EE	pDS MCS
22	Simulación (agua)	PDS MCS

Ejemplo 8Caracterización de vectores AAV adicionales1. Uso de AAV con promotor JeT y brazos largos de homología

- 5 Conjuntamente, los datos mostrados anteriormente indican que los vectores que utilizan el promotor JeT tienen una expresión alta y consistente del CAR y que los brazos de homología más largos pueden aumentar la eficacia de inserción de genes. Los presentes inventores diseñaron y generaron el vector que se muestra en la Figura 41 (SEQ ID NO:125), que se usó para hacer AAV de cadena sencilla con brazos de homología largos, y un promotor JeT que impulsa la expresión del CAR anti-CD19 (denominado en el presente documento AAV423). Se electroporaron linfocitos T CD3⁺ humanos con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y se transdujeron con cantidades crecientes de AAV423. Dado que los datos mostrados anteriormente sugieren que las MDI más altas pueden dar como resultado una mayor eficacia de inserción, los presentes inventores utilizaron títulos que van desde 1,875e⁴ a 1,5e⁵. Como controles, las células se electroporaron con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron de manera simulada o se electroporaron de manera simulada y se transdujeron con cantidades en aumento de AAV423. En el día 6 después de la transducción, las células se marcaron con anticuerpos que reconocen CD3 o el CAR anti-CD19 y se analizaron por citometría de flujo. Tal como se muestra en la Figura 42, las células que fueron electroporadas de manera simulada y luego transducidas con cantidades crecientes de AAV423 son abrumadoramente CD3⁺/CAR⁺ (que van del 96,6 % al 98,5 %). Las células que fueron electroporadas con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y transducidas de manera simulada fueron el 39 % CD3⁺, lo que indica la inactivación eficaz del receptor de linfocitos T. En estas células, la tinción CAR de fondo fue muy baja (alrededor del 2 %). Las células que se electroporaron con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y luego se transdujeron con cantidades crecientes de AAV423 mostraron una tinción CAR espectacular junto con la inactivación de CD3. Las poblaciones CD3⁺/CAR⁺ variaron del 21,6 % al 22,7 %, mientras

que las poblaciones CD3⁺/CAR⁺ fueron de alrededor del 2 %. Tal como se ha descrito anteriormente, la presencia de AAV de cadena simple aumentó la eficacia general de modificación génica en el sitio de reconocimiento TRC 1-2, con un total de las poblaciones CD3⁻ que aumentan del 41,44 % en las células de control al 57,6 %, 59,2 %, 58,7 % y 56,1 % en células que fueron electroporadas y luego transducidas con cantidades crecientes de AV423. El porcentaje de células CD3⁻ que eran CAR⁺ varió del 37,5 % al 39,9 %, lo que indica un aumento considerable en la eficacia de inserción en comparación con los datos descritos anteriormente.

Para confirmar que la inserción del CAR usando AAV423 era específica del locus de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2, los presentes inventores analizaron las células tal como se describió anteriormente utilizando cebadores que se ubicaron dentro del CAR y fuera de los brazos de homología (Figura 43, Tabla 12).

Tabla 12.

Muestra	Nucleofección	AAV (μl)	MDI
1	Simulación (agua)	---	---
2	Simulación (agua)	---	---
3	Simulación (agua)	pDI JET Prep A (3,125)	18750
4	Simulación (agua)	pDI JET Prep A (6,25)	37500
5	Simulación (agua)	pDI JET Prep A (12,5)	7500
6	Simulación (agua)	pDI JET Prep A (25)	150000
7	TRC1-2x87EE	---	---
8	TRC1-2x87EE	pDI JET Prep A (3,125)	18750
9	TRC1-2x87EE	pDI JET Prep A (6,25)	37500
10	TRC1-2x87EE	pDI JET Prep A (12,5)	7500
11	TRC1-2x87EE	pDI JET Prep A (25)	150000

Las muestras 1 y 2 son productos de PCR de células que se sometieron a electroporación de manera simulada. De acuerdo con los resultados que se muestran anteriormente, no hay bandas de PCR presentes que indiquen la falta de gen CAR en el sitio de reconocimiento TRC 1-2. Las muestras 3-6 son de células que fueron electroporadas de manera simulada y luego transducidas con cantidades crecientes de AAV423. De acuerdo con los resultados anteriores, no hay bandas de PCR presentes. La muestra 7 es de células electroporadas con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE, y luego transducidas de manera simulada y no muestra bandas de PCR. Las muestras 8-11 son de células electroporadas con ARNm que codifica TRC 1-2x.87EE y luego se transducen con cantidades crecientes de AAV423, y muestran las bandas de PCR esperadas si el CAR se inserta en la secuencia de reconocimiento de TRC 1-2.

Dada la capacidad de AAV423 para insertar la secuencia CAR en el sitio de reconocimiento TRC 1-2 después de la escisión, se prevé además que el plásmido AAV423 (Figura 41) podría linealizarse por digestión con a y administrarse a la célula por digestión con una o más enzimas de restricción, de modo que los linfocitos T se podrían transfectar con un molde de ADN linealizado que se podría integrar en el sitio de reconocimiento TRC 1-2 y codificar un CAR anti-CD 19.

Ejemplo 9

25 Eficacia *in vivo* de los linfocitos T CAR negativos para TCR anti-CD19

1. Modelo murino de linfoma diseminado de células B

La eficacia de los linfocitos T con CAR anti-CD 19 editados con genes se evaluó en un modelo murino de linfoma de células B diseminadas. Los linfocitos T activados se electroporaron con ARNm de TRC 1-2x.87 EE tal como se describió anteriormente, luego se transdujo con un vector AAV6 que comprende un casete de expresión de CAR anti-CD 19 dirigido por un promotor JeT y flanqueado por brazos de homología. Después de 5 días de cultivo con IL-2 (10 ng/ml), las células se analizaron para la expresión de CD3 en la superficie celular y CAR anti-CD 19 por citometría de flujo tal como se describió previamente (Figura 44A). Las células CD3⁻ se enriquecieron por el agotamiento de células CD3⁺ usando perlas magnéticas anti-CD3. Las células agotadas se cultivaron durante 3 días en IL-15 (10 ng/ml) e IL-21 (10 ng/ml) y se volvieron a analizar para determinar la expresión en la superficie celular de CD3 y CAR anti-CD 19 (Figura 44B). El aislamiento de la población CD3⁻ fue bastante eficaz, produciendo un 99,9 % de pureza tal como se mide por citometría de flujo después del agotamiento de células CD3⁺ (Figura 44B). La población CD3⁻ comprendió el 56 % de células CD4⁺ y el 44 % de CD8⁺ (Figura 44C), y tenían principalmente fenotipos de memoria central/memoria de transición, determinados por tinción para CD62L y CD45RO (Figura 44D).

Se llevaron a cabo estudios que utilizan el modelo de linfoma diseminado de Raji por Charles River Laboratories International Inc. (Morrisville, NC, EE.UU.). Las células Raji CD19+ que expresan luciferasa de luciérnaga (ffLuc)⁴⁴ de manera estable se inyectaron por vía i.v. en ratones hembra NSG de 5-6 semanas de vida el día 1, a una dosis de $2,0 \times 10^5$ células por ratón. El día 4, se inyectó a los ratones por vía i.v. con PBS o PBS que contenían linfocitos T con TCR KO de control editado de genes de las PBMC del mismo donante sano o PBS que contenía las dosis indicadas de linfocitos T con CAR preparados a partir del mismo donante. En los días indicados, los ratones vivos fueron inyectados por vía i.p. con sustrato de Luciferina (150 mg/kg en solución salina), anestesiados, y la actividad de luciferasa se midió después de 7 minutos usando IVIS SpectrumCT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Los datos se analizaron y se exportaron con el programa informático Living Image 4.5.1 (Perkin Elmer, Waltham, MA). La intensidad de la señal de luminiscencia está representada por la radiación en p/seg/ cm²/sr.

2. Resultados

Tal como se muestra en la Figura 45, el crecimiento de células Raji CD19+ fue evidente en todos los ratones a niveles bajos para el día 8, y aumentó significativamente en los grupos de control no tratados y de TCR⁻ para el día 11. En los grupos de control, se observó un crecimiento tumoral significativo en el día 15, y en el día 18 o 19 todos los grupos de control fueron sacrificados. Por el contrario, todos los grupos de ratones tratados con linfocitos T con CAR anti-CD 19 no mostraron evidencia de crecimiento tumoral para el día 11 y, con la excepción de un solo ratón en el grupo de dosis baja, permanecieron libres de tumor hasta el día 29 del estudio. El crecimiento tumoral se observó en tres ratones en la cohorte de dosis baja alrededor del día 36. Uno de los tres murió el día 42, aunque las imágenes revelaron solo bajos niveles de tumor en este animal, por lo tanto, es poco probable que la muerte esté relacionada con el tumor.

3. Conclusiones

Estos resultados proporcionan evidencia clara de la eliminación *in vivo* de células tumorales CD19+ por los linfocitos T con CAR de CD3⁻ de genes editados y apoyan el desarrollo preclínico adicional de esta plataforma para la terapia alogénica de linfocitos T con CAR.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nicholson, Michael G.
Smith, James J.
Jantz, Derek
Bartsevich, Victor
MacLeod, Daniel T.
<111> Antony, Jeyaraj

<120> MEGANUCLEASAS DISEÑADAS GENÉTICAMENTE CON SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO HALLADAS EN EL GEN DE LA REGIÓN CONSTANTE ALFA DEL RECEPTOR DE LINFOCITOS T HUMANOS

<130> 2000706.00180W01

<150> US 62/237.394
<151> 05/10/2015

<150> US 62/297.426
<151> 19/02/2016

<160> 125

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 4627
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 803 728 T3

atatccagaa ccctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt	60
ctgtctgcct attcaccgat tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg	120
atgtgtatat cacagacaaa actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca	180
gtgctgtggc ctggagcaac aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca	240
ttattccaga agacaccttc ttccccagcc caggtaaggg cagctttggt gccttcgcag	300
gctgtttcct tgcttcagga atggccaggt tctgcccaga gctctggtca atgatgtcta	360
aaactcctct gattggtggt ctcggcctta tccattgcca ccaaaaccct ctttttacta	420
agaaacagtg agccttgttc tggcagtcca gagaatgaca cgggaaaaaa gcagatgaag	480
agaaggtggc aggagagggc acgtggccca gcctcagtct ctccaactga gttcctgcct	540
gcctgccttt gctcagactg tttgcccctt actgctcttc taggcctcat tctaagcccc	600
ttctccaagt tgctctcct tatttctccc tgtctgccaa aaaatctttc ccagctcact	660
aagtcagtct cacgcagtca ctcatcacc caccaatcac tgattgtgcc ggcacatgaa	720
tgaccaggt gttgaagtgg aggaattaa aagtcagatg aggggtgtgc ccagaggaag	780
caccattcta gttgggggag cccatctgtc agctgggaaa agtccaaata acttcagatt	840
ggaatgtgtt ttaactcagg gttgagaaaa cagctacctt caggacaaaa gtcaggaag	900
ggctctctga agaaatgcta cttgaagata ccagccctac caagggcagg gagaggacct	960
tatagaggcc tgggacagga gctcaatgag aaaggagaag agcagcaggc atgagttgaa	1020

ES 2 803 728 T3

tgaaggaggc	agggccgggt	cacagggcct	tctaggccat	gagagggtag	acagtattct	1080
aaggacgcca	gaaagctggt	gatcggcttc	aagcagggga	gggacacct	atttgctttt	1140
cttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tgagatggag	ttttgctctt	gttgccagg	1200
ctggagtgca	atggtgcatc	ttggctcact	gcaacctccg	cctcccagg	tcaagtgatt	1260
ctcctgcctc	agcctcccga	gtagctgaga	ttacaggcac	ccgccaccat	gcctggctaa	1320
ttttttgtat	tttttagtaga	gacagggttt	cactatggtg	gccaggctgg	tctcgaactc	1380
ctgacctcag	gtgatccacc	cgcttcagcc	tcccaaagtg	ctgggattac	aggcgtgagc	1440
caccacaccc	ggcctgcttt	tcttaaagat	caatctgagt	gctgtacgga	gagtgggttg	1500
taagccaaga	gtagaagcag	aaagggagca	gttgcagcag	agagatgatg	gaggcctggg	1560
cagggtggtg	gcagggagg	aaccaacacc	attcaggttt	caaaggtaga	accatgcagg	1620
gatgagaaag	caaagagggg	atcaaggaag	gcagctggat	tttggcctga	gcagctgagt	1680
caatgatagt	gccgtttact	aagaagaaac	caaggaaaa	atttgggggtg	cagggatcaa	1740
aacttttttg	aacatatgaa	agtacgtggt	tatactcttt	atggcccttg	tcactatgta	1800
tgctcgtctg	cctccattgg	actctagaat	gaagccaggc	aagagcaggg	tctatgtgtg	1860
atggcacatg	tggccagggt	catgcaacat	gtactttgta	caaacagtgt	atattgagta	1920
aatagaaatg	gtgtccagga	gccgagggtat	cggtcctgcc	agggccaggg	gctctcccta	1980
gcaggtgctc	atatgctgta	agttccctcc	agatctctcc	acaaggaggc	atggaaaggc	2040
tgtagttggt	cacctgcca	agaactagga	ggtctgggg	gggagagtca	gcctgctctg	2100
gatgctgaaa	gaatgtctgt	ttttcctttt	agaaagttcc	tgtgatgtca	agctggctga	2160
gaaaagcttt	gaaacaggta	agacaggggt	ctagcctggg	tttgcacagg	attgcggaag	2220
tgatgaaccc	gcaataaccc	tgcttgatg	agggagtggg	aagaaattag	tagatgtggg	2280
aatgaatgat	gaggaatgga	aacagcggtt	caagacctgc	ccagagctgg	gtggggctctc	2340
tcctgaatcc	ctctcaccat	ctctgacttt	ccattctaag	cactttgagg	atgagtttct	2400
agcttcaata	gaccaaggac	tctctcctag	gcctctgtat	tcctttcaac	agctccactg	2460
tcaagagagc	cagagagagc	ttctgggtgg	cccagctgtg	aaatttctga	gtcccttagg	2520
gatagcccta	aacgaaccag	atcatcctga	ggacagccaa	gaggttttgc	cttctttcaa	2580
gacaagcaac	agtactcaca	taggctgtgg	gcaatggtcc	tgtctctcaa	gaatcccctg	2640
ccactcctca	caccaccct	gggcccata	tcatttccat	ttgagttggt	cttattgagt	2700
catccttct	gtggtagcgg	aactcactaa	ggggcccatc	tggaccgag	gtattgtgat	2760
gataaattct	gagcacctac	cccatccca	gaagggtca	gaaataaaat	aagagccaag	2820
tctagtcggt	gtttcctgtc	ttgaaacaca	atactgttgg	ccctggaaga	atgcacagaa	2880

ES 2 803 728 T3

tctgtttgta aggggatatg cacagaagct gcaagggaca ggaggtgcag gagctgcagg 2940
cctccccac ccagcctgct ctgccttggg gaaaaccgtg ggtgtgtcct gcaggccatg 3000
caggcctggg acatgcaagc ccataaccgc tgtggcctct tggttttaca gatacgaacc 3060
taaactttca aaacctgtca gtgattgggt tccgaatcct cctcctgaaa gtggccgggt 3120
ttaatctgct catgacgctg cggctgtggt ccagctgagg tgaggggcct tgaagctggg 3180
agtggggttt agggacgcyg gtctctgggt gcacctaag ctctgagagc aaacctcct 3240
gcagggtcct gcttttaagt ccaaagcctg agcccaccaa actctcctac ttcttcctgt 3300
tacaaattcc tcttgtgcaa taataatggc ctgaaacgct gtaaaatata ctcatttcag 3360
ccgcctcagt tgcacttctc ccctatgagg taggaagaac agttgtttag aaacgaagaa 3420
actgaggccc cacagctaat gagtggagga agagagacac ttgtgtacac cacatgcctt 3480
gtgttgact tctctcaccg tgtaacctcc tcatgtcctc tctccccagt acggctctct 3540
tagctcagta gaaagaagac attacactca tattacaccc caatcctggc tagagtctcc 3600
gcacctcct cccccagggt ccccagtcgt cttgtgaca actgcacctc gttccatcac 3660
catcaaaaaa aaactccagg ctgggtgcgg gggctcacac ctgtaatccc agcactttgg 3720
gaggcagagg caggaggagc acaggagctg gagaccagcc tgggcaacac agggagaccc 3780
cgcctctaca aaaagtgaaa aaattaacca ggtgtggtgc tgcacacctg tagtcccagc 3840
tacttaagag gctgagatgg gaggatcgt tgagccctgg aatggtgagg ctacaatgag 3900
ctgtgattgc gtcactgcac tccagcctgg aagacaaagc aagatcctgt ctcaaataat 3960
aaaaaaaaata agaactccag ggtacatttg ctctagaac tctaccacat agccccaaac 4020
agagccatca ccatcacatc cctaacagtc ctgggtcttc ctcagtgtcc agcctgactt 4080
ctgttcttcc tcattccaga tctgcaagat tgtaagacag cctgtgctcc ctogctcctt 4140
cctctgcatt gccctcttc tccctctcca aacagaggga actctcctac cccaaggag 4200
gtgaaagctg ctaccacctc tgtgcccccc cggcaatgcc accaactgga tctaccoga 4260
atztatgatt aagattgctg aagagctgcc aaactctgct gccacccct ctgttccctt 4320
attgctgctt gtcactgcct gacattcacg gcagaggcaa ggctgctgca gcctcccctg 4380
gctgtgcaca ttccctcctg ctcccagag actgcctccg ccatcccaca gatgatggat 4440
cttcagtggg ttctcttggg ctctaggtcc tgcagaatgt tgtgaggggt ttatTTTTTT 4500
ttaatagtgt tcataaagaa atacatagta ttcttcttct caagacgtgg ggggaaatta 4560
tctcattatc gaggccctgc tatgctgtgt atctgggcgt gttgtatgtc ctgctgccga 4620
tgccttc 4627

<210> 2
<211> 142

ES 2 803 728 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
1 5 10 15

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
20 25 30

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
35 40 45

Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
50 55 60

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
65 70 75 80

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
85 90 95

Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn
100 105 110

Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val
115 120 125

Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
130 135 140

5 <210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 3
tggcctggag caacaaatct ga 22

<210> 4
<211> 22
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 4
acaaatgtgt cacaaagtaa gg 22

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 5
ctgatgtga tatcacagac aa 22

<210> 6

ES 2 803 728 T3

<211> 163
 <212> PRT
 <213> Chlamydomonas reinhardtii
 <400> 6

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Ile Ala Gln Ile Lys Pro Asn Gln Ser
 20 25 30
 Tyr Lys Phe Lys His Gln Leu Ser Leu Ala Phe Gln Val Thr Gln Lys
 35 40 45
 Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60
 Gly Tyr Val Arg Asp Arg Gly Ser Val Ser Asp Tyr Ile Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Trp Arg Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys
 145 150 155 160

5 Ser Ser Pro

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Chlamydomonas reinhardtii

10 <400> 7

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly
 1 5

<210> 8
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>

ES 2 803 728 T3

<223> Sintetizado

<400> 8

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg
 20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val

ES 2 803 728 T3

195		200		205											
Asp 210	Gly	Asp 210	Gly	Ser	Ile	Tyr 215	Ala	Cys	Ile	Ala	Pro 220	Arg	Gln	Gly	Ser
Lys 225	Phe	Lys	His	Arg	Leu 230	Lys	Leu	Gly	Phe	Ala 235	Val	Gly	Gln	Lys	Thr 240
Gln	Arg	Arg	Trp	Phe 245	Leu	Asp	Lys	Leu	Val 250	Asp	Glu	Ile	Gly	Val 255	Gly
Tyr	Val	Tyr	Asp 260	Arg	Gly	Ser	Val	Ser	Glu 265	Tyr	Val	Leu	Ser	Glu	Ile
Lys	Pro	Leu 275	His	Asn	Phe	Leu	Thr 280	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe 285	Leu	Lys	Leu
Lys	Gln 290	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu 295	Val	Leu	Lys	Ile	Ile 300	Glu	Gln	Leu	Pro
Ser 305	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp 310	Lys	Phe	Leu	Glu 315	Val	Cys	Thr	Trp	Val 320
Asp	Gln	Ile	Ala	Ala 325	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys 330	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr 335	Ser
Glu	Thr	Val	Arg 340	Ala	Val	Leu	Asp	Ser 345	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys 350	Lys	Ser

Ser Pro

<210> 9
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 9

Met 1	Asn	Thr	Lys	Tyr 5	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu 10	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly 15	Phe
Val	Asp	Gly	Asp 20	Gly	Ser	Ile	Phe	Ala 25	Ser	Ile	Tyr	Pro	His 30	Gln	Arg
Ala	Lys	Phe 35	Lys	His	Phe	Leu	Lys 40	Leu	Thr	Phe	Ala	Val 45	Tyr	Gln	Lys

ES 2 803 728 T3

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser
 210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

ES 2 803 728 T3

290

295

300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350

Ser Pro

- <210> 10
- <211> 354
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizado
- <400> 10

5

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg
20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

ES 2 803 728 T3

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser
210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr
225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile
260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350

Ser Pro

<210> 11
<211> 354
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintetizado

<400> 11

ES 2 803 728 T3

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg
20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser
210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr
225 230 235 240

ES 2 803 728 T3

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 12

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 12

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Tyr Pro His Gln Arg
 20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Leu Leu Lys Leu Val Phe Ala Val His Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln
 65 70 75 80

ES 2 803 728 T3

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser
210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr
225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile
260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335

ES 2 803 728 T3

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 13
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 13

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Tyr Pro Asp Gln Arg
 20 25 30

Thr Lys Phe Lys His Gly Leu Arg Leu Asn Phe Ser Val Phe Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Phe Asp Ala Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175

ES 2 803 728 T3

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser
 210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 14

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 14

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

ES 2 803 728 T3

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Thr Ile His Pro Asp Gln Arg
 20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Tyr Leu Arg Leu Phe Phe Ser Val Phe Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ala Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Thr Ile Ala Pro Cys Gln Arg Ala
 210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Thr Val Gly Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

His Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile
 260 265 270

ES 2 803 728 T3

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 15
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 15

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Gln Ile Lys Pro Asp Gln Lys
 20 25 30

Met Lys Phe Lys His Tyr Leu Ser Leu His Phe Ser Val Phe Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

ES 2 803 728 T3

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Gln Ile Lys Pro Gln Gln Arg Ala
 210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Leu Leu Ala Phe Thr Val Ser Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Ile Asp Arg Gly Gly Val Ser Glu Tyr Ile Leu Ser Glu Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 16
 <211> 354
 <212> PRT

ES 2 803 728 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 16

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1          5          10          15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Asn Pro Asp Gln Arg
      20          25          30

Ala Lys Phe Lys His Ser Leu Lys Leu Thr Phe Ser Val Tyr Gln Lys
      35          40          45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50          55          60

Gly Tyr Val Tyr Asp Thr Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln
65          70          75          80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
      85          90          95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
      100          105          110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
      115          120          125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
      130          135          140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145          150          155          160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
      165          170          175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
      180          185          190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
      195          200          205

```

ES 2 803 728 T3

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Ser Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ser
 210 215 220

Lys Phe Lys His Lys Leu Gly Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 17

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 17

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg
 20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val

ES 2 803 728 T3

50						55										60
Gly	Tyr	Val	Tyr	Asp	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	Arg	Leu	Ser	Gln	
65					70					75					80	
Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	
				85					90					95		
Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	
			100					105					110			
Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	
		115					120						125			
Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	
	130					135					140					
Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	Val	Gly	
145					150					155					160	
Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	
				165					170					175		
Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	
			180					185					190			
Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe	Val	
		195					200					205				
Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Tyr	Ala	Cys	Ile	Ala	Pro	Arg	Gln	Gly	Ser	
	210					215					220					
Lys	Phe	Lys	His	Arg	Leu	Lys	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Gly	Gln	Lys	Thr	
225					230					235					240	
Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val	Gly	
				245					250					255		
Tyr	Val	Tyr	Asp	Arg	Gly	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	Val	Leu	Ser	Gln	Ile	
			260					265					270			
Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu	
		275					280					285				
Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro	
	290					295					300					

ES 2 803 728 T3

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350

Ser Pro

<210> 18

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 18

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Asp Gln Arg
20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Tyr Leu Arg Leu Gln Phe Ser Val Phe Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Phe Asp Ala Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly

ES 2 803 728 T3

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly
20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Thr Ile Tyr Pro Asp Gln Arg Ala
210 215 220

Lys Phe Lys His Ala Leu Lys Leu Ile Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr
225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly

ES 2 803 728 T3

245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Gly Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350

Ser Pro

<210> 20
<211> 354
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado

<400> 20

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Thr Ile Arg Pro Ala Gln Arg
20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Arg Leu Val Leu Gly Phe Glu Val Gly Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Gly Gly Ser Val Ser Lys Tyr Arg Leu Ser Gln
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

ES 2 803 728 T3

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Thr Ile Ala Pro Asp Gln Arg Pro
 210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Ile Phe Asn Val Cys Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Thr Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser

340

345

350

Ser Pro

5

<210> 21
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 21

Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe
1				5					10					15	
Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Tyr	Ala	Cys	Ile	Ala	Pro	Arg	Gln	Gly
			20					25					30		
Ser	Lys	Phe	Lys	His	Arg	Leu	Lys	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Gly	Gln	Lys
		35					40					45			
Thr	Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val
	50					55					60				
Gly	Tyr	Val	Tyr	Asp	Arg	Gly	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	Val	Leu	Ser	Gln
65				70						75					80
Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys
				85					90					95	
Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu
			100					105					110		
Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp
		115					120					125			
Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr
	130					135					140				
Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	Val	Gly
145				150						155					160
Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser
				165					170					175	
Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser
			180					185					190		

ES 2 803 728 T3

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala
 210 215 220

Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 22

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 22

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly
 20 25 30

ES 2 803 728 T3

Ser Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Thr Ile Val Pro Glu Gln Arg Ser
210 215 220

Lys Phe Lys His Tyr Leu Lys Leu Thr Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr
225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Arg Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Ala Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285

ES 2 803 728 T3

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 23
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 23

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly
 20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

ES 2 803 728 T3

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Thr Ile Phe Pro Asp Gln Arg Met
 210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu His Phe Cys Val His Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 24
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 803 728 T3

<220>

<223> Sintetizado

<400> 24

Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe
1				5					10					15	
Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ile	Ala	Pro	Cys	Gln	Arg
			20					25					30		
Ala	Lys	Phe	Lys	His	Arg	Leu	Lys	Leu	Gly	Phe	Thr	Val	Gly	Gln	Lys
		35					40					45			
Thr	Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val
	50					55					60				
Gly	His	Val	Tyr	Asp	Arg	Gly	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	Val	Leu	Ser	Gln
65					70					75					80
Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys
				85					90					95	
Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu
			100					105					110		
Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp
		115					120					125			
Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr
	130					135					140				
Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	Val	Gly
145					150					155					160
Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser
				165					170					175	
Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser
			180					185					190		
Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe	Val
		195					200					205			
Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Tyr	Pro	His	Gln	Arg	Ala
	210					215					220				

ES 2 803 728 T3

Lys Phe Lys His Phe Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr
225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350

Ser Pro

- <210> 25
- <211> 354
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Sintetizado

<400> 25

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly
20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

ES 2 803 728 T3

Gly Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln
 65 70 75 80

 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160

 Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175

 Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190

 Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205

 Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Thr Ile Phe Pro Asp Gln Arg Met
 210 215 220

 Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu His Phe Cys Val His Gln Lys Thr
 225 230 235 240

 Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

 Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
 260 265 270

 Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

 Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

 Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

ES 2 803 728 T3

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 26
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 26

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly
 20 25 30

Ser Lys Phe Lys His Arg Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160

ES 2 803 728 T3

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Phe Ala Thr Ile Phe Pro Asp Gln Arg Met
 210 215 220

Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu His Phe Cys Val His Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

<210> 27

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 27

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe

ES 2 803 728 T3

1				5						10					15
Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Tyr	Ala	Cys	Ile	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly
			20					25					30		
Ser	Lys	Phe	Lys	His	Arg	Leu	Lys	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Gly	Gln	Lys
		35					40					45			
Thr	Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val
	50					55					60				
Gly	Tyr	Val	Tyr	Asp	Arg	Gly	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	Val	Leu	Ser	Glu
65					70					75					80
Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys
				85					90					95	
Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu
			100					105					110		
Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp
		115					120					125			
Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr
	130					135					140				
Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	Val	Gly
145					150					155					160
Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser
				165					170					175	
Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser
			180					185					190		
Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe	Val
		195					200					205			
Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Phe	Ala	Thr	Ile	Phe	Pro	Asp	Gln	Arg	Met
	210					215					220				
Lys	Phe	Lys	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	His	Gln	Lys	Thr
225					230					235					240
Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val	Gly
				245					250					255	

ES 2 803 728 T3

Tyr Val Tyr Asp Arg Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350

Ser Pro

- <210> 28
- <211> 354
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizado
- <400> 28

5

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Thr Ile Cys Pro Cys Gln Thr
 20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Tyr Leu Thr Leu Ser Phe Ser Val Tyr Gln Lys
 35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Gln Gly Ser Val Ser Cys Tyr Arg Leu Ser Gln
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu

ES 2 803 728 T3

<210> 29
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 29

```

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
 1          5          10          15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Thr Ile Cys Pro Asp Gln Ala
 20          25          30

Leu Lys Phe Lys His Tyr Leu Ser Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys
 35          40          45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50          55          60

Gly Tyr Val Tyr Asp Gln Gly Ser Val Ser Cys Tyr Arg Leu Ser Gln
 65          70          75          80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85          90          95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100         105         110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115         120         125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130         135         140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145         150         155         160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165         170         175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180         185         190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
    
```

ES 2 803 728 T3

195		200		205											
Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	His	Ala	Cys	Ile	Gln	Pro	Met	Gln	Ser	Met
210						215					220				
Lys	Phe	Lys	His	Tyr	Leu	His	Leu	Arg	Phe	Thr	Val	His	Gln	Lys	Thr
225					230					235					240
Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Thr	Gly	Val	Gly
				245					250					255	
Tyr	Val	Tyr	Asp	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Thr	Tyr	Cys	Leu	Ser	Gln	Ile
			260					265						270	
Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu
		275					280					285			
Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro
	290					295					300				
Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val
305					310					315					320
Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	Ser
				325					330					335	
Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Lys	Ser
			340					345					350		

Ser Pro

<210> 30
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 30

Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe
1				5					10					15	
Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Tyr	Ala	Cys	Ile	Thr	Pro	Gln	Gln	Asp
			20					25					30		
Met	Lys	Phe	Lys	His	Arg	Leu	Gln	Leu	Arg	Phe	Cys	Val	Thr	Gln	Lys
		35					40					45			

ES 2 803 728 T3

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
 50 55 60

Gly Tyr Val Gln Asp Cys Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Val Ala Ser Ile Lys Pro Gln Gln Val Ala
 210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Met Leu Glu Phe Tyr Val Tyr Gln Lys Thr
 225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255

Tyr Val Tyr Asp Leu Gly Gly Ala Ser Arg Tyr Val Leu Ser Gln Ile
 260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro

ES 2 803 728 T3

290

295

300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350

Ser Pro

<210> 31

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 31

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro Asp Gln Ala
20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Arg Leu Leu Leu Glu Phe Thr Val Cys Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Val Asp Gln Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

ES 2 803 728 T3

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Thr Pro Gln Gln Asp Met
210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Gln Leu Arg Phe Cys Val Thr Gln Lys Thr
225 230 235 240

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
245 250 255

Tyr Val Gln Asp His Gly Gly Ala Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile
260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350

Ser Pro

<210> 32
<211> 354
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintetizado

<400> 32

ES 2 803 728 T3

Met Asn Thr Lys Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe
1 5 10 15

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Trp Ala Ser Ile Arg Pro Thr Gln Leu
20 25 30

Ala Lys Phe Lys His Ala Leu Trp Leu Gly Phe Ala Val Tyr Gln Lys
35 40 45

Thr Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val
50 55 60

Gly Tyr Val Tyr Asp Ser Gly Ser Val Ser Lys Tyr Thr Leu Ser Glu
65 70 75 80

Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
85 90 95

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
100 105 110

Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
115 120 125

Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
130 135 140

Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
145 150 155 160

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
165 170 175

Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
180 185 190

Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
195 200 205

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Thr Pro Gln Gln Asp Met
210 215 220

Lys Phe Lys His Arg Leu Gln Leu Arg Phe Cys Val Thr Gln Lys Thr
225 230 235 240

ES 2 803 728 T3

Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
245 250 255

Tyr Val Gln Asp Lys Gly Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile
260 265 270

Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
275 280 285

Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
290 295 300

Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
305 310 315 320

Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
325 330 335

Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
340 345 350

Ser Pro

- <210> 33
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Sintetizado

<400> 33

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

ES 2 803 728 T3

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 34
<211> 147
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintetizado

<400> 34

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

ES 2 803 728 T3

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 35
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 35

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

10 <210> 36
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 36

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 37
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 37

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

ES 2 803 728 T3

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 38

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 38

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 39
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 5
- <220>
- <223> Sintetizado
- <400> 39

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Ala Pro Cys Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Thr Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly His Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 40
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 40

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Gln Ile Lys Pro Gln Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Leu Leu Ala Phe Thr Val Ser Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ile Asp Arg
 50 55 60

Gly Gly Val Ser Glu Tyr Ile Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 41
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Sintetizado

<400> 41

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ser Ile Arg Pro Ser Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Lys
20 25 30

Leu Gly Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 42
<211> 147
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintetizado

<400> 42

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

ES 2 803 728 T3

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 43

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Sintetizado

<400> 43

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

ES 2 803 728 T3

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 44
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 44

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

10

ES 2 803 728 T3

<210> 45
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 45

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Arg Pro Ala Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Val Leu Gly Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Gly
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Lys Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

10 <210> 46
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

15 <400> 46

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 47
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 47

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15
 Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30
 Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45
 Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60
 Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80
 Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110
 Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp
 145

<210> 48
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 48

5

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser

100

105

110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 49
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizado
- <400> 49

5

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Ala Pro Cys Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Thr Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly His Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 50
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 50

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Arg Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 51
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Sintetizado

<400> 51

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser

ES 2 803 728 T3

1				5						10					15
Ile	Tyr	Ala	Cys	Ile	Ala	Pro	Arg	Gln	Gly	Ser	Lys	Phe	Lys	His	Arg
			20					25					30		
Leu	Lys	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Gly	Gln	Lys	Thr	Gln	Arg	Arg	Trp	Phe
		35					40					45			
Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val	Gly	Tyr	Val	Tyr	Asp	Arg
	50					55					60				
Gly	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	Val	Leu	Ser	Glu	Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn
65					70					75					80
Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala
				85					90					95	
Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser
			100					105					110		
Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala
		115					120					125			
Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala
	130					135					140				
Val	Leu	Asp													
145															

<210> 52
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 52

5

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Gly Gln Gly Ser Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Lys Leu Gly Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 53
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 53

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Cys Pro Cys Gln Thr Leu Lys Phe Lys His Tyr
 20 25 30

Leu Thr Leu Ser Phe Ser Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Gln
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Cys Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 54
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 54

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Cys Pro Asp Gln Ala Leu Lys Phe Lys His Tyr
 20 25 30

Leu Ser Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Gln
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Cys Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 55
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 55

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Thr Pro Gln Gln Asp Met Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Gln Leu Arg Phe Cys Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Gln Asp Cys
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 56
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Sintetizado

<400> 56

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

ES 2 803 728 T3

Ile Tyr Ala Cys Ile Thr Pro Gln Gln Asp Met Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Gln Leu Arg Phe Cys Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Gln Asp His
50 55 60

Gly Gly Ala Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

- <210> 57
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizado
- <400> 57

5

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Thr Pro Gln Gln Asp Met Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Gln Leu Arg Phe Cys Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Gln Asp Lys
50 55 60

ES 2 803 728 T3

Gly Ser Ala Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 58

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 58

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe
 20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 59
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 59

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe
 20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 60
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 60

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe
 20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 61
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Sintetizado

<400> 61

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Leu
 20 25 30

Leu Lys Leu Val Phe Ala Val His Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ala
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 63
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizado
- <400> 63

5

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Tyr Pro Asp Gln Arg Thr Lys Phe Lys His Gly
 20 25 30

Leu Arg Leu Asn Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Phe Asp Ala
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 64

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 64

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile His Pro Asp Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Tyr
 20 25 30

Leu Arg Leu Phe Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ala
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 65
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 65

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Gln Ile Lys Pro Asp Gln Lys Met Lys Phe Lys His Tyr
 20 25 30

Leu Ser Leu His Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Gly
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 66
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 66

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Asn Pro Asp Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Ser
 20 25 30

ES 2 803 728 T3

Leu Lys Leu Thr Phe Ser Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Thr
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 67

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 67

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe
20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

ES 2 803 728 T3

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Arg Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 68

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 68

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Ala Pro Asp Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Tyr
 20 25 30

Leu Arg Leu Gln Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Phe Asp Ala
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 69
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizado
- <400> 69

5

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Tyr Pro Asp Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Ala
 20 25 30

Leu Lys Leu Ile Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Gly
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 70
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 70

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Ala Pro Asp Gln Arg Pro Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Ile Phe Asn Val Cys Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Thr
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 71
<211> 147
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintetizado

<400> 71

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe
20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Val Pro Glu Gln Arg Ser Lys Phe Lys His Tyr
 20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ser Val Phe Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Arg Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ala
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 73

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 73

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Phe Pro Asp Gln Arg Met Lys Phe Lys His Gln
 20 25 30

Leu Arg Leu His Phe Cys Val His Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 74
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizado
- <400> 74

5

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Tyr Pro His Gln Arg Ala Lys Phe Lys His Phe
 20 25 30

Leu Lys Leu Thr Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 75
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 75

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Phe Pro Asp Gln Arg Met Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu His Phe Cys Val His Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 76
<211> 147
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintetizado

<400> 76

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Phe Pro Asp Gln Arg Met Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu His Phe Cys Val His Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

ES 2 803 728 T3

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 77

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Sintetizado

<400> 77

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Phe Pro Asp Gln Arg Met Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Gly Phe Ala Val His Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Arg
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

ES 2 803 728 T3

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
130 135 140

Val Leu Asp
145

<210> 78

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 78

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile His Ala Cys Ile Gln Pro Gln Gln Asp Val Lys Phe Lys His Gln
 20 25 30

Leu His Leu Arg Phe Thr Val His Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ala
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Thr Tyr Cys Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp

145

- <210> 79
- <211> 147
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizado
- <400> 79

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile His Ala Cys Ile Gln Pro Met Gln Ser Met Lys Phe Lys His Tyr
 20 25 30

Leu His Leu Arg Phe Thr Val His Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Thr Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ala
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Thr Tyr Cys Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

<210> 80
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 80

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Val Ala Ser Ile Lys Pro Gln Gln Val Ala Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Met Leu Glu Phe Tyr Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Leu
 50 55 60

Gly Gly Ala Ser Arg Tyr Val Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 81
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

5

- <220>
- <223> Sintetizado

<400> 81

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Lys Pro Asp Gln Ala Ala Lys Phe Lys His Arg
 20 25 30

Leu Leu Leu Glu Phe Thr Val Cys Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Val Asp Gln
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

- <210> 82
- <211> 147
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintetizado
- <400> 82

5

ES 2 803 728 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Ile Trp Ala Ser Ile Arg Pro Thr Gln Leu Ala Lys Phe Lys His Ala
 20 25 30

Leu Trp Leu Gly Phe Ala Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
 50 55 60

Gly Ser Val Ser Lys Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110

Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125

Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140

Val Leu Asp
 145

5 <210> 83
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 83
 accggacctc gttgttaga ct 22

 10 <210> 84
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 84
 tgtttacaca gtgttcatt cc 22

 15 <210> 85
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 85
 gactacacat atagtgctg tt 22

 20 <210> 86
 <211> 72

ES 2 803 728 T3

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 86
 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaca aatctgactt tgcattgtgca 60
 aacgccttca ac 72
 5 <210> 87
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Sintetizado
 <400> 87
 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaat ctgactttgc atgtgcaaac 60
 gccttcaac 69
 <210> 88
 <211> 55
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 88
 20 atggacttca agagcaacaa acaaatctga cttgcatgt gcaaacgcct tcaac 55
 <210> 89
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 89
 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagaatct gactttgcat gtgcaaacgc 60
 cttcaac 67
 <210> 90
 <211> 65
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 90
 35 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagtctga ctttgcattgt gcaaacgcct 60
 tcaac 65
 <210> 91
 <211> 52
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

ES 2 803 728 T3

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 91
 atggacttca agagcaaaca aatctgactt tgcatgtgca aacgcctca ac 52

5 <210> 92
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 92

atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagacaaa tctgactttg catgtgcaaa 60

cgccttcaac 70

15 <210> 93
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 93

atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaatc tgactttgca tgtgcaaacg 60

ccttcaac 68

20 <210> 94
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 94

atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaacg caacaaatct gactttgcat 60

gtgcaaacgc cttcaac 77

30 <210> 95
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

35 <400> 95

atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaag aacaaatctg actttgcatg 60

tgcaaacgcc ttcaac 76

<210> 96
 <211> 70
 <212> ADN

ES 2 803 728 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 96

5 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggcaacaaa tctgactttg catgtgcaaa 60
 cgccttcaac 70

<210> 97
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 97

atggacttca agagcaacag tgctgtggca aatctgactt tgcattgtgca aacgccttca 60
 ac 62

<210> 98
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintetizado

20 <400> 98

atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggacaaatc tgactttgca tgtgcaaacg 60
 ccttcaac 68

<210> 99
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 99

atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaat ctgactttgc atgtgcaaac 60
 gccttcaac 69

<210> 100
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintetizado

35 <400> 100
 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaatg tgcaaaccgc ttcaac 56
 <210> 101

ES 2 803 728 T3

<211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Sintetizado

 <400> 101

 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggacaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac 60

 gccttcaac 69

 <210> 102
 <211> 71
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintetizado

 <400> 102

 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaciaa atctgacttt gcatgtgcaa 60

 acgccttcaa c 71
 15

 <210> 103
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sintetizado

 <400> 103
 atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaatg tgcaaacgcc ttcaac 56

 <210> 104
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado

 <400> 104
 atcaaatctg acttgcatg tgcaaacgcc ttcaac 36
 30

 <210> 105
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 105
 gtgctgtggc ctggagcaac aaatctgact ttgc 34

 <210> 106
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sintetizado

 <400> 106

ES 2 803 728 T3

gtgctgtggc ctggagcaag aattcatgcg gccgcaatct agagcaaca atctgacttt 60

gc 62

<210> 107

<211> 6053

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 107

ES 2 803 728 T3

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag 60
 cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120
 gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
 agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
 acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaac 300
 acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360
 agctcccgct ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
 gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgtt ttcttccctt cttttctcgc 540
 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttag ggttccgatt 600
 tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
 gccatcgcgc tgatagacgg tttttcgcgc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 720
 tggactcttg ttccaaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
 ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
 taacgcgaat tttaacaaaa tattaacggt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
 cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cgggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
 acgattaccg ttcatcgcgc tgcgcgctcg ctgcgtcact gaggcgcgcc gggcaaagcc 1020
 cgggcgtcgg gcgaccttg gtcgcccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg 1080
 agtgaattc acgcgtggat cttaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 1140
 atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa 1200
 cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac 1260
 tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccaacttg cagtacatca 1320
 agtgtatcat atgccaagtc cgcccctat tgacgtcaat gacggtaaata gggccgcctg 1380
 gcattatgcc cagtacatga ccttacggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt 1440
 agtcatcgcct attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtac accaatgggc gtggatagcg 1500
 gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttgttttg 1560

ES 2 803 728 T3

gcacccaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaataac cccgccccgt tgacgcaaat 1620
 gggcggttagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctcgttttag tgaaccgtca 1680
 gatcactaga agctttctgg gcacaccctt catctgactt ttttaattcct ccacttcaac 1740
 acctggtgca ttcatgtgcc ggcacaatca gtgattggtg ggttaatgag tgactgcggtg 1800
 agactgactt agtgagctgg gaaagatfff ttggcagaca gggagaaata aggagaggca 1860
 acttgagaa ggggcttaga atgaggccta gaagagcagt aaggggcaaa cagtctgagc 1920
 aaaggcaggc aggcaggaac tcagttggag agactgaggc tgggccacgt gccctctcct 1980
 gccaccttct ctccatctgc ttttttcccg tgtcattctc tggactgcca gaacaaggct 2040
 cactgtttct tagtaaaaag agggttttgg tggcaatgga taaggccgag accaccaatc 2100
 agaggagttt tagacatcat tgaccagagc tctgggcaga acctggccat tctgaagca 2160
 aggaaacagc ctgcgaaggc accaaagctg cccttacctg ggctggggaa gaaggtgtct 2220
 tctggaataa tgctgttggt gaaggcgttt gcacatgcaa agtcagattt gttgctctag 2280
 attgcggccg catgaattct tgctccaggc cacagcactg ttgctcttga agtccataga 2340
 cctcatgtct agcacagttt tgtctgtgat atacacatca gaatccttac tttgtgacac 2400
 atttgtttga gaatcaaaaat cgggtgaatag gcagacagac ttgtcactgg atttagagtc 2460
 tctcagctgg tacacggcag ggtcagggtt ctggatatct gtgggacaag aggatcaggg 2520
 ttaggacatg atctcatttc cctctttgcc ccaaccagg ctggagtcca gatgccagtg 2580
 atggacaagg gcggggctct gtggggctgg caagtcacgg tctcatgctt tatacgggaa 2640
 atagcatctt agaaaccagc tgctcgtgat ggactgggac tcagggacag gcacaagcta 2700
 tcaatcttgg ccaagaggcc atgatttcag tgaacgttca cggccaggcc tggcctgcca 2760
 ctcaaggaaa cctgaaatgc agggctactt aataatactg cttattcttt tatttaatat 2820
 gatcttcttc aaaaccccag caatataact ctggcagagt aaaggcaggc atgggaaaaa 2880
 ggcccagcaa agcaaaactgt acatcttggg atctggagtg gtctcccaa cttaggctgg 2940
 gcattagcag aatgggaggt ttatggtatg ttggcattaa gttgggaaat ctatcacatt 3000
 accaggagat tgctctctca ttgatagagg ttttgaacta taaatcagaa cacctgogtc 3060
 taagccccag cgcaattggt gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaat 3120
 aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg 3180
 gtttgtccaa actcatcaat gtatcttaag gcgggaattg atctaggaac ccctagtgat 3240
 ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg ctgcgtcact gaggccgccc gggcaagcc 3300
 cgggcgtcgg gcgaccttg gtgcgccggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg 3360
 agtggccaac ccccccccc cccccccggc gattctcttg tttgctccag actctcaggc 3420
 aatgacctga tagcctttgt agagacctct caaaaatagc taccctctcc ggcatgaatt 3480

ES 2 803 728 T3

tatcagctag aacggttgaa tatcatattg atggtgattt gactgtctcc ggcctttctc 3540
 acccgtttga atctttacct acacattact caggcattgc atttaaata tatgagggtt 3600
 ctaaaaattt ttatccttgc gttgaaataa aggcttctcc cgcaaaagta ttacagggtc 3660
 ataatgtttt tggtagaacc gatttagctt tatgctctga ggctttattg ctttaattttg 3720
 ctaattcttt gccttgctg tatgatttat tggatggttg aattcctgat gcggtatfff 3780
 ctcttacgc atctgtgctg tatttcacac cgcatatggt gcaactctcag tacaatctgc 3840
 tctgatgccg catagttaag ccagccccga caccgccaa caccgctga cgcgccctga 3900
 cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc 3960
 atgtgtcaga ggttttcacc gtcatcaccg aaacgcgcga gacgaaaggg cctcgtgata 4020
 cgcctatfff tataggttaa tgtcatgata ataatggttt cttagacgtc aggtggcact 4080
 tttcggggaa atgtgctcgg aacccttatt tgtttatfff tctaaataca ttcaaatag 4140
 tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt 4200
 atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctfff ttgcggcatt ttgccttct 4260
 gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca 4320
 cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc 4380
 gaagaacgtt ttccaatgat gagcactfff aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc 4440
 cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgcgcatac actattctca gaatgacttg 4500
 gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta 4560
 tgcagtgtc ccataacat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc 4620
 ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt 4680
 gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg 4740
 cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg gcgaactact tactctagct 4800
 tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc 4860
 tcgccccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct 4920
 cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac 4980
 acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtga gatagggtgcc 5040
 tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat 5100
 ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg 5160
 accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccgat agaaaagatc 5220
 aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa 5280
 ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag 5340

ES 2 803 728 T3

gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgta gccgtagtta 5400
 ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacataacc tcgctctgct aatcctgtta 5460
 ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag 5520
 ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg 5580
 gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcggccacg 5640
 cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag 5700
 cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt atagtctgt cgggtttcgc 5760
 cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa 5820
 aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg 5880
 ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct 5940
 gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt cagtgagcga ggaagcggaa 6000
 gagcgcctaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcggtggc cgattcatta atg 6053

<210> 108
 <211> 5458
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 108

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgocgag 60
 cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120
 gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
 agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgocgaca 240
 acggttaatt tgctgatgg acagactctt ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaac 300
 acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360
 agctcccgct ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
 gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgtt ttcttccctt cctttctcgc 540
 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt 600
 tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
 gccatcgcgc tgatagacgg tttttcgcgc tttgacggtg gagtccacgt tctttaatag 720
 tggactcttg ttccaaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
 ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
 taacgcgaat ttttaacaaaa tattaacggt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900

ES 2 803 728 T3

cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cgggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
acgattaccg ttcacgccc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgcc gggcaaagcc 1020
cgggcgtcgg gcgaccttg gtcgcccggc ctcaagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg 1080
agtggaattc acgcgtgctt tctgggcaca cccctcatct gactttttaa ttcctccact 1140
tcaacacctg gtgcattcat gtgccggcac aatcagtgat tgggtgggta atgagtgact 1200
gcgtgagact gacttagtga gctgggaaag attttttggc agacagggag aaataaggag 1260
aggcaacttg gagaaggggc ttagaatgag gcctagaaga gcagtaaggg gcaaacagtc 1320
tgagcaaagg caggcaggca ggaactcagt tggagagact gaggtgggc cacgtgccct 1380
ctcctgccac cttctcttca tctgcttttt tcccgtgtca ttctctggac tgccagaaca 1440
aggctcactg tttcttagta aaaagagggt tttggtggca atggataagg ccgagaccac 1500
caatcagagg agtttttagac atcattgacc agagctctgg gcagaacctg gccattcctg 1560
aagcaaggaa acagcctgcg aaggcaccaa agctgccctt acctgggctg gggagaagg 1620
tgtcttctgg aataatgctg ttgttgaagg cgtttgcaca tgcaaagtca gatttgttgc 1680
tctagattgc ggccgcatga attcttgctc caggccacag cactgttgct cttgaagtcc 1740
atagacctca tgtctagcac agttttgtct gtgatataca catcagaatc cttactttgt 1800
gacacatttg tttgagaatc aaaatcggtg aataggcaga cagacttgtc actggattta 1860
gagtctctca gctggtacac ggcagggtca gggttctgga tatctgtggg acaagaggat 1920
cagggttagg acatgatctc atttccctct ttgccccaac ccaggctgga gtccagatgc 1980
cagtgatgga caagggcggg gctctgtggg gctggcaagt cacggctctca tgctttatac 2040
gggaaatagc atcttagaaa ccagctgctc gtgatggact gggactcagg gacaggcaca 2100
agctatcaat cttggccaag aggccatgat ttcagtgaac gttcacggcc aggccctggcc 2160
tgccactcaa ggaaacctga aatgcagggc tacttaataa tactgottat tcttttattt 2220
aataggatct tcttcaaac cccagcaata taactctggc agagtaaagg caggcatggg 2280
aaaaaggccc agcaaagcaa actgtacatc ttggaatctg gagtggctc cccaacttag 2340
gctgggcatt agcagaatgg gaggtttatg gtatgttggc attaagttgg gaaatctatc 2400
acattaccag gagattgctc tctcattgat agaggttttg aactataaat cagaacacct 2460
gcgtctaagc cccagcgcaa ttgttgttgt taacttgttt attgcagctt ataatgggta 2520
caaataaagc aatagcatca caaatctcac aaataaagca tttttttcac tgcattctag 2580
ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttaaggcggg aattgatcta ggaaccctta 2640
gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcaactgaggc cggccgggca 2700
aagcccgggc gtcgggcgac ctttggctgc ccggcctcag tgagcgagcg agcgcgcaga 2760

ES 2 803 728 T3

gagggagtgg ccaaccccc ccccccccc ccggcgatcc tcttgtttgc tccagactct 2820
caggcaatga cctgatagcc tttgtagaga cctctcaaaa atagctacco tctccggcat 2880
gaatttatca gctagaacgg ttgaatatca tattgatggg gatttgactg tctccggcct 2940
ttctcaccog tttgaatcct tacctacaca ttactcaggc attgcattta aaatatatga 3000
gggttctaaa aatTTTTtAtc cttgcgttga aataaaggct tctcccgcaa aagtattaca 3060
gggtcataat gtttttggtA caaccgattt agctttatgc tctgaggctt tattgcttaa 3120
ttttgctaAt tctttgcctt gcctgtatga tttattggat gttggaatte ctgatgcggg 3180
atTTTctcct tacgcAtctg tgcggatatt cacaccgcat atggtgcact ctCagtacaa 3240
tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc 3300
cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga 3360
gctgcatgtg tcagaggTtt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg 3420
tgatacgcct atTTTtAtag gttaatgtca tgataataat ggTttcttag acgtcagggtg 3480
gcactTTTcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatTTgttt atTTTctaa atacattcaa 3540
atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 3600
agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg ccttattcc cTTTTtgcg gcattTTgcc 3660
ttcctgTTTT tgctcaccCa gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 3720
gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagTTTTc 3780
gccccgaaga acgTTTTcca atgatgagca cTTTTaaagt tctgctatgt ggcgcggtat 3840
tatcccgtat tgacgcccgg caagagcaac tcggctgcgg catacactat tctcagaatg 3900
acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 3960
aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 4020
cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt tttgcacaa catgggggat catgtaactc 4080
gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 4140
cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaactatt aactggcgaa ctacttactc 4200
tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcggA taaagttgca ggaccacttc 4260
tgcgctcggc ccttccggct ggctggTTta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 4320
ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctccgt atcgtagtta 4380
tctacacgac ggggagtCag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 4440
gtgcctcact gattaagcat ttgtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 4500
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 4560
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagTTTT cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 4620
agatcaaagg atcttcttga gatcctTTTT ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaaa 4680

ES 2 803 728 T3

aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc 4740
 cgaagtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaatac tgtccttcta gtgtagccgt 4800
 agttaggcca ccaactcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatec 4860
 tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 4920
 gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 4980
 gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 5040
 ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 5100
 gagagcgcac gagggagctt ccaggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 5160
 ttgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat 5220
 ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc 5280
 acatgttctt tcctgcgta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt 5340
 gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag 5400
 cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatg 5458

<210> 109
 <211> 6082
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 109

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgocgag 60
 cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120
 gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
 agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgocgaca 240
 acggttaatt tgcgtgatgg acagactcct ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaac 300
 acttctcagc attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc ctttaacggc cctcctgttt 360
 agctcccgtc ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
 gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcttttcgct ttcttccctt cctttctcgc 540
 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt 600
 tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
 gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 720
 tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780

ES 2 803 728 T3

ataagggatt	ttgccgattt	cggcctattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	840
taacgcgaat	tttaacaaaa	tattaacggt	tacaatttaa	atatttgctt	atacaatctt	900
cctgtttttg	gggcttttct	gattatcaac	cggggtacat	atgattgaca	tgctagtttt	960
acgattaccg	ttcatcgccc	tgcgcgctcg	ctcgctcact	gaggccgccc	gggcaaagcc	1020
cgggcgtcgg	gcgacctttg	gtcgcccggc	ctcagtgagc	gagcgagcgc	gcagagaggg	1080
agtggaattc	acgcgtactg	gcatctggac	tccagcctgg	gttggggcaa	agagggaaat	1140
gagatcatgt	cctaaccctg	atcctcttgt	cccacagata	tccagaacct	tgaccctgcc	1200
gtgtaccagc	tgagagactc	taaaccagt	gacaagtctg	tctgcctatt	caccgatttt	1260
gattctcaaa	caaatgtgtc	acaaagtaag	gattctgatg	tgtatatcac	agacaaaact	1320
gtgctagaca	tgaggtctat	ggacttcaag	agcaacagtg	ctgtggcctg	gagcaactag	1380
tgggcagagc	gcacatcgcc	cacagtcccc	gagaagttgg	ggggaggggt	cggcaattga	1440
accggtgcct	agagaagggt	gcgcggggta	aactgggaaa	gtgatgtcgt	gtactggctc	1500
cgctttttc	ccgaggggtg	gggagaaccg	tatataagtg	cagtagtcgc	cgtgaacggt	1560
ctttttcgca	acgggtttgc	cgccagaaca	cagctagcac	catggcgctc	ccagtgcacg	1620
ccttactttt	acctctggcg	ttattattgc	acgcggctcg	tcctgacata	cagatgactc	1680
agactacctc	ttccctatct	gcttctttag	gcgaccgagt	aacaatatct	tgccgggcca	1740
gccaggacat	ctcaaaaatac	ttaaactggg	atcagcagaa	gccggacgga	acagttaagt	1800
tgctcattta	ccacacgtcg	agattacact	caggcgttcc	tagccgattt	tcgggttccg	1860
gttccggtac	ggactacagc	ctgacaatca	gtaaccttga	gcaggaggac	atcgccacct	1920
acttctgtca	gcagggcaac	acgctcccgt	acacattcgg	tgggggaact	aagctggaga	1980
ttaccggagg	cggtggcagc	ggtggcggcg	gcagcggggg	tggcggctcg	gaggtcaagt	2040
tacaggagag	cggaccgggc	ttggtcgcac	ctagccagag	cctctcagtc	acgtgcactg	2100
tgtctggagt	cagtctccca	gactacgggg	tatcatggat	acgacagccg	cctagaaagg	2160
gcttagagtg	gctggggggt	atctggggaa	gtgaaaccac	atactacaac	tcagctctca	2220
agagccgcct	caccatcatt	aaggacaaca	gtaagtgcga	ggtttttotta	aagatgaact	2280
ctctccagac	tgacgacacc	gctatttact	actgcgcgaa	gcactactac	tacggcggga	2340
gttacgcaat	ggactactgg	ggtcagggca	cttctgtgac	cgtatccagc	actactacct	2400
cagccccacg	tccccccacg	ccagctccaa	cgatagcaag	tcagccctta	tctcttcgcc	2460
ctgaggcttg	caggcccgcg	gcgggcggcg	ccgttcacac	gcgaggacta	gacttcgcct	2520
gcgacatcta	catctgggca	ccactagccg	ggacttgcgg	agtgttggtg	ttgagcttgg	2580
taataacgct	ctactgcaag	cgtgggagaa	agaagctctt	gtacattttc	aagcagccat	2640
tcatgcgtcc	cgttcagacg	actcaggagg	aggacggctg	ctcgtgccga	ttcccggagg	2700

ES 2 803 728 T3

aggaggaggg cggttgcgaa ctcaagagtga agttctctcg ctccgaggac gcacccgctt 2760
 accagcaggg tcagaaccag ctatacaacg agttaaacct ggggcgcccg gaggagtacg 2820
 acgtgttaga caagcgtaga ggtagggacc cggagatggg aggcaagcct cggagaaaga 2880
 acccccagga gggcctgtac aacgaactcc agaaggacaa gatggctgag gcgtactcgg 2940
 agattggtat gaagggcgag agacgtcgcg gaaagggaca cgacggctta taccaggggc 3000
 tttccaccgc gaccaaggac acatacgacg cgctgcacat gcaagcctta ccacctcgat 3060
 gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga atgcagtgaa aaaaatgctt 3120
 tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgtaacc attataagct gcaataaaca 3180
 agttctagag caacaaatct gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc 3240
 cagaagacac cttcttcccc agcccaggta agggcagctt tggcgccttc aattgcctct 3300
 ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgctc ggcgaccttt 3360
 ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ccccgcgat 3420
 tctcttgttt gctccagact ctcaaggcaat gacctgatag cctttgtacc tgcaggtctc 3480
 aaaaatagct accctctccg gcatgaattt atcagctaga acggttgaat atcatattga 3540
 tggtgatttg actgtctccg gcctttctca cccggttgaa tctttacctt cacattactc 3600
 aggcattgca tttaaaatat atgaggggtc taaaaatfff tatccttgcg ttgaaataaa 3660
 ggcttctccc gcaaaaagtat tacaggggtc taatgttttt ggtacaaccg attttagcttt 3720
 atgctctgag gctttattgc ttaattttgc taattctttg ccttgccctgt atgatttatt 3780
 ggatgttga attcctgatg cggatatttt tccttacgca tctgtgcggg atttcacacc 3840
 gcatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgcgcg atagttaagc cagccccgac 3900
 acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca 3960
 gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga 4020
 aacgcgcgag acgaaagggc ctcgatgatac gcctatffff ataggttaat gtcataataa 4080
 taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctatft 4140
 gtttattttt ctaaatacat tcaaataatgt atccgctcat gagacaataa cctgataaa 4200
 tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta 4260
 ttcccttttt tgcggcattt tgcttctctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag 4320
 taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca 4380
 gcgtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgftt tccaatgatg agcactttta 4440
 aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc 4500
 gccgataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc 4560

ES 2 803 728 T3

ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca 4620
ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc 4680
acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca 4740
taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac 4800
tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg 4860
cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg 4920
ataaatctgg agccgggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg 4980
gtaagccctc ccgatatgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac 5040
gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc 5100
aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct 5160
aggtgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcggtcc 5220
actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc 5280
gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg 5340
atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa 5400
atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc 5460
ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt 5520
gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggccgagcgg tcgggctgaa 5580
cgggggggtc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc 5640
tacagcgtga gctatgagaa agcggccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc 5700
cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct 5760
ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat 5820
gctcgtcagg ggggpcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc 5880
tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatccct gattctgtgg 5940
ataaccgtat taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc 6000
gcagcgagtc agtgagcgag gaagcgggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg 6060
cgcggtggcc gattcattaa tg 6082

<210> 110
<211> 7887
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintetizado

<400> 110

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgpcgag 60

ES 2 803 728 T3

cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120
gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaac 300
acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360
agctcccgct ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgtc ttcttccctt cctttctcgc 540
cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt 600
tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
gccatcgcgc tgatagacgg tttttcgcgc tttgacgttg gagtccaagt tctttaatag 720
tggactcttg ttccaaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
taacgcgaat ttaacaaaaa tattaacggt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg 1020
accaaagtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 1080
cagagagggga gtggccaact ccatcactag gggttcctac gcgtagatct catattctgg 1140
cagggtcagt ggctccaact aacatttggt tggacttta cagtttatta aatagatggt 1200
tatatggaga agctctcatt tctttctcag aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca 1260
ccatattcat tttgcaggtg aaattcctga gatgtaagga gctgctgtga cttgctcaag 1320
gccttatatc aagtaaacgg tagcgtggg gcttagacgc aggtgttctg atttatagtt 1380
caaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagatttc ccaacttaat 1440
gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgccagc ctaagttggg gagaccactc 1500
cagattccaa gatgtacagt ttgctttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct 1560
gccagagtta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataagcagta 1620
ttattaagta gccctgcatt tcaggtttcc ttgagtggca ggccaggcct ggcctggaac 1680
gttactgaa atcatggcct cttggccaag attgatagct tgtgcctgtc cctgagtccc 1740
agtccatcac gagcagctgg tttctaagat gctatttccc gtataaagca tgagaccgtg 1800
acttgccagc cccacagagc ccgcctttg tccatcactg gcactctggac tccagcctgg 1860
gttggggcaa agagggaaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata 1920

ES 2 803 728 T3

tccagaaccc tgaccctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg 1980
tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg 2040
tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggctctat ggacttcaag agcaacagtg 2100
ctgtggcctg gagcaactag tggatctgcg atcgctccgg tgcccgtcag tgggcagagc 2160
gcacatcgcc cacagtcccc gagaagttgg ggggaggggt cggcaattga acgggtgcct 2220
agagaagtg gcgcggggta aactgggaaa gtgatgtcgt gtactggctc cgcctttttc 2280
ccgaggggtg gggagaaccg tatataagtg cagtagtcgc cgtgaacggt ctttttcgca 2340
acgggtttgc cgccagaaca cagctgaagc ttcgaggggc tcgcatctct ccttcacgcg 2400
cccgccccc tacctgaggc cgccatccac gccggttgag tcgcgttctg ccgcctcccg 2460
cctgtggtgc ctctgaact gcgtccgcg tctaggtaaag tttaaagctc aggtcgagac 2520
cgggcctttg tccggcgctc ccttgagacc tacctagact cagccggctc tccacgcttt 2580
gcctgaccct gcttgctcaa ctctacgtct ttgtttcggt ttctgttctg cgcggttaca 2640
gatccaagct gtgaccggcg cctactctag agctagcgca gtcagtgtt ctgacacaac 2700
agtctcgaac ttaactagca ccatggcgct cccagtgaca gccttacttt tacctctggc 2760
gttattattg cacgcggctc gtctgacat acagatgact cagactacct ctccctatc 2820
tgcttcttta ggcgaccgag taacaatatc ttgccgggcc agccaggaca tctcaaaata 2880
cttaaactgg tatcagcaga agccggacgg aacagttaag ttgctcattt accacacgctc 2940
gagattacac tcaggcgttc ctagccgatt ttcgggttcc ggttccggta cggactacag 3000
cctgacaatc agtaaccttg agcaggagga catcgccacc tacttctgtc agcagggcaa 3060
cacgctcccg tacacattcg gtgggggaac taagctggag attacccggag gcggtggcag 3120
cgggtggcggc ggcagcgggg gtggcggtc ggagggtcaag ttacaggaga gcggaccggg 3180
cttggctgca cctagccaga gcctctcagt cacgtgcact gtgtctggag tcagtctccc 3240
agactacggg gtatcatgga tacgacagcc gcctagaaag ggcttagagt ggctgggggt 3300
tatctgggga agtgaaacca catactaaa ctcagctctc aagagccgcc tcaccatcat 3360
taaggacaac agtaagtgc aggttttctt aaagatgaac tctctccaga ctgacgacac 3420
cgctatttac tactgcgcga agcactacta ctacggcggg agttacgcaa tggactactg 3480
gggtcagggc acttctgtga ccgtatccag cactactacc ccagccccac gtccccccac 3540
gccagctcca acgatagcaa gtcagccctt atctcttcgc cctgaggctt gcaggcccgc 3600
ggcggggcggc gccgttcaca cgcgaggact agacttcgcc tgcgacatct acatctgggc 3660
accactagcc gggacttgcg gagtgttggt gttgagcttg gtaataacgc tctactgcaa 3720
gcgtgggaga aagaagctct tgtacatfff caagcagcca ttcattgcgtc ccgttcagac 3780
gactcaggag gaggacggct gctcgtgccg attcccggag gaggaggagg gcggttgca 3840

ES 2 803 728 T3

actcagagtg aagttctctc gctccgcgga cgcacccgct taccagcagg gtcagaacca 3900
 gctatacaac gagttaaac tggggcgccg ggaggagtac gacgtgtag acaagcgtag 3960
 aggtagggac ccggagatgg gaggcaagcc tcggagaaag aacccccagg agggcctgta 4020
 caacgaactc cagaaggaca agatggctga ggcgtactcg gagattggta tgaagggcga 4080
 gagacgtcgc ggaaagggac acgacggctt ataccagggg ctttccaccg cgaccaagga 4140
 cacatacgac gcgctgcaca tgcaagcctt accacctoga tgaggtagca gcggccgctt 4200
 cgagcagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga 4260
 aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc 4320
 tgcaataaac aagttaacaa caacaattcg aatttaaatc ggatccgcaa caaatctgac 4380
 tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt cttccccagc 4440
 ccaggtaaag gcagctttgg tgccctcgca ggctgtttcc ttgcttcagg aatggccagg 4500
 ttctgccag agctctggtc aatgatgtct aaaactcctc tgattgggtg tctcggcctt 4560
 atccattgcc accaaaacc tcttttact aagaaacagt gagccttggt ctggcagtcc 4620
 agagaatgac acgggaaaaa agcagatgaa gagaaggtgg caggagaggg cacgtggccc 4680
 agcctcagtc tctccaactg agttcctgcc tgccctgcctt tgctcagact gtttgcccct 4740
 tactgctctt ctaggcctca ttctaagccc cttctccaag ttgcctctcc ttatttctcc 4800
 ctgtctgcc aaaaatcttt cccagctcac taagtcagtc tcacgcagtc actcattaac 4860
 ccaccaatca ctgattgtgc cggcacatga atgcaccagg tgttgaagtg gaggaattaa 4920
 aaagtcagat gaggggtgtg cccagaggaa gcaccattct agttggggga gcccatctgt 4980
 cagctgggaa aagtccaaat aacttcagat tggaatgtgt ttttaactcag ggttgagaaa 5040
 acagccacct tcaggacaaa agtcagggaa gggctctctg aagaaatgct acttgaagat 5100
 accagcccta ccaagggcag ggagaggacc aattgatgga gttggcact ccctctctgc 5160
 gcgctcgctc gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgtcggggc acctttggtc 5220
 gcccgccctc agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt ggccaacggc gcgcctgcag 5280
 gtctcaaaaa tagctaccct ctccggcatg aatttatcag ctagaacggg tgaatatcat 5340
 attgatggtg atttgactgt ctccggcctt tctcaccogt ttgaatcttt acctacacat 5400
 tactcaggca ttgcatttaa aatatatgag ggttctaaaa atttttatcc ttgcgttgaa 5460
 ataaaggctt ctcccgaaa agtattacag ggtcataatg tttttggtac aaccgattta 5520
 gctttatgct ctgaggcttt attgcttaat tttgctaatt ctttgccttg cctgtatgat 5580
 ttattggatg ttggaattcc tgatgcggtg ttttctcctt acgcatctgt gcggtatttc 5640
 acaccgcata tggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc 5700

ES 2 803 728 T3

ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatccgc 5760
 ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggTTTT caccgtcatc 5820
 accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatacgccta tttttatagg ttaatgtcat 5880
 gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc 5940
 tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg 6000
 ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 6060
 ccttattccc ttttttgccg cattttgcct tccgtgtttt gctcaccag aaacgctggt 6120
 gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct 6180
 caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccogaagaa cgttttccaa tgatgagcac 6240
 ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgcggggc aagagcaact 6300
 cggtcgccc atacactatt ctcagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa 6360
 gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga 6420
 taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt 6480
 tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 6540
 agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg 6600
 caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat 6660
 ggagcgggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat 6720
 tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggg atcattgcag cactggggcc 6780
 agatggtaag ccctcccgtg tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 6840
 tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc 6900
 agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag 6960
 gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgacccaa atccctaac gtgagttttc 7020
 gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt 7080
 tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt 7140
 gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 7200
 accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 7260
 accgcctaca tacctcgctc tgctaatact gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 7320
 gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 7380
 ctgaacgggg gggtcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag 7440
 atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag 7500
 gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 7560
 cgctgggtat ctttatagtc ctgtcggggt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 7620

ES 2 803 728 T3

gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg 7680
 gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat ccctgattc 7740
 tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac 7800
 cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct 7860
 ccccgcgcgt tggccgattc attaatg 7887

<210> 111

<211> 486

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 111

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
 20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
 35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
 50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
 100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser
 145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

ES 2 803 728 T3

					165						170					175
Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	
			180					185					190			
Val	Ile	Trp	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser	
		195						200				205				
Arg	Leu	Thr	Ile	Ile	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Leu	Lys	
	210					215					220					
Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	
225					230					235					240	
His	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				245					250					255		
Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Pro	Pro	
			260						265				270			
Thr	Pro	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	
		275					280					285				
Ala	Cys	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	His	Thr	Arg	Gly	Leu	Asp	
	290					295					300					
Phe	Ala	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ile	Trp	Ala	Pro	Leu	Ala	Gly	Thr	Cys	Gly	
305					310					315					320	
Val	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Tyr	Cys	Lys	Arg	Gly	Arg	
				325					330					335		
Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met	Arg	Pro	Val	Gln	
			340					345					350			
Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu	Glu	
		355					360					365				
Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	
	370					375					380					
Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	
385					390					395					400	
Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	
				405					410						415	

ES 2 803 728 T3

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
 420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
 450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
 465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 485

<210> 112

<211> 242

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 112

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu
 115 120 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys

ES 2 803 728 T3

130		135		140
Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg				
145		150		155
Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser				
		165		170
Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile				
		180		185
Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln				
		195		200
Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly				
		210		215
Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val				
225		230		235

Ser Ser

<210> 113
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 113

5

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly				
1		5		10
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr				
		20		25
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys				
		35		40
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys				
		50		55
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg				
65		70		75
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala				
		85		90
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg				
		100		105
				110

10 <210> 114

ES 2 803 728 T3

<211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Sintetizado

 <400> 114

 Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15

 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30

 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

 <210> 115
 <211> 21
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintetizado

 <400> 115

 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15

 His Ala Ala Arg Pro
 20
 15

 <210> 116
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Sintetizado

 <400> 116

 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15

 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30

 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40 45

 <210> 117
 25 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintetizado

 30 <400> 117

ES 2 803 728 T3

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

5 <210> 118
 <211> 493
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 118

gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggagggggtc ggcaattgaa 60
 cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc 120
 gcctttttcc cgaggggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc 180
 tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac agctgaagct tcgaggggct cgcattctctc 240
 cttcacgcgc ccgccccct acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc 300
 cgcctccgc ctgtggtgcc tcctgaactg cgtccgcctg ctaggtaagt ttaaagctca 360
 ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc cttggagcct acctagactc agccggctct 420
 ccacgctttg cctgaccctg cttgctcaac tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc 480
 gccgttacag atc 493

10 <210> 119
 <211> 2184
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 119

gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggagggggtc ggcaattgaa 60
 cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc 120

ES 2 803 728 T3

gcctttttcc cgaggggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtgcgc gtgaacgttc 180
 tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac agctgaagct tcgaggggct cgcattctctc 240
 cttcacgcgc ccgccccct acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc 300
 cgcctcccgc ctgtggtgcc tcctgaactg cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca 360
 ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc cttggagcct acctagactc agccggctct 420
 ccacgctttg cctgaccctg cttgctcaac tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc 480
 gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc ctactctaga gctagcgcag tcagtgttc 540
 tgacacaaca gtctcgaact taactagcac catggcgctc ccagtgcag ccttactttt 600
 acctctggcg ttattattgc acgcggctcg tcctgacata cagatgactc agactacctc 660
 ttccctatct gcttctttag gcgaccgagt aacaatatct tgccgggcca gccaggacat 720
 ctcaaaatac ttaaactggt atcagcagaa gccggacgga acagttaagt tgctcattta 780
 ccacacgtcg agattacact caggcgttcc tagccgattt tcgggttccg gttccggtac 840
 ggactacagc ctgacaatca gtaacctga gcaggaggac atcgccacct acttctgtca 900
 gcagggcaac acgctcccgt acacattcgg tgggggaact aagctggaga ttaccggagg 960
 cggtggcagc ggtggcggcg gcagcggggg tggcggctcg gaggtcaagt tacaggagag 1020
 cggaccgggc ttggtcgcac ctagccagag cctctcagtc acgtgcactg tgtctggagt 1080
 cagtctccca gactacgggg tatcatggat acgacagccg cctagaaagg gcttagagtg 1140
 gctggggggt atctggggaa gtgaaaccac atactacaac tcagctctca agagccgcct 1200
 caccatcatt aaggacaaca gtaagtcgca ggttttctta aagatgaact ctctccagac 1260
 tgacgacacc gctatttact actgcgcgaa gcactactac tacggcggga gttacgcaat 1320
 ggactactgg ggtcagggca cttctgtgac cgtatccagc actactacc cagccccacg 1380
 tccccccacg ccagctccaa cgatagcaag tcagccotta tctcttcgcc ctgaggcttg 1440
 caggcccgcg gcgggcggcg ccggtcacac gcgaggacta gacttcgcct gcgacatcta 1500
 catctgggca ccactagccg ggacttgccg agtggtgttg ttgagcttgg taataacgct 1560
 ctactgcaag cgtgggagaa agaagctctt gtacattttc aagcagccat tcatgcgtcc 1620
 cgttcagacg actcaggagg aggacggctg ctcgtgccga ttcccggagg aggaggaggg 1680
 cggttgcgaa ctcagagtga agttctctcg ctcccgggac gcaccgctt accagcaggg 1740
 tcagaaccag ctatacaacg agttaaacct ggggcgccgg gaggagtacg acgtgttaga 1800
 caagcgtaga ggtagggacc cggagatggg aggcaagcct cggagaaaga acccccagga 1860
 gggcctgtac aacgaactcc agaaggacaa gatggctgag gcgtactcgg agattggtat 1920
 gaagggcgag agacgtcgcg gaaagggaca cgacggctta taccaggggc tttccaccgc 1980

ES 2 803 728 T3

gaccaaggac acatacgcgc cgctgcacat gcaagcctta ccacctcgat gaggtaccag 2040
 cggccgcttc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga 2100
 atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgtaacc 2160
 attataagct gcaataaaca agtt 2184

<210> 120
 <211> 6811
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 120

atatccagaa ccctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt 60
 ctgtctgcct attcaccgat tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg 120
 atgtgtatat cacagacaaa actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca 180
 gtgctgtggc ctggagcaag ggcagagcgc acatcgcca cagtccccga gaagttgggg 240
 ggaggggtcg gcaattgaac ggggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 300
 gatgtcgtgt actggctccg ctttttccc gaggggtgggg gagaaccgta tataagtgca 360
 gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca gctgaagctt 420
 cgaggggctc gcatctctcc ttcacgcgcc cgccgcccta cctgaggccg ccatccacgc 480
 cggttgagtc gcgttctgcc gcctcccgcc tgtggtgcct cctgaactgc gtccgcgctc 540
 taggtaagtt taaagctcag gtcgagaccg ggcctttgtc cggcgctccc ttggagccta 600
 cctagactca gccggtctc cacgctttgc ctgaccctgc ttgctcaact ctacgtcttt 660
 gtttcgtttt ctgttctgcg ccggttacaga tccaagctgt gaccggcgcc tactctagag 720
 ctagcgcagt cagtgttct gacacaacag tctcgaactt aactagcacc atggcgctcc 780
 cagtgcagc cttactttta cctctggcgt tattattgca cgcggtcgt cctgacatac 840
 agatgactca gactacctct tccctatctg cttctttagg cgaccgagta acaatatctt 900
 gccgggcccag ccaggacatc tcaaaatact taaactggta tcagcagaag ccggacggaa 960
 cagttaagtt gctcatttac cacacgtcga gattacactc aggcgttctt agccgatttt 1020
 cgggttccgg ttccggtacg gactacagcc tgacaatcag taaccttgag caggaggaca 1080
 tcgccaccta cttctgtcag cagggaaca cgctcccgtc cacattcggg gggggaacta 1140
 agctggagat taccggaggc ggtggcagcg gtggcggcgg cagcgggggt ggcggctcgg 1200
 aggtcaagtt acaggagagc ggaccgggct tggtcgcacc tagccagagc ctctcagtca 1260
 cgtgcactgt gtctggagtc agtctcccag actacggggg atcatggata cgacagccgc 1320
 ctagaaaggg cttagagtgg ctgggggta tctggggaag tgaaaccaca tactacaact 1380

ES 2 803 728 T3

cagctctcaa gagccgcctc accatcatta aggacaacag taagtgcag gttttcttaa 1440
 agatgaactc tctccagact gacgacaccg ctatttacta ctgcggaag cactactact 1500
 acggcgggag ttacgcaatg gactactggg gtcagggcac ttctgtgacc gtatccagca 1560
 ctactacccc agccccacgt cccccacgc cagctccaac gatagcaagt cagcccttat 1620
 ctcttcgccc tgaggcttgc aggccgcgg cgggcggcgc cgttcacacg cgaggactag 1680
 acttcgcctg cgacatctac atctgggcac cactagccgg gacttgcgga gtgttgttgt 1740
 tgagcttggg aataacgctc tactgcaagc gtgggagaaa gaagctcttg tacattttca 1800
 agcagccatt catgctccc gttcagacga ctcaggagga ggacggctgc tcgtgccgat 1860
 tcccggagga ggaggagggc ggttgccaac tcagagtga gttctctcgc tccgcggacg 1920
 caccgcctta ccagcagggt cagaaccagc tatacaacga gttaaacctg gggcgccggg 1980
 aggagtacga cgtgttagac aagcgtagag gtagggacc cggagatggga ggcaagcctc 2040
 ggagaaaagaa cccccaggag ggctgtaca acgaactcca gaaggacaag atggctgagg 2100
 cgtactcga gattggtatg aagggcgaga gacgtcgcgg aaagggacac gacggcttat 2160
 accaggggct ttccaccgcg accaaggaca catacgcgc gctgcacatg caagccttac 2220
 cacctcgatg aggtaccagc ggccgcttcg agcagacatg ataagataca ttgatgagtt 2280
 tggacaaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc 2340
 tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaaca gttcaaact gactttgcat 2400
 gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc agcccaggta 2460
 agggcagctt tgggtgcctc gcaggctgtt tccttgcttc aggaatggcc aggttctgcc 2520
 cagagctctg gtcaatgatg tctaaaactc ctctgattgg tggctctggc cttatccatt 2580
 gccacaaaaa ccctcttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag tccagagaat 2640
 gacacgggaa aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg cccagcctca 2700
 gtctctcaa ctgagttcct gcctgcctgc ctttgctcag actgtttgcc cttactgct 2760
 cttctaggcc tcattctaag ccccttctcc aagttgcctc tccttatttc tcctgtctg 2820
 ccaaaaaatc tttcccagct cactaagtca gtctcacgca gtcactcatt aaccaccaa 2880
 tcaactgattg tgccggcaca tgaatgcacc aggtgttgaa gtggaggaat taaaaagtca 2940
 gatgaggggt gtgccagag gaagcaccat tctagttggg ggagccatc tgtcagctgg 3000
 gaaaagtcca aataacttca gattggaatg tgttttaact cagggttgag aaaacagcta 3060
 ccttcaggac aaaagtcagg gaaggctct ctgaagaaat gctacttgaa gataccagcc 3120
 ctaccaaggg cagggagagg accctataga ggcctgggac aggagctcaa tgagaaagga 3180
 gaagagcagc aggcattgagt tgaatgaagg aggcagggcc gggtcacagc gccttctagg 3240

ES 2 803 728 T3

ccatgagagg gtagacagta ttctaaggac gccagaaagc tgttgatcgg cttcaagcag 3300
 gggagggaca cctaatttgc ttttcttttt tttttttttt tttttttttt tttttgagat 3360
 ggagttttgc tcttgttgcc caggctggag tgcaatggtg catcttggct cactgcaacc 3420
 tccgcctccc aggttcaagt gattctcctg cctcagcctc ccgagtagct gagattacag 3480
 gcacccgccca ccatgcctgg ctaatttttt gtattttttag tagagacagg gtttcactat 3540
 gttggccagg ctggtctcga actcctgacc tcaggtgatc caccgccttc agcctcccaa 3600
 agtgctggga ttacaggcgt gagccaccac acccggcctg cttttcttaa agatcaatct 3660
 gagtgctgta cggagagtgg gttgtaagcc aagagtagaa gcagaaaggg agcagttgca 3720
 gcagagagat gatggaggcc tgggcagggt ggtggcaggg aggtaaccaa caccattcag 3780
 gtttcaaagg tagaacctatg cagggatgag aaagcaaaga ggggatcaag gaaggcagct 3840
 ggattttggc ctgagcagct gagtcaatga tagtgccgtt tactaagaag aaaccaagga 3900
 aaaaatttgg ggtgcaggga tcaaaacttt ttggaacata tgaaagtacg tgtttatact 3960
 ctttatggcc cttgtcacta tgtatgcctc gctgcctcca ttggactcta gaatgaagcc 4020
 aggcaagagc agggctctatg tgtgatggca catgtggcca gggctatgca acatgtactt 4080
 tgtacaaaca gtgtatattg agtaaataga aatgggtgtcc aggagccgag gtatcgggtcc 4140
 tgccagggcc aggggctctc cctagcagggt gctcatatgc tgtaagttcc ctccagatct 4200
 ctccacaagc aggcattgaa aggctgtagt tgttcacctg cccaagaact aggaggctctg 4260
 ggggtggaga gtcagcctgc tctggatgct gaaagaatgt ctgtttttcc ttttagaaag 4320
 ttctgtgat gtcaagctgg tcgagaaaag ctttgaaaca ggtaagacag ggggtctagcc 4380
 tgggtttgca caggattgcy gaagtgatga acccgcaata accctgcctg gatgagggag 4440
 tgggaagaaa ttagtagatg tgggaatgaa tgatgaggaa tggaaacagc ggttcaagac 4500
 ctgcccagag ctgggtgggg tctctcctga atccctctca ccatctctga ctttccattc 4560
 taagcacttt gaggatgagt ttctagcttc aatagaccaa ggactctctc ctaggcctct 4620
 gtattccttt caacagctcc actgtcaaga gagccagaga gagcttctgg gtggcccagc 4680
 tgtgaaatth ctgagtcctt tagggatagc cctaaacgaa ccagatcctc ctgaggacag 4740
 ccaagaggtt ttgccttctt tcaagacaag caacagtact cacataggct gtgggcaatg 4800
 gtcctgtctc tcaagaatcc cctgcccctc ctccacacca ccttgggccc atattcattt 4860
 ccatttgagt tgttcttatt gagtcatcct tctgtggta gcggaactca ctaaggggcc 4920
 catctggacc cgaggatttg tgatgataaa ttctgagcac ctacccctc cccagaaggg 4980
 ctcagaaata aaataagagc caagtctagt cgggtgtttcc tgtcttgaaa cacaatactg 5040
 ttggccctgg aagaatgcac agaactctgt tgtaagggga tatgcacaga agctgcaagg 5100
 gacaggaggt gcaggagctg caggcctccc ccaccagcc tgctctgctt tggggaaaac 5160

ES 2 803 728 T3

cgtgggtgtg tcctgcaggc catgcaggcc tgggacatgc aagcccataa ccgctgtggc 5220
 ctcttggttt tacagatacg aacctaaact ttcaaaacct gtcagtgatt gggttccgaa 5280
 tcctcctcct gaaagtggcc gggtttaatc tgctcatgac gctgcggtctg tgggtccagct 5340
 gaggtgaggg gccttgaagc tgggagtggg gtttagggac gcgggtctct ggggtgcatcc 5400
 taagctctga gagcaaacct ccctgcaggg tcttgctttt aagtccaaag cctgagccca 5460
 ccaaactctc ctacttcttc ctgttacaaa ttctctctgt gcaataataa tggcctgaaa 5520
 cgctgtaaaa tatcctcatt tcagccgcct cagttgcact tctcccctat gaggtaggaa 5580
 gaacagttgt ttagaacga agaaactgag gccccacagc taatgagtgg aggaagagag 5640
 aacttgtgt acaccacatg ccttgtgttg tacttctctc accgtgtaac ctctcatgt 5700
 cctctctccc cagtacggct ctcttagctc agtagaaaga agacattaca ctcatattac 5760
 accccaatcc tggctagagt ctccgcaccc tcctcccca gggccccag tcgtcttgc 5820
 gacaactgca tcctgttcca tcaccatcaa aaaaaactc caggctgggt gcgggggctc 5880
 acacctgtaa tcccagcact ttgggaggca gaggcaggag gagcacagga gctggagacc 5940
 agcctgggca acacagggag accccgcctc tacaaaaagt gaaaaaatta accaggtgtg 6000
 gtgctgcaca cctgtagtcc cagctactta agaggctgag atgggaggat cgcttgagcc 6060
 ctggaatgtt gaggtacaa tgagctgtga ttgcgtcact gcactccagc ctggaagaca 6120
 aagcaagatc ctgtctcaa taataaaaa aataagaact ccagggtaca tttgctccta 6180
 gaactctacc acatagcccc aaacagagcc atcaccatca catccctaac agtcctgggt 6240
 ctctctcagt gtccagcctg acttctgttc ttctcattc cagatctgca agattgtaag 6300
 acagcctgtg ctccctcgt ccttctctg cattgcccct cttctccctc tccaaacaga 6360
 gggaaactctc ctacccccaa ggaggtgaaa gctgctacca cctctgtgcc cccccggcaa 6420
 tgccaccaac tggatcctac ccgaatttat gattaagatt gctgaagagc tgccaaacac 6480
 tgctgccacc ccctctgttc ccttattgct gcttgtcact gcctgacatt cacggcagag 6540
 gcaaggctgc tgcagcctcc cctggctgtg cacattccct cctgctcccc agagactgcc 6600
 tccgccatcc cacagatgat ggatcttcag tgggttctct tgggctctag gtccctgcaga 6660
 atgttgtag gaggttattt ttttttaata gtgttcataa agaaatacat agtattcttc 6720
 ttctcaagac gtggggggaa attatctcat tatcgaggcc ctgctatgct gtgtatctgg 6780
 gcgtgttgta tgcctgctg ccgatgcctt c 6811

<210> 121
 <211> 6811
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

ES 2 803 728 T3

<400> 121

atatccagaa	ccctgaccct	gccgtgtacc	agctgagaga	ctctaaatcc	agtgacaagt	60
ctgtctgcct	attcaccgat	tttgattctc	aaacaaatgt	gtcacgggca	gagcgcacat	120
cgcccacagt	ccccgagaag	ttggggggag	gggtcggcaa	ttgaacgggt	gcctagagaa	180
ggtggcgcg	ggtaaactgg	gaaagtgatg	tcgtgtactg	gctccgcctt	tttcccgagg	240
gtgggggaga	accgtatata	agtgcagtag	tcgccgtgaa	cgttcttttt	cgcaacgggt	300
ttgccgccag	aacacagctg	aagcttcgag	gggctcgcac	ctctccttca	cgcgcccgcc	360
gccctacctg	aggccgccat	ccacgccggt	tgagtcgcgt	tctgccgcct	cccgcctgtg	420
gtgcctcctg	aactgcgtcc	gccgtctagg	taagtttaaa	gctcaggtcg	agaccggggc	480
tttgtccggc	gctcccttgg	agcctaccta	gactcagccg	gctctccacg	ctttgcctga	540
ccctgcttgc	tcaactctac	gtctttgttt	cgttttctgt	tctgcgccgt	tacagatcca	600
agctgtgacc	ggcgcctact	ctagagctag	cgcagtcagt	gcttctgaca	caacagttctc	660
gaacttaact	agcaccatgg	cgctcccagt	gacagcctta	cttttacctc	tggcgttatt	720
attgcacgcg	gctcgtcctg	acatacagat	gactcagact	acctcttccc	tatctgcttc	780
tttaggcgac	cgagtaacaa	tatcttgccg	ggccagccag	gacatctcaa	aataacttaa	840
ctggtatcag	cagaagccgg	acggaacagt	taagttgctc	atttaccaca	cgtcgagatt	900
acactcaggc	gttcctagcc	gattttcggg	ttccggttcc	ggtacggact	acagcctgac	960
aatcagtaac	cttgagcagg	aggacatcgc	cacctacttc	tgtcagcagg	gcaacacgct	1020
cccgtacaca	ttcggtgggg	gaactaagct	ggagattacc	ggaggcgggtg	gcagcgggtg	1080
cggcggcagc	gggggtggcg	gctcggaggt	caagttacag	gagagcggac	cgggcttgggt	1140
cgcacctagc	cagagcctct	cagtcacgtg	cactgtgtct	ggagtcagtc	tcccagacta	1200
cggggtatca	tggatacgac	agccgcctag	aaagggtta	gagtggctgg	gggttatctg	1260
gggaagtgaa	accacatact	acaactcagc	tctcaagagc	cgctcacca	tcattaagga	1320
caacagtaag	tcgcaggttt	tcttaagat	gaactctctc	cagactgacg	acaccgctat	1380
ttactactgc	gcgaagcact	actactacgg	cgggagttac	gcaatggact	actgggggtca	1440
gggcacttct	gtgaccgtat	ccagcactac	taccccagcc	ccacgtcccc	ccacgccagc	1500
tccaacgata	gcaagtcagc	ccttatctct	tcgccctgag	gcttgcaggc	ccgcggcggg	1560
cggcgccgtt	cacacgcgag	gactagactt	cgcctcgcac	atctacatct	gggcaccact	1620
agccgggact	tgcggagtg	tgttggtgag	cttggttaata	acgctctact	gcaagcgtgg	1680
gagaaagaag	ctcttgata	ttttcaagca	gccattcatg	cgtcccgttc	agacgactca	1740
ggaggaggac	ggctgctcgt	gccgattccc	ggaggaggag	gagggcgggt	gcgaactcag	1800

ES 2 803 728 T3

agtgaagttc tctcgctccg cggacgcacc cgcttaccag cagggtcaga accagctata 1860
 caacgagtta aacctggggc gccgggagga gtacgacgtg ttagacaagc gtagaggtag 1920
 ggacccggag atgggaggca agcctcggag aaagaacccc caggagggcc tgtacaacga 1980
 actccagaag gacaagatgg ctgaggcgta ctcggagatt ggtatgaagg gcgagagacg 2040
 tcgcggaag ggacacgacg gcttatacca ggggctttcc accgcgacca aggacacata 2100
 cgacgcgctg cacatgcaag ccttaccacc tcgatgaggt accagcggcc gcttcgagca 2160
 gacatgataa gatacattga tgagtttga caaaccaaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa 2220
 tgctttattht gtgaaatttg tgatgctatt gctttattht taaccattat aagctgcaat 2280
 aaacaagtta aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg ctagacatga 2340
 ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtg tggcctggag caacaaatct gactttgcat 2400
 gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc agcccaggta 2460
 agggcagctt tgggtgcctc gcaggctgtt tccttgcttc aggaatggcc aggttctgcc 2520
 cagagctctg gtcaatgatg tctaaaactc ctctgattgg tggctctggc cttatccatt 2580
 gccacaaaaa ccctctthtt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag tccagagaat 2640
 gacacgggaa aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg cccagcctca 2700
 gtctctccaa ctgagttcct gcctgcctgc ctttgctcag actgtttgcc ccttactgct 2760
 cttctaggcc tcattctaag ccccttctcc aagttgcctc tccttatttc tcctgtctg 2820
 ccaaaaaatc tttccagct cactaagtca gtctcacgca gtcactcatt aaccaccaa 2880
 tcaactgattg tgccggcaca tgaatgcacc aggtgttgaa gtggaggaat taaaaagtca 2940
 gatgaggggt gtgccagag gaagcaccat tctagttggg ggagcccatc tgtcagctgg 3000
 gaaaagtcca aataacttca gattggaatg tgttttaact cagggttgag aaaacagcta 3060
 ccttcaggac aaaagtccag gaagggctct ctgaagaaat gctacttgaa gataccagcc 3120
 ctaccaaggg caggagagag accctataga ggcctgggac aggagctcaa tgagaaagga 3180
 gaagagcagc aggcattgag tgaatgaagg aggcagggcc gggtcacagg gccttctagg 3240
 ccatgagagg gtagacagta ttctaaggac gccagaaagc tgttgatcgg cttcaagcag 3300
 gggagggaca cctaatttgc tttctthttt thttthtttt thttthtttt thtttgagat 3360
 ggagttttgc tcttgttgcc caggctggag tgcaatggtg catcttggt cactgcaacc 3420
 tccgcctccc aggttcaagt gattctcctg cctcagcctc ccgagtagct gagattacag 3480
 gcacccgcca ccatgcctgg ctaathtttt gtathtttag tagagacagg gtttcaactat 3540
 gttggccagg ctggtctcga actcctgacc tcaggtgatc caccogcttc agcctcccaa 3600
 agtgctggga ttacaggcgt gagccaccac acccggcctg cttthcttaa agatcaatct 3660

ES 2 803 728 T3

gagtgctgta	cggagagtgg	gttghtaagcc	aagagtagaa	gcagaaaggg	agcagttgca	3720
gcagagagat	gatggaggcc	tgggcagggt	ggtggcaggg	aggtaaccaa	caccattcag	3780
gtttcaaagg	tagaaccatg	cagggatgag	aaagcaaaga	ggggatcaag	gaaggcagct	3840
ggattttggc	ctgagcagct	gagtcaatga	tagtgccgtt	tactaagaag	aaaccaagga	3900
aaaaatttgg	ggtgcaggga	tcaaaacttt	ttggaacata	tgaaagtacg	tgtttatact	3960
ctttatggcc	cttgtcacta	tgtatgcctc	gctgcctcca	ttggactcta	gaatgaagcc	4020
aggcaagagc	agggctctatg	tgtgatggca	catgtggcca	gggtcatgca	acatgtactt	4080
tgtacaaaca	gtgtatattg	agtaaataga	aatggtgtcc	aggagccgag	gtatcgggcc	4140
tgccagggcc	aggggctctc	cctagcaggt	gctcatatgc	tgtaagttcc	ctccagatct	4200
ctccacaagg	aggcatggaa	aggctgtagt	tgttcacctg	ccaagaact	aggaggtctg	4260
gggtgggaga	gtcagcctgc	tctggatgct	gaaagaatgt	ctgtttttcc	ttttagaaag	4320
ttcctgtgat	gtcaagctgg	tcgagaaaag	ctttgaaaca	ggtaagacag	gggtctagcc	4380
tgggtttgca	caggattgcg	gaagtgatga	accgcgaata	accctgcctg	gatgagggag	4440
tgggaagaaa	ttagtagatg	tgggaatgaa	tgatgaggaa	tggaaacagc	ggttcaagac	4500
ctgcccagag	ctgggtgggg	tctctcctga	atccctctca	ccatctctga	ctttccattc	4560
taagcacttt	gaggatgagt	ttctagcttc	aatagaccaa	ggactctctc	ctaggcctct	4620
gtattccttt	caacagctcc	actgtcaaga	gagccagaga	gagcttctgg	gtggcccagc	4680
tgtgaaatth	ctgagtcctt	tagggatagc	cctaaacgaa	ccagatcatc	ctgaggacag	4740
ccaagagggt	ttgccttctt	tcaagacaag	caacagtact	cacataggct	gtgggcaatg	4800
gtcctgtctc	tcaagaatcc	cctgccactc	ctcacacca	ccctgggccc	atattcattt	4860
ccatttgagt	tgttcttatt	gagtcacctt	tctctgtgta	gcggaactca	ctaagggggc	4920
catctggacc	cgaggtattg	tgatgataaa	ttctgagcac	ctaccccatc	cccagaaggg	4980
ctcagaaata	aaataagagc	caagtctagt	cggtgtttcc	tgtcttgaaa	cacaatactg	5040
ttggccctgg	aagaatgcac	agaatctggt	tgtaagggga	tatgcacaga	agctgcaagg	5100
gacaggaggt	gcaggagctg	caggcctccc	ccaccagcc	tgctctgctt	tggggaaaac	5160
cgtgggtgtg	tcttgcaggc	catgcaggcc	tgggacatgc	aagcccataa	ccgctgtggc	5220
ctcttggttt	tacagatacg	aacctaaact	ttcaaaacct	gtcagtgatt	gggttccgaa	5280
tctcctcct	gaaagtggcc	gggtttaatc	tgctcatgac	gctgcggctg	tggtccagct	5340
gaggtgaggg	gccttgaagc	tgggagtggg	gtttagggac	gcgggtctct	gggtgcatcc	5400
taagctctga	gagcaaacct	ccctgcaggg	tcttgctttt	aagtccaaag	cctgagccca	5460
ccaaactctc	ctacttcttc	ctgttacaaa	ttcctcttgt	gcaataataa	tggcctgaaa	5520
cgctgtaaaa	tatcctcatt	tcagccgcct	cagttgcact	tctcccctat	gaggtaggaa	5580

ES 2 803 728 T3

gaacagtgtg ttagaaacga agaaactgag gccccacagc taatgagtgg aggaagagag 5640
 aacttgtgt acaccacatg ccttgtgttg tacttctctc accgtgtaac ctctcatgt 5700
 cctctctccc cagtacggct ctcttagctc agtagaaaga agacattaca ctcatattac 5760
 accccaatcc tggctagagt ctccgcaccc tcctccccca ggggtccccag tcgtcttgct 5820
 gacaactgca tcctgttcca tcaccatcaa aaaaaaactc cagggtgggt gcgggggctc 5880
 acacctgtaa tcccagcact ttgggaggca gaggcaggag gagcacagga gctggagacc 5940
 agcctgggca acacagggag accccgcctc tacaanaagt gaaaaaatta accaggtgtg 6000
 gtgtgcaca cctgtagtcc cagctactta agaggctgag atgggaggat cgcttgagcc 6060
 ctggaatgtt gaggctacaa tgagctgtga ttgcgtcact gcactccagc ctggaagaca 6120
 aagcaagatc ctgtctcaaa taataaaaaa aataagaact ccagggtaca tttgctccta 6180
 gaactctacc acatagcccc aaacagagcc atcaccatca catccctaac agtccctgggt 6240
 cttcctcagt gtccagcctg acttctgttc ttcctcattc cagatctgca agattgtaag 6300
 acagcctgtg ctcccctcgt cttcctctg cattgcccct cttctccctc tccaaacaga 6360
 gggaactctc ctacccccaa ggaggtgaaa gctgctacca cctctgtgcc cccccggcaa 6420
 tgccaccaac tggatcctac ccgaatttat gattaagatt gctgaagagc tgccaaacac 6480
 tgctgccacc ccctctgttc ccttattgct gcttgtcact gcctgacatt cacggcagag 6540
 gcaaggctgc tgcagcctcc cctggctgtg cacattccct cctgctcccc agagactgcc 6600
 tccgccatcc cacagatgat ggatcttcag tgggttctct tgggctctag gtccctgcaga 6660
 atgttgtgag gggtttattt ttttttaata gtgttcataa agaaatacat agtattcttc 6720
 ttctcaagac gtggggggaa attatctcat tatcgaggcc ctgctatgct gtgtatctgg 6780
 gcgtgttcta tgcctgctg ccgatgcctt c 6811

<210> 122
 <211> 6811
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 122

atatccagaa ccctgaccct gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt 60
 ctgtctgcct attcaccgat tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg 120
 atgtgtatat gggcagagcg cacatcgcctc acagtccccg agaagttggg gggaggggctc 180
 ggcaattgaa cgggtgccta gagaagggtg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg 240
 tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc 300

ES 2 803 728 T3

gtgaacgttc tttttcgcaa cggggttgcc gccagaacac agctgaagct tgcaggggct 360
 cgcattctctc cttcacgcgc ccgccgcct acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt 420
 cgcgttctgc cgcctcccgc ctgtggtgcc tcttgaactg cgtccgcctg ctaggtaagt 480
 ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc cttggagcct acctagactc 540
 agccggctct ccacgctttg cctgaccctg cttgctcaac tctacgtctt tgtttcgttt 600
 tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc ctactctaga gctagcgcag 660
 tcagtgttc tgacacaaca gtctcgaact taactagcac catggegctc ccagtgcag 720
 ccttactttt acctctggcg ttattattgc acgcggctcg tcttgacata cagatgactc 780
 agactacctc ttccctatct gcttctttag gcgaccgagt aacaatatct tgccgggcca 840
 gccaggacat ctcaaaatac ttaaactggt atcagcagaa gccggacgga acagttaagt 900
 tgctcattta ccacacgtcg agattacact caggcgttcc tagccgattt tcgggttccg 960
 gttccggtac ggactacagc ctgacaatca gtaaccttga gcaggaggac atcgccacct 1020
 acttctgtca gcagggcaac acgctcccgt acacattcgg tgggggaact aagctggaga 1080
 ttaccggagg cggtggcagc ggtggcggcg gcagcggggg tggcggctcg gaggtcaagt 1140
 tacaggagag cggaccgggc ttggtcgcac ctagccagag cctctcagtc acgtgcaactg 1200
 tgtctggagt cagtctcca gactacgggg tatcatggat acgacagccg cctagaaagg 1260
 gcttagagtg gctgggggtt atctggggaa gtgaaaccac atactacaac tcagctctca 1320
 agagccgct caccatcatt aaggacaaca gtaagtcgca ggttttctta aagatgaact 1380
 ctctccagac tgacgacacc gctatttact actgcgcgaa gcaactactac tacggcggga 1440
 gttacgcaat ggactactgg ggtcagggca cttctgtgac cgtatccagc actactacc 1500
 cagccccacg tccccccacg ccagctcaa cgatagcaag tcagccctta tctcttcgcc 1560
 ctgaggcttg caggccccgc gcgggcggcg ccggtcacac gcgaggacta gacttcgcct 1620
 gcgacatcta catctgggca ccactagccg ggacttgccg agtgttggtg ttgagcttg 1680
 taataacgct ctactgcaag cgtgggagaa agaagctctt gtacattttc aagcagccat 1740
 tcatgcgtcc cgttcagacg actcaggagg aggacggctg ctcgtgccga ttcccggagg 1800
 aggaggagg cggttgcgaa ctcagagtga agttctctcg ctccgcggac gcacccgctt 1860
 accagcaggg tcagaaccag ctatacaacg agttaaacct ggggcgccgg gaggagtacg 1920
 acgtgttaga caagcgtaga ggtagggacc cggagatggg aggcaagcct cggagaaaga 1980
 acccccagga gggcctgtac aacgaactcc agaaggacaa gatggctgag gcgtactcgg 2040
 agattggtat gaagggcgag agacgtcgcg gaaagggaca cgacggctta taccaggggc 2100
 tttccaccgc gaccaaggac acatacgacg cgtgcacat gcaagcotta ccacctcgat 2160
 gaggtaccag cggccgcttc gagcagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac 2220

ES 2 803 728 T3

cacaactaga atgcagtgaa aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt 2280
atttghtaacc attataagct gcaataaaca agttcacaga caaaaactgtg ctagacatga 2340
ggtctatgga cttcaagagc aacagtgctg tggcctggag caacaaatct gactttgcat 2400
gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc agcccaggta 2460
agggcagctt tgggtgccttc gcaggctggt tccttgcttc aggaatggcc aggttctgcc 2520
cagagctctg gtcaatgatg tctaaaactc ctctgattgg tggctctggc cttatccatt 2580
gccaccaaaa ccctcttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag tccagagaat 2640
gacacgggaa aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg cccagcctca 2700
gtctctccaa ctgagttcct gcctgcctgc ctttgctcag actgtttgcc cettactgct 2760
cttctaggcc tcattctaag ccccttctcc aagttgcctc tccttatttc tcctgtctg 2820
ccaaaaaatc tttcccagct cactaagtca gtctcacgca gtcaactcatt aaccaccaa 2880
tcaactgattg tgcccgcaca tgaatgcacc aggtggtgaa gtggaggaat taaaaagtca 2940
gatgaggggt gtgcccagag gaagcaccat tctagttggg ggagcccatc tgtcagctgg 3000
gaaaagtcca aataacttca gattggaatg tgttttaact cagggttgag aaaacagcta 3060
ccttcaggac aaaagtcagg gaagggctct ctgaagaaat gctacttgaa gataccagcc 3120
ctaccaaggg cagggagagg accctataga ggcctgggac aggagctcaa tgagaaagga 3180
gaagagcagc aggcctgagt tgaatgaagg aggcagggcc gggtcacagg gccttctagg 3240
ccatgagagg gtagacagta ttctaaggac gccagaaagc tgttgatcgg cttcaagcag 3300
gggagggaca cctaatttgc ttttcttttt tttttttttt tttttttttt tttttgagat 3360
ggagttttgc tcttgttgcc caggctggag tgcaatggtg catcttggct cactgcaacc 3420
tccgcctccc aggttcaagt gattctcctg cctcagcctc ccgagtagct gagattacag 3480
gcacccgccca ccatgcctgg ctaatttttt gtattttttag tagagacagg gtttcaactat 3540
gttggccagg ctggtctcga actcctgacc tcaggtgatc cccccgctc agcctcccaa 3600
agtgctggga ttacaggcgt gagccaccac acccggcctg cttttcttaa agatcaatct 3660
gagtgctgta cggagagtgg gttgtaagcc aagagtagaa gcagaaaggg agcagttgca 3720
gcagagagat gatggaggcc tgggcagggg ggtggcaggg aggtaaccaa caccattcag 3780
gtttcaaagg tagaaccatg cagggatgag aaagcaaaga ggggatcaag gaaggcagct 3840
ggattttggc ctgagcagct gagtcaatga tagtgccggt tactaagaag aaaccaagga 3900
aaaaatttgg ggtgcaggga tcaaaaactt ttggaacata tgaaagtacg tgtttatact 3960
ctttatggcc cttgtcacta tgtatgcctc gctgcctcca ttggactcta gaatgaagcc 4020
aggcaagagc agggctctatg tgtgatggca catgtggcca gggctcatgca acatgtactt 4080

ES 2 803 728 T3

tgtacaaaca gtgtatattg agtaaataga aatgggtgtcc aggagccgag gtatcgggtcc 4140
 tgccagggcc aggggctctc cctagcaggt gctcatatgc tgtaagttcc ctccagatct 4200
 ctccacaagg aggcatggaa aggctgtagt tgttcacctg cccaagaact aggaggtctg 4260
 ggggtgggaga gtcagcctgc tctggatgct gaaagaatgt ctgtttttcc ttttagaaag 4320
 ttctgtgat gtcaagctgg tcgagaaaag ctttgaaaca ggtaagacag gggcttagacc 4380
 tgggtttgca caggattgcg gaagtgatga acccgcaata accctgctg gatgagggag 4440
 tgggaagaaa ttagtagatg tgggaatgaa tgatgaggaa tggaaacagc ggttcaagac 4500
 ctgccagag ctgggtgggg tctctcctga atccctctca ccatctctga ctttccattc 4560
 taagcacttt gaggatgagt ttctagcttc aatagaccaa ggactctctc ctaggcctct 4620
 gtattccttt caacagctcc actgtcaaga gagccagaga gagcttctgg gtggcccagc 4680
 tgtgaaatth ctgagtcctt tagggatagc cctaaacgaa ccagatcatc ctgaggacag 4740
 ccaagaggtt ttgccttctt tcaagacaag caacagtact cacataggct gtgggcaatg 4800
 gtcctgtctc tcaagaatcc cctgccactc ctcacaccca ccctgggccc atattcattt 4860
 ccatttgagt tgttcttatt gagtcatcct tcctgtggta gcggaactca ctaaggggcc 4920
 catctggacc cgaggatttg tgatgataaa ttctgagcac ctaccccatc ccagaaggg 4980
 ctcagaaata aaataagagc caagtctagt cgggtgtttcc tgtcttgaaa cacaatactg 5040
 ttggccctgg aagaatgcac agaactctgt tgtaagggga tatgcacaga agctgcaagg 5100
 gacaggaggt gcaggagctg caggcctccc ccaccagcc tgctctgcct tggggaaaac 5160
 cgtgggtgtg tcctgcaggc catgcaggcc tgggacatgc aagccataa ccgctgtggc 5220
 ctcttggttt tacagatacg aacctaaact ttcaaaacct gtcagtgatt gggttccgaa 5280
 tcctcctcct gaaagtggcc gggtttaatc tgctcatgac gctgcggctg tgggtccagct 5340
 gaggtgaggg gccttgaagc tgggagtggg gtttagggac gcgggtctct ggggtgcatcc 5400
 taagctctga gagcaaacct ccctgcaggg tcttgctttt aagtccaaag cctgagccca 5460
 ccaaactctc ctacttcttc ctgttacaaa tcctcctgt gcaataataa tggcctgaaa 5520
 cgctgtaaaa tatcctcatt tcagccgct cagttgcact tctccctat gaggtaggaa 5580
 gaacagttgt ttagaaacga agaaactgag gccccacagc taatgagtgg aggaagagag 5640
 acacttggtg acaccacatg ccttggtgtg taactctctc accgtgtaac ctctcatgt 5700
 cctctctccc cagtacggct ctcttagctc agtagaaaga agacattaca ctcatattac 5760
 accccaatcc tggctagagt ctccgcaccc tcctcccca ggggtcccag tcgtcttgct 5820
 gacaactgca tcctgttcca tcaccatcaa aaaaaactc caggctgggt gcgggggctc 5880
 acacctgtaa tcccagcact ttgggaggca gaggcaggag gagcacagga gctggagacc 5940
 agcctgggca acacagggag accccgcctc tacaaaaagt gaaaaaatta accaggtgtg 6000

ES 2 803 728 T3

gtgctgcaca cctgtagtcc cagctactta agaggctgag atgggaggat cgcttgagcc 6060
ctggaatggt gaggtacaa tgagctgtga ttgcgtcact gcaactccagc ctggaagaca 6120
aagcaagatc ctgtctcaaa taataaaaaa aataagaact ccagggtaca tttgctccta 6180
gaactctacc acatagcccc aaacagagcc atcaccatca catccctaac agtcctgggt 6240
cttcctcagt gtccagcctg acttctgttc ttccctcattc cagatctgca agattgtaag 6300
acagcctgtg ctccctcgct ccttcctctg cattgcccct cttctccctc tccaaacaga 6360
gggaactctc ctacccccaa ggaggtgaaa gctgctacca cctctgtgcc cccccggcaa 6420
tgccaccaac tggatcctac ccgaatttat gattaagatt gctgaagagc tgccaaacac 6480
tgctgccacc ccctctgttc ccttattgct gcttgtcact gcctgacatt cacggcagag 6540
gcaaggctgc tgcagcctcc cctggctgtg cacattccct cctgctcccc agagactgcc 6600
tccgccatcc cacagatgat ggatcttcag tgggttctct tgggctctag gtccctgcaga 6660
atgttgtgag gggtttattt ttttttaata gtgttcataa agaaatacat agtattcttc 6720
ttctcaagac gtgggggggaa attatctcat tatcgaggcc ctgctatgct gtgtatctgg 6780
gcgtgttgta tgtcctgctg ccgatgcctt c 6811

<210> 123
<211> 6040
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintetizado

<400> 123

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggccccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag 60
cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120
gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaaac 300
acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360
agctcccgct ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc 540
cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttttag ggttccgatt 600
tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
gccatcgcgc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 720

ES 2 803 728 T3

tggactcttg	ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	tcggtctatt	cttttgattt	780
ataagggatt	ttgccgattt	cggcctattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	840
taacgcgaat	tttaacaaaa	tattaacgct	tacaatttaa	atatttgctt	atacaatctt	900
cctgtttttg	gggcttttct	gattatcaac	cggggtacat	atgattgaca	tgctagtttt	960
acgattaccg	ttcatcgccc	tgcgcgctcg	ctcgctcact	gaggccgccc	gggcaaagcc	1020
cgggcgtcgg	gcgacctttg	gtcgcccggc	ctcagtgagc	gagcgagcgc	gcagagaggg	1080
agtggaattc	acgcgtgata	tccagaacct	tgaccctgcc	gtgtaccagc	tgagagactc	1140
taaatccagt	gacaagtctg	tctgcctatt	caccgatttt	gattctcaaa	caaatgtgtc	1200
acaaagtaag	gattctgatg	tgcatatcac	agacaaaact	gtgctagaca	tgaggcttat	1260
ggacttcaag	agcaacagtg	ctgtggcctg	gagcaactag	tgggcggagt	tagggcggag	1320
ccaatcagcg	tgcgccgttc	cgaaagttgc	cttttatggc	tgggcggaga	atgggcggtg	1380
aacgccgatg	attatataag	gacgcgccgg	gtgtggcaca	gctagttccg	tcgcagccgg	1440
gatttgggtc	gcggttcttg	tttgttccgg	aaagccacca	tggcgctccc	agtgcagccc	1500
ttacttttac	ctctggcggt	attattgcac	gcggctcgtc	ctgacataca	gatgactcag	1560
actacctctt	ccctatctgc	ttctttaggc	gaccgagtaa	caatatcttg	ccgggccagc	1620
caggacatct	caaaatactt	aaactggtat	cagcagaagc	cggacggaac	agttaagttg	1680
ctcatttacc	acacgtcgag	attacactca	ggcggttcta	gccgattttc	gggttccgggt	1740
tccggtacgg	actacagcct	gacaatcagt	aaccttgagc	aggaggacat	cgccacctac	1800
ttctgtcagc	agggcaacac	gctcccgtac	acattcggtg	ggggaactaa	gctggagatt	1860
accggaggcg	gtggcagcgg	tggcggcggc	agcgggggtg	gcccgtcggg	ggtcaagtta	1920
caggagagcg	gaccgggctt	ggtcgcacct	agccagagcc	tctcagtcac	gtgcaactgtg	1980
tctggagtca	gtctcccaga	ctacggggta	tcatggatac	gacagccgcc	tagaaagggc	2040
ttagagtggc	tgggggttat	ctggggaagt	gaaaccacat	actacaactc	agctotcaag	2100
agccgcctca	ccatcattaa	ggacaacagt	aagtcgcagg	ttttcttaa	gatgaactct	2160
ctccagactg	acgacaccgc	tatttactac	tgcgcgaagc	actactacta	cggcgggagt	2220
tacgcaatgg	actactgggg	tcagggcact	tctgtgaccg	tatccagcac	tactacccca	2280
gccccacgtc	ccccacgcc	agctccaacg	atagcaagtc	agcccttata	tottcgcctt	2340
gaggcttgca	ggccccgcgg	gggcggcggc	gttcacacgc	gaggactaga	cttcgcctgc	2400
gacatctaca	tctgggcacc	actagccggg	acttgccggg	tgttggtggt	gagcttggtg	2460
ataacgctct	actgcaagcg	tgggagaaag	aagctcttgt	acattttcaa	gcagccattc	2520
atgcgtcccg	ttcagacgac	tcaggaggag	gacggctgct	cgtgccgatt	ccgggaggag	2580
gaggagggcg	gttgcgaact	cagagtgaag	ttctctcgct	ccgcggacgc	accgccttac	2640

ES 2 803 728 T3

cagcagggtc agaaccagct atacaacgag ttaaacctgg ggcgcgggga ggagtacgac 2700
 gtgttagaca agcgtagagg tagggaccog gagatgggag gcaagcctcg gagaaagaac 2760
 ccccaggagg gcctgtacaa cgaactccag aaggacaaga tggctgaggc gtactcggag 2820
 attggtatga agggcgagag acgtcgcgga aagggacacg acggcttata ccaggggctt 2880
 tccaccgca ccaaggacac atacgacgog ctgcacatgc aagccttacc acctcgatga 2940
 taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 3000
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacctat tataagctgc aataaacaag 3060
 ttctagagca acaaactctga ctttgcattg gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca 3120
 gaagacacct tcttccccag cccaggtaag ggcagctttg gtgccttcgc aggctgtttc 3180
 cttgcttcag gaatggccag gttctgcca gagctctggg caatgatgic taaaactcct 3240
 ctgattgcaa ttgcctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc 3300
 gggcgtcggg cgacctttgg tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagagggga 3360
 gtggccaacc ccggcgattc tcttgtttgc tccagactct caggcaatga cctgatagcc 3420
 tttgtacctg caggtctcaa aaatagctac cctctccggc atgaatttat cagctagaac 3480
 ggttgaatat catattgatg gtgatttgac tgtctccggc ctttctcacc cgtttgaatc 3540
 tttacctaca cttactcag gcattgcatt taaaatatat gagggttcta aaaatthtta 3600
 tccttgcgtt gaaataaagg cttctcccgc aaaagtatta cagggtcata atgtttttgg 3660
 tacaaccgat ttagctttat gctctgaggc tttattgctt aatthtgcta attctttgcc 3720
 ttgcctgtat gatttattgg atgttggaaat tcctgatgog gtatthtctc cttacgcate 3780
 tgtgcggtat ttcacaccgc atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgocgcat 3840
 agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc 3900
 tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt 3960
 tttcaccgic atcaccgaaa cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatthttat 4020
 aggttaatgt catgataata atggthtctt agacgtcagg tggcacttht cggggaaatg 4080
 tgcgcggaac ccctatthgt ttatthttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 4140
 gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 4200
 atthccgtgt cgcccttatt ccctthtttg cggcattthg ccttctgtt thtgcctacc 4260
 cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 4320
 tcgaaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagtht tcgccccgaa gaacgtthtc 4380
 caatgatgag cactthttaa gttctgctat gtggcgcggg attatccogt attgacgccc 4440
 ggcaagagca actcggctcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 4500

ES 2 803 728 T3

cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 4560
 taaccatgag tgataaact gcgccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 4620
 agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 4680
 cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 4740
 caacaacggt gcgcaaaact ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 4800
 taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 4860
 ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 4920
 cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 4980
 aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 5040
 attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 5100
 ttttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 5160
 aacgtgagtt ttcggtccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 5220
 gagatccttt ttttctgctg gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 5280
 cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 5340
 gcagagcgca gataccaaact actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 5400
 agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaact cctgttacca gtggctgctg 5460
 ccagtggcga taagtctgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 5520
 cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct 5580
 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaagggg 5640
 gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc 5700
 ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 5760
 agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 5820
 cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 5880
 tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 5940
 gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcgggaagag cgcccaatac 6000
 gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg 6040

<210> 124

<211> 8342

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Sintetizado

<400> 124

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggccc caccgatcgc ccttccaac agttgcgag 60

ES 2 803 728 T3

cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120
gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac 300
acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360
agctcccgct ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgtc ttcttccctt cctttctcgc 540
cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt 600
tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
gccatcgcgc tgatagacgg tttttcgcgc tttgacgttg gagtccaagt tctttaatag 720
tggactcttg ttccaaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
taacgcgaat ttaacaaaaa tattaacggt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg 1020
accaaagtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 1080
cagagagggga gtggccaact ccatcactag gggttcctac gcgtagatct catattctgg 1140
cagggtcagt ggctccaact aacatttggt tggacttta cagtttatta aatagatggt 1200
tatatggaga agctctcatt tctttctcag aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca 1260
ccatattcat tttgcaggtg aaattcctga gatgtaagga gctgctgtga cttgctcaag 1320
gccttatatc gagtaaacgg tagcgtggg gcttagacgc aggtgttctg atttatagtt 1380
caaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagatttc ccaacttaat 1440
gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgccagc ctaagttggg gagaccactc 1500
cagattccaa gatgtacagt ttgctttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct 1560
gccagagtta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataagcagta 1620
ttattaagta gccctgcatt tcaggtttcc ttgagtggca ggccaggcct ggcctgaaac 1680
gttactgaa atcatggcct cttggccaag attgatagct tgtgcctgtc cctgagtccc 1740
agtccatcac gagcagctgg tttctaagat gctatttccc gtataaagca tgagaccgtg 1800
acttgccagc cccacagagc ccgcctttg tccatcactg gcactctggac tccagcctgg 1860
gttggggcaa agaggggaaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata 1920

ES 2 803 728 T3

tccagaaccc	tgaccctgcc	gtgtaccagc	tgagagactc	taaatccagt	gacaagtctg	1980
tctgcctatt	caccgatttt	gattctcaaa	caaatgtgtc	acaaagtaag	gattctgatg	2040
tgtatatcac	agacaaaact	gtgctagaca	tgaggctctat	ggacttcaag	agcaacagtg	2100
ctgtggcctg	gagcaactag	tcaatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	2160
gcataaatca	atattggcta	ttggccattg	catacgttgt	atctatatca	taatatgtac	2220
atztatattg	gctcatgtcc	aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gaccagttat	2280
taatagtaat	caattacggg	gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	2340
taacttacgg	taaatggccc	gcctggctga	ccgcccacg	acccccgcc	attgacgtca	2400
ataatgacgt	atgttcccat	agtaacgcc	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	2460
gagtatttac	ggtaaactgc	ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcataa	tccaagtccg	2520
ccccctattg	acgtcaatga	cggtaaattg	cccgcctggc	attatgcca	gtacatgacc	2580
ttacgggact	ttcctacttg	gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	taccatgatg	2640
atgcggtttt	ggcagtacac	caatgggcgt	ggatagcggg	ttgactcacg	gggatttcca	2700
agtctccacc	ccattgacgt	caatgggagt	ttgttttggc	acaaaaatca	acgggacttt	2760
ccaaaatgtc	gtaataaccc	cgccccgttg	acgcaaatgg	gcggtagggc	tgtacgggtg	2820
gaggcttata	taagcagagc	tcgttttagtg	aaccgtcaga	tcactagaag	ctttattgcg	2880
gtagtttatc	acagttaaat	tgctaacgca	gtcagtgctt	ctgacacaac	agtctcgaac	2940
ttaagctgca	gaagttggtc	gtgaggcact	gggcaggtaa	gtatcaaggt	tacaagacag	3000
gtttaaggag	accaatagaa	actgggcttg	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	3060
taggcaccta	ttggtcttac	tgacatccac	tttgcctttc	tctccacagg	tgtccactcc	3120
cagttcaatt	acagctctta	aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggccaccatg	3180
gcgctcccag	tgacagcctt	acttttacct	ctggcgttat	tattgcaocg	ggctcgtcct	3240
gacatacaga	tgactcagac	tacctcttcc	ctatctgctt	ctttaggcga	ccgagtaaca	3300
atatcttgcc	gggccagcca	ggacatctca	aaatacttaa	actggtatca	gcagaagccg	3360
gacggaacag	ttaagttgct	catttaccac	acgtcgagat	tacactcagg	cgttcctagc	3420
cgattttcgg	gttccggttc	cggtacggac	tacagcctga	caatcagtaa	ccttgagcag	3480
gaggacatcg	ccacctactt	ctgtcagcag	ggcaacacgc	tcccgtacac	attcgggtggg	3540
ggaactaagc	tggagattac	cggaggcggg	ggcagcgggtg	gcggcggcag	cggggggtggc	3600
ggctcggagg	tcaagttaca	ggagagcggg	ccgggcttgg	tcgcacctag	ccagagcctc	3660
tcagtcacgt	gcaactgtgtc	tggagtcagt	ctcccagact	acgggggtatc	atggatacga	3720
cagccgccta	gaaagggctt	agagtggctg	ggggttatct	ggggaagtga	aaccacatac	3780
tacaactcag	ctctcaagag	ccgcctcacc	atcattaagg	acaacagtaa	gtcgcaggtt	3840

ES 2 803 728 T3

ttcttaaaga tgaactctct ccagactgac gacaccgcta ttactactg cgogaagcac 3900
 tactactacg gcgggagtta cgcaatggac tactggggtc agggcacttc tgtgaccgta 3960
 tccagcacta ctaccccagc cccacgtccc cccacgccag ctccaacgat agcaagtcat 4020
 cccttatctc ttgcacctga ggcttgacgg cccgcggcgg gcggcgccgt tcacacgcga 4080
 ggactagact tcgcctgcga catctacatc tgggcaccac tagccgggac ttgcggagtg 4140
 ttgttgttga gcttggtaat aacgctctac tgcaagcgtg ggagaaagaa gctcttgtac 4200
 attttcaagc agccattcat gcgtcccggt cagacgactc aggaggagga cggctgctcg 4260
 tgccgattcc cggaggagga ggagggcggg tgcgaactca gagtgaagtt ctctcgctcc 4320
 gcggacgcac ccgcttacca gcagggtcag aaccagctat acaacgagtt aaacctgggg 4380
 cgccgggagg agtacgacgt gttagacaag cgtagaggta gggaccggga gatgggaggc 4440
 aagcctcggg gaaagaacct ccaggagggc ctgtacaacg aactccagaa ggacaagatg 4500
 gctgaggcgt actcggagat tggatgaag ggcgagagac gtcgcggaaa gggacacgac 4560
 ggcttatacc aggggctttc caccgcgacc aaggacacat acgacgcgct gcacatgcaa 4620
 gccttaccac ctcgatgagg taccagcggc cgcttcgagc agacatgata agatacattg 4680
 atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaatth 4740
 gtgatgctat tgctttatth gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca 4800
 attcgaatth aaatcggatc cgcaacaaat ctgactttgc atgtgcaaac gccttcaaca 4860
 acagcattat tccagaagac accttcttcc ccagcccagg taagggcagc tttggtgcct 4920
 tcgcaggctg tttccttget tcaggaatgg ccaggttctg cccagagctc tggatcaatga 4980
 tgtctaaaac tcctctgatt ggtggtctcg gccttatcca ttgccaccaa aacctcttt 5040
 ttactaagaa acagtgagcc ttgttctggc agtccagaga atgacacggg aaaaaagcag 5100
 atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct cagtctctcc aactgagttc 5160
 ctgcctgcct gcctttgctc agactgttg ccccttactg ctcttctagg cctcattcta 5220
 agccccttct ccaagttgcc tctccttatt tctccctgct tgccaaaaaa tctttcccag 5280
 ctactaagt cagtctcacg cagtcaactc ttaaccacc aatcactgat tgtgccggca 5340
 catgaatgca ccagggtgtg aagtggagga attaaaaagt cagatgaggg gtgtgccag 5400
 aggaagcacc attctagttg ggggagccca tctgtcagct gggaaaagtc caaataactt 5460
 cagattggaa tgtgttttaa ctcaggggtg agaaaacagc caccttcagg acaaaagtca 5520
 gggaaaggct ctctgaagaa atgctacttg aagataccag ccctaccaag ggcagggaga 5580
 ggaccaattg atggagttgg ccaactccctc tctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc 5640
 ccgggcaaaag cccgggcgctc gggcgacctt tggctgcccg gcctcagtga gcgagcgagc 5700

ES 2 803 728 T3

gcgcagagag ggagtggcca acggcgcgcc tgcaggtctc aaaaatagct accctctccg 5760
 gcatgaatth atcagctaga acggttgaat atcatattga tggatgattg actgtctccg 5820
 gcctttctca cccgtttgaa tctttaccta cacattactc aggcattgca tttaaaatat 5880
 atgaggggtc taaaaattht tatccttgcg ttgaaataaa ggcttctccc gcaaaagtat 5940
 tacaggggtc taatgtthtt ggtacaaccg atttagctth atgctctgag gctthattgc 6000
 ttaatthttg taattctthg ccttgccctg atgattthatt ggatgttgga attcctgatg 6060
 cggatthttc tccttacgca tctgtgcggg atthcacacc gcatatggg cactctcagt 6120
 acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac 6180
 gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc 6240
 gggagctgca tgtgtcagag gthttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc 6300
 ctctgtgata gcctatthtt ataggttaat gtcataataa taatggthtt ttagacgtca 6360
 ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctatth gthttatthtt ctaaatacat 6420
 tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa 6480
 aggaagagta tgagtattca acatthccgt gtgcacctta ttcctthttt tgcggcattt 6540
 tgccttctg thtttgctca cccagaaaac ctgggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag 6600
 ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt 6660
 thtcgccccg aagaacgtht tccaatgatg agcactthta agthtctgct atgtggcgcg 6720
 gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag 6780
 aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta 6840
 agagaattat gcagtgtctc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa ctacttctg 6900
 acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gctthtttgc acaacatggg ggatcatgta 6960
 actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac 7020
 accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt 7080
 actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca 7140
 cttctgcgct cggcccttcc ggtggctgg thttattgctg ataaatctgg agccgggtgag 7200
 cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta 7260
 gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtctgag 7320
 ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagthtactc atatatactt 7380
 tagattgatt taaaacttca thtttaatth aaaaggatct aggtgaagat cthttttgat 7440
 aatctcatga ccaaatccc ttaacgtgag thttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 7500
 gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct thttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 7560
 acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 7620

ES 2 803 728 T3

tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag 7680
 ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta 7740
 atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca 7800
 agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag 7860
 cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 7920
 agcgcacgc tttccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga 7980
 acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc 8040
 gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggaggagc 8100
 ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 8160
 gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 8220
 gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 8280
 gaagcgggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcggttgcc gattcattaa 8340
 tg 8342

<210> 125
 <211> 7464
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 125

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttccaac agttgocgag 60
 cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120
 gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
 agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgogaca 240
 acggttaatt tgcgtgatgg acagactcct ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaac 300
 acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc ctttaacgg cctcctgttt 360
 agctcccgt ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
 gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcctttcgtt ttcttccctt cctttctcgc 540
 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt 600
 tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
 gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaaatag 720
 tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780

ES 2 803 728 T3

ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
 taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
 cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cgggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
 acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggcgcggcg 1020
 accaaaagtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 1080
 cagagagga gtggccaact ccatcactag gggttcctac gcgtagatct catattctgg 1140
 cagggtcagt ggctccaact aacatttggt tggacttta cagtttatta aatagatggt 1200
 tatatggaga agctctcatt tctttctcag aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca 1260
 ccatattcat tttgcagggtg aaattcctga gatgtaagga gctgctgtga cttgctcaag 1320
 gccttatatc gagtaaacgg tagcgctggg gcttagacgc aggtgttctg atttatagtt 1380
 caaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagatttc ccaacttaat 1440
 gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgcccagc ctaagttggg gagaccactc 1500
 cagattccaa gatgtacagt ttgctttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct 1560
 gccagagtta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaga ataagcagta 1620
 ttattaagta gccctgcatt tcaggtttcc ttgagtggca ggccaggcct ggccgtgaac 1680
 gttcactgaa atcatggcct cttggccaag attgatagct tgtgcctgtc cctgagtccc 1740
 agtccatcac gagcagctgg tttctaagat gctatttccc gtataaagca tgagaccgtg 1800
 acttgccagc cccacagagc cccgcccttg tccatcactg gcactctggac tccagcctgg 1860
 gttggggcaa agagggaaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata 1920
 tccagaacct tgaccctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg 1980
 tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg 2040
 tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggctctat ggacttcaag agcaacagtg 2100
 ctgtggcctg gagcaactag tgggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgcgcggttc 2160
 cgaaagttgc cttttatggc tgggcggaga atgggcgggtg aacgccgatg attatataag 2220
 gacgcgccgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc ggggttcttg 2280
 tttgttccgg aaagccacca tggcgcctcc agtgacagcc ttacttttac ctctggcggt 2340
 attattgcac gcggctcgtc ctgacataca gatgactcag actacctt cctatctgc 2400
 ttctttaggc gaccgagtaa caatatcttg ccgggccagc caggacatct caaaatactt 2460
 aaactggtat cagcagaagc cggacggaac agttaagttg ctcatthacc acacgtcgag 2520
 attacactca ggcgttccta gccgattttc gggttccgggt tccggtaagg actacagcct 2580
 gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cggcacctac ttctgtcagc agggcaacac 2640
 gctcccgtac acattcgggtg ggggaactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagcgg 2700

ES 2 803 728 T3

tggcggcggc	agcgggggtg	gcggtctcgga	ggtcaagtta	caggagagcg	gaccgggctt	2760
ggtcgcacct	agccagagcc	tctcagtcac	gtgcaactgtg	tctggagtca	gtctcccaga	2820
ctacggggta	tcatggatac	gacagccgcc	tagaaagggc	ttagagtggc	tgggggttat	2880
ctggggaagt	gaaaccacat	actacaactc	agctctcaag	agccgcctca	ccatcattaa	2940
ggacaacagt	aagtcgcagg	ttttcttaaa	gatgaactct	ctccagactg	acgacaccgc	3000
tatttactac	tgcgcgaagc	actactacta	cggcgggagt	tacgcaatgg	actactgggg	3060
tcagggcact	tctgtgaccg	tatccagcac	tactacccca	gccccacgtc	ccccacgcc	3120
agctccaacg	atagcaagtc	agcccttata	tcttcgccct	gaggcttgca	ggcccgcggc	3180
ggcggcggc	gttcacacgc	gaggactaga	cttcgcctgc	gacatctaca	tctgggcacc	3240
actagccggg	acttgccggag	tgttgttggt	gagcttggtg	ataacgctct	actgcaagcg	3300
tgggagaaag	aagctcttgt	acattttcaa	gcagccattc	atgcgtcccg	ttcagacgac	3360
tcaggaggag	gacggctgct	cgtgccgatt	cccggaggag	gaggagggcg	gttgcgaact	3420
cagagtgaag	ttctctcgct	ccgcggacgc	acccgcttac	cagcagggtc	agaaccagct	3480
atacaacgag	ttaaacctgg	ggcgccggga	ggagtacgac	gtgttagaca	agcgtagagg	3540
tagggacccg	gagatgggag	gcaagcctcg	gagaaagaac	cccaggagg	gcctgtacaa	3600
cgaactccag	aaggacaaga	tggctgaggc	gtactcggag	attggtatga	agggcgagag	3660
acgtcgcgga	aagggacacg	acggcttata	ccaggggctt	tccaccgca	ccaaggacac	3720
atacgacgcg	ctgcacatgc	aagccttacc	acctcgatga	ggtaccagcg	gccgcttcga	3780
gcagacatga	taagatacat	tgatgagttt	ggacaaacca	caactagaat	gcagtgaaaa	3840
aaatgcttta	tttgtgaaat	ttgtgatgct	attgctttat	ttgtaaccat	tataagctgc	3900
aataaacaag	ttaacaacaa	caattcgaat	ttaaatacga	tccgcaacaa	atctgacttt	3960
gcatgtgcaa	acgccttcaa	caacagcatt	attccagaag	acaccttctt	cccagccca	4020
ggtaagggca	gctttggtgc	cttcgcaggc	tgtttccttg	cttcaggaat	ggccaggttc	4080
tgcccagagc	tctggtcaat	gatgtctaaa	actcctctga	ttggtggtct	cggccttata	4140
cattgccacc	aaaaccctct	ttttactaag	aaacagtgag	ccttgttctg	gcagtccaga	4200
gaatgacacg	ggaaaaaagc	agatgaagag	aaggtggcag	gagagggcac	gtggcccagc	4260
ctcagtctct	ccaactgagt	tcctgcctgc	ctgcctttgc	tcagactggt	tgccccttac	4320
tgctcttcta	ggcctcattc	taagcccctt	ctccaagttg	cctctcctta	tttctccctg	4380
tctgccaaaa	aatctttccc	agctcactaa	gtcagtctca	cgcagtcaact	cattaaccca	4440
ccaatcactg	attgtgccgg	caatgaatg	caccaggtgt	tgaagtggag	gaattaaana	4500
gtcagatgag	gggtgtgccc	agaggaagca	ccattctagt	tgggggagcc	catctgtcag	4560

ES 2 803 728 T3

ctgggaaaag tccaaataac ttcagattgg aatgtgtttt aactcagggt tgagaaaaca 4620
 gccaccttca ggacaaaagt caggggaaggg ctctctgaag aaatgctact tgaagatacc 4680
 agccctacca agggcagggga gaggaccaat tgatggagtt ggccactccc tctctgocg 4740
 ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggocg tcgggocgacc tttggtcgcc 4800
 cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caacggcgcg cctgcaggtc 4860
 tcaaaaatag ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt 4920
 gatggtgatt tgactgtctc cggcctttct caccogtttg aatctttacc tacacattac 4980
 tcaggcattg catttaaaat atatgagggt tctaaaaatt tttatccttg cgttgaaata 5040
 aaggcttctc ccgcaaaaagt attacagggt cataatgttt ttggtacaac cgatttagct 5100
 ttatgctctg aggctttatt gcttaatttt gctaattctt tgccctgcct gtatgattta 5160
 ttggatgttg gaattcctga tgcggtatth tctccttacg catctgtgocg gtatttcaca 5220
 ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg 5280
 acaccgccca acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccg catccgctta 5340
 cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc 5400
 gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatth ttataggtta atgtcatgat 5460
 aataatggtt tcttagacgt cagggtggcac ttttcgggga aatgtgocg gaaccctat 5520
 ttgtttatth ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aacctgata 5580
 aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcct 5640
 tattccctth tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgtggtgaa 5700
 agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtggt tacatcgaac tggatctcaa 5760
 cagcggtaag atccttgaga gttttcgcgc cgaagaacgt tttccaatga tgagcactth 5820
 taaagtctg ctatgtggcg cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg 5880
 tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 5940
 tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtataa 6000
 cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgcttttt 6060
 gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 6120
 cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaaca cgttgocgca 6180
 actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 6240
 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgocg ctocggcctt ccggctggct ggtttattgc 6300
 tgataaatct ggagccgggtg agcgtgggtc tcgocgtatc attgcagcac tggggccaga 6360
 tggtaaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 6420
 acgaaataga cagatcgcctg agatagggtc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 6480

ES 2 803 728 T3

ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	6540
ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaaate	ccttaacgtg	agttttcgtt	6600
ccactgagcg	tcagacccccg	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	6660
gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	tttgtttgcc	6720
ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	6780
aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	6840
gcctacatac	ctcgtcttgc	taatcctggt	accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	6900
gtgtcttacc	gggttgact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	6960
aacggggggt	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	7020
cctacagcgt	gagctatgag	aaagcgccac	gcttcccgaa	gggagaaagg	cggacaggta	7080
tccggtaaac	ggcagggtcg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	7140
ctggtatctt	tatagtcctg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gatttttgtg	7200
atgctcgtca	ggggggcgga	gcctatggaa	aaacgccagc	aacgcggcct	ttttacggtt	7260
cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcggttatccc	ctgattctgt	7320
ggataaccgt	attaccgcct	ttgagtgagc	tgataccgct	cgccgcagcc	gaacgaccga	7380
gcgcagcgag	tcagtgagcg	aggaagcgga	agagcgccca	atacgcaaac	cgcctctccc	7440
cgcgcggttg	ccgattcatt	aatg				7464

REIVINDICACIONES

1. Un linfocito T humano genéticamente modificado que comprende en su genoma un gen de región constante alfa del receptor de linfocitos T humano (TCR) modificado, en el que el gen de la región constante alfa del TCR humano modificado comprende de 5' a 3':

- 5 (a) una región 5' del gen de la región constante alfa del TCR humano;
 (b) un polinucleótido exógeno que codifica un receptor de antígeno quimérico; y
 (c) una región 3' del gen de la región constante alfa del TCR humano;

10 en el que dicho polinucleótido exógeno se inserta en dicho gen de región constante alfa de TCR entre las posiciones 13 y 14 de la SEQ ID NO:3, y en el que dicho receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a ligando extracelular y uno o más dominios de señalización intracelular, y en el que dicho linfocito T humano genéticamente modificado no expresa un TCR endógeno en la superficie celular.

2. El linfocito T humano genéticamente modificado de la reivindicación 1, en el que dicho dominio de unión a ligando extracelular tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 112, en el que el dominio de unión a ligando extracelular se une a CD19.

15 3. El linfocito T humano genéticamente modificado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho receptor de antígeno quimérico comprende al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en:

- 20 (a) un dominio de señalización citoplasmática intracelular que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 113;
 (b) un dominio de señalización coestimuladora intracelular que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 114;
 (c) un péptido señal que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 115;
 (d) un dominio de bisagra que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 116; y
 (e) un dominio transmembrana que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 117.

25 4. El linfocito T humano genéticamente modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho receptor de antígeno quimérico tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 111.

5. El linfocito T humano genéticamente modificado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho polinucleótido exógeno comprende una secuencia de promotor que promueve la expresión de dicho receptor de antígeno quimérico, preferentemente en el que dicha secuencia de promotor tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 118.

30 6. Un procedimiento para producir un linfocito T humano genéticamente modificado que comprende un gen de región constante alfa de TCR humano modificado y que codifica un receptor de antígeno quimérico, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) introducir en un linfocito T humano:

- 35 (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una meganucleasa recombinante; o
 (ii) una proteína meganucleasa recombinante;

40 en la que dicha meganucleasa recombinante tiene especificidad para una secuencia de reconocimiento dentro de dicho gen de región constante alfa de TCR humano, en la que dicha secuencia de reconocimiento consiste en la SEQ ID NO: 3, en el que dicha meganucleasa recombinante comprende una primera subunidad y una segunda subunidad, en el que dicha primera subunidad se une a un primer semisito de reconocimiento de dicha secuencia de reconocimiento y comprende una primera región hipervariable (HVR1) y dicha segunda subunidad se une a un segundo semisito de reconocimiento de dicha secuencia de reconocimiento y comprende una segunda región hipervariable (HVR2), y en el que dicha meganucleasa recombinante produce un sitio de escisión en dicha secuencia de reconocimiento; y

45 (b) introducir en dicho linfocito T humano una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende un polinucleótido exógeno que codifica un receptor de antígeno quimérico;

en el que dicho polinucleótido exógeno se inserta en dicho gen de región constante alfa de TCR humano en dicho sitio de escisión, y en el que dicho receptor de antígeno quimérico comprende un dominio de unión a ligando extracelular y uno o más dominios de señalización intracelular, y en el que dicho linfocito T humano genéticamente modificado no expresa un TCR endógeno en la superficie celular.

50 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicha segunda secuencia de ácido nucleico comprende de 5' a 3':

- (a) un brazo de homología 5' que es homólogo a la secuencia 5' aguas arriba que flanquea dicho sitio de escisión;
 (b) dicho polinucleótido exógeno que codifica dicho receptor de antígeno quimérico; y
 (c) un brazo de homología 3' que es homólogo a la secuencia 3' aguas abajo que flanquea dicho sitio de escisión;

en el que dicho polinucleótido exógeno se inserta en dicho gen de región constante alfa de TCR humano en dicho sitio de escisión por recombinación homóloga.

8. El procedimiento de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que dicho polinucleótido exógeno comprende una secuencia de promotor que promueve la expresión de dicho receptor de antígeno quimérico.

5 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que al menos dicha segunda secuencia de ácido nucleico se introduce en dicho linfocito T humano poniendo en contacto dicho linfocito T humano con un vector de virus adenoasociado (AAV) recombinante que comprende dicha segunda secuencia de ácido nucleico, opcionalmente en el que dicho vector de AAV recombinante es un vector de AAV recombinante monocatenario o un vector de AAV autocomplementario.

10 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho vector de AAV recombinante tiene un serotipo de AAV2 o AAV6.

11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que dicha meganucleasa recombinante comprende una primera subunidad y una segunda subunidad, en el que dicha primera subunidad se une a un primer semisito de reconocimiento de dicha secuencia de reconocimiento y comprende:

15 (a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con los restos 198-344 de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-18; y
(b) una primera región hipervariable (HVR1) que consiste en los restos 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NO:8-18;

20 y en el que dicha segunda subunidad se une a un segundo semisito de reconocimiento de dicha secuencia de reconocimiento y comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con los restos 7-153 de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-18; y
(ii) una segunda región hipervariable (HVR2) que consiste en los restos 24-79 de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-18.

25 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicha primera subunidad comprende los restos 198-344 de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-18, y/o en el que dicha segunda subunidad comprende los restos 7-153 de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-18, y/o en el que dicha meganucleasa recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 8-18.

30 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que dicha meganucleasa recombinante comprende una primera subunidad y una segunda subunidad, en el que dicha primera subunidad se une a un primer semisito de reconocimiento de dicha secuencia de reconocimiento y comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con los restos 7-153 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-27; y
(b) una primera región hipervariable (HVR1) que consiste en los restos 24-79 de cualquiera de las SEQ ID NO:19-27;

35 y en el que dicha segunda subunidad se une a un segundo semisito de reconocimiento de dicha secuencia de reconocimiento y comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con los restos 198-344 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-27; y
(ii) una segunda región hipervariable (HVR2) que consiste en los restos 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-27.

40 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicha primera subunidad comprende los restos 7-153 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-27, y en el que dicha segunda subunidad comprende los restos 198-344 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-27, y/o en el que dicha meganucleasa recombinante comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-27.

45 15. Una composición farmacéutica para su uso en un procedimiento de inmunoterapia para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicha composición farmacéutica dicho linfocito T humano genéticamente modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

A.

	Semisitio de TRC1	Semisitio de TRC2	
TRC 1-2	TGGCCTGGAGCAA	CAAATCTGA	(SEQ ID NO:3)
Secuencia de reconocimiento	ACCGGACCT	CGTTGTTTAGACT	(SEQ ID NO:83)
	Semisitio de TRC3	Semisitio de TRC4	
TRC 3-4	ACAAATGTGTCAC	AAAAGTAAGG	(SEQ ID NO:4)
Secuencia de reconocimiento	TGTTTACAC	AGTGTTCATTCC	(SEQ ID NO:84)
	Semisitio de TRC7	Semisitio de TRC8	
TRC 7-8	CTGATGTGTATAT	CACAGACAA	(SEQ ID NO:5)
Secuencia de reconocimiento	GACTACACA	TATAGTGTCTGTT	(SEQ ID NO:85)

B.

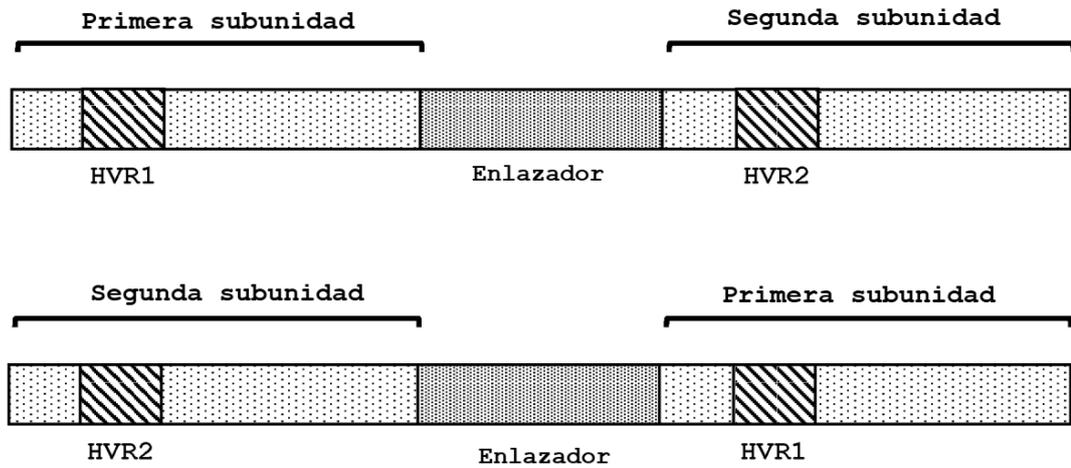


FIGURA 1

Región hipervariable 1 (HVR1) 271

SEQ ID NO:	TRC	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACI
33	TRC 1-2x.87 EE	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
34	TRC 1-2x.87 QE	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
35	TRC 1-2x.87 EQ	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
36	TRC 1-2x.87	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
37	TRC 1-2x.6	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
38	TRC 1-2x.20	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
39	TRC 1-2x.55	KEFLLYLAGFVDGDSI	YATIAPCQRAKFKHRLKLGFTVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGHVYDRGSVSEYVLSQ
40	TRC 1-2x.60	KEFLLYLAGFVDGDSI	YAIKPKQRAKFKHRLKLGFTVSGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVDRGSVSEYVLSQ
41	TRC 1-2x.105	KEFLLYLAGFVDGDSI	YASIRPSQRSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVDRGSVSEYVLSQ
42	TRC 1-2x.163	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
43	TRC 1-2x.113_3	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ

Región hipervariable 1 (HVR1) 80

SEQ ID NO:	TRC	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACI
44	TRC 1-2x.5	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
45	TRC 1-2x.8	KEFLLYLAGFVDGDSI	YATIAPRQRAKFKHRLVLFGEVVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
46	TRC 1-2x.25	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
47	TRC 1-2x.72	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
48	TRC 1-2x.80	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
49	TRC 1-2x.84	KEFLLYLAGFVDGDSI	YATIAPCQRAKFKHRLKLGFTVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGHVYDRGSVSEYVLSQ
50	TRC 1-2x.120	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
51	TRC 1-2x.113_1	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ
52	TRC 1-2x.113_2	KEFLLYLAGFVDGDSI	YACIAPRQGSKFKHRLKLGFAVGQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYYVYDRGSVSEYVLSQ

FIGURA 2A

344

272

TRC 1-2x.87 EE IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.87 QE IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.87 EQ IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.87 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.6 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.20 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.55 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.60 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.105 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.163 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.113_3 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

153

81

TRC 1-2x.5 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.8 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.25 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.72 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.80 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.84 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.120 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.113_1 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
 TRC 1-2x.113_2 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLKIIIEQLPSAKESPKKFLFVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

FIGURA 2B

SEQ ID NO:	7	Región hipervariable 2 (HVR2)	80
58	TRC 1-2x.87 EE	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A S I Y P H O R A K F K H L K L T F A Y O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D S G S V S E Y R L S E
59	TRC 1-2x.87 QE	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A S I Y P H O R A K F K H L K L T F A Y O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D S G S V S E Y R L S E
60	TRC 1-2x.87 EQ	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A S I Y P H O R A K F K H L K L T F A Y O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D S G S V S E Y R L S E
61	TRC 1-2x.87	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A S I Y P H O R A K F K H L K L T F A Y O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D S G S V S E Y R L S E
62	TRC 1-2x.6	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A S I Y P H O R A K F K H L K L V F A V H Q K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D A G S V S E Y R L S E
63	TRC 1-2x.20	KEFLLYLAGFVDGDGSI	Y A C I Y P D O R T K F K H L R L N F S V F O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V F D A G S V S E Y R L S E
64	TRC 1-2x.55	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A T I H P D O R S K F K H Y L R L F F S V F O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D A G S V S E Y R L S E
65	TRC 1-2x.60	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A Q I K P D O K M F K H Y L S L H F S V F O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D G G S V S E Y R L S E
66	TRC 1-2x.105	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A S I N P D O R A K F K H S L K L T F S V Y O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D T G S V S E Y R L S E
67	TRC 1-2x.163	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A S I Y P H O R A K F K H L K L T F A Y O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D S G S V S E Y R L S E
68	TRC 1-2x.113_3	KEFLLYLAGFVDGDGSI	Y A C I A P D O R A K F K H Y L R L O F S V F O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V F D A G S V S E Y R L S E

SEQ ID NO:	198	Región hipervariable 2 (HVR2)	271
69	TRC 1-2x.5	KEFLLYLAGFVDGDGSI	Y A T I Y P D O R A K F K H A L K L I F S V F O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D G G S V S E Y R L S E
70	TRC 1-2x.8	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A T I A P D O R P K F K H Q L R L I F N V C O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D T G S V S E Y R L S E
71	TRC 1-2x.25	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A S I Y P H O R A K F K H L K L T F A Y O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D S G S V S E Y R L S E
72	TRC 1-2x.72	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A T I V P E Q R S K F K H Y L K L T F S V F O K T O R R W F L D R L V D E I G V G Y V Y D A G S V S E Y R L S E
73	TRC 1-2x.80	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A T I F P D O R M K F K H Q L R L H F C V H O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D S G S V S E Y R L S E
74	TRC 1-2x.84	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A S I Y P H O R A K F K H L K L T F A Y O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D S G S V S E Y R L S E
75	TRC 1-2x.120	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A T I F P D O R M K F K H Q L R L H F C V H O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D S G S V S E Y R L S E
76	TRC 1-2x.113_1	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A T I F P D O R M K F K H Q L R L H F C V H O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D S G S V S E Y R L S E
77	TRC 1-2x.113_2	KEFLLYLAGFVDGDGSI	F A T I F P D O R M K F K H Q L R L G F A V H O K T O R R W F L D K L V D E I G V G Y V Y D R G S V S E Y R L S E

FIGURA 3A

153

81

TRC 1-2x.87 EE IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSR~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.87 QE IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSR~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.87 EQ IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSR~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.87 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSR~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.6 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.20 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.55 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.60 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.105 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.163 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSR~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.113_3 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

344

272

TRC 1-2x.5 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.8 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.25 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.72 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.80 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.84 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.120 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.113_1 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

TRC 1-2x.113_2 IKPLHNF~~LTQ~~LQPFLK~~LKQ~~KQANLVLKIIIEQLPSAKESPKDFLEVC~~TWVDQ~~IAALNDSK~~TRK~~TTSETVRAVLD

FIGURA 3B

SEQ ID	NO:	Región hipervariable 2 (HVR2)	271
	198		
78	TRC 3-4x.3	KEFLLYLAGFVDGDSI HACIQPQQDVKFKHQIHLRFTHQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVYDAAGSVSTYCLSQ	
79	TRC 3-4x.19	KEFLLYLAGFVDGDSI HACIQPMQSMKFKHYHLRFTHQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVYDAAGSVSTYCLSQ	
	272		
	344		
TRC 3-4x.3		IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD	
TRC 3-4x.19		IKPLHNFLTQLQPFLLKQKQANLVLKIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD	

FIGURA 5

SEQ ID NO: 7 TRC 7-8x.7 7 Region hipervariable 1 (HVR1) 80

KEFLLYLAGFVDDGDSI YACITPQQDMKFKHRLQLRFCVTQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVQDCGSSVEYRLLSE

SEQ ID NO: 198 TRC 7-8x.9 271 Region hipervariable 1 (HVR1)

KEFLLYLAGFVDDGDSI YACITPQQDMKFKHRLQLRFCVTQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVQDHGGAASEYRLLSE
KEFLLYLAGFVDDGDSI YACITPQQDMKFKHRLQLRFCVTQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVQDKGSAASEYRLLSE

FIGURA 6A

81 TRC 7-8x.7 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD 153

272 TRC 7-8x.9 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD 344
TRC 7-8x.14 IKPLHNFLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLLKIIIEQLPSAKESPDKFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

FIGURA 6B

SEQ ID			Región hipervariable 2 (HVR2)	271
NO:	198			
80	TRC 7-8x.7	KEFLLYLAGFVVDGDSI	VASIKPQQVAKFKHRLMLLEFYVYQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVYDLEGGASRYVLSQ	
SEQ ID			Región hipervariable 2 (HVR2)	80
NO:	7			
81	TRC 7-8x.9	KEFLLYLAGFVVDGDSI	VACIKPDDQAKFKHRLLEFTVCQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVVDQGSVSEYPLSQ	
82	TRC 7-8x.14	KEFLLYLAGFVVDGDSI	WASIRPTQLAKFKHALMLGFAYQKTQRRWFLDKLVDEIGVGYVYDLSGSVSKYITLSE	

FIGURA 7A

344

272

TRC 7-8x.7 IKPLHNFLLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLLKIIIEQLPSAKESPDKFFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

153

81

TRC 7-8x.9 IKPLHNFLLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLLKIIIEQLPSAKESPDKFFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD
TRC 7-8x.14 IKPLHNFLLTQLQPFLLKLLKQKQANLVLLKIIIEQLPSAKESPDKFFLEVCTWVDQIAALNDSKTRKTTSETVRAVLD

FIGURA 7B

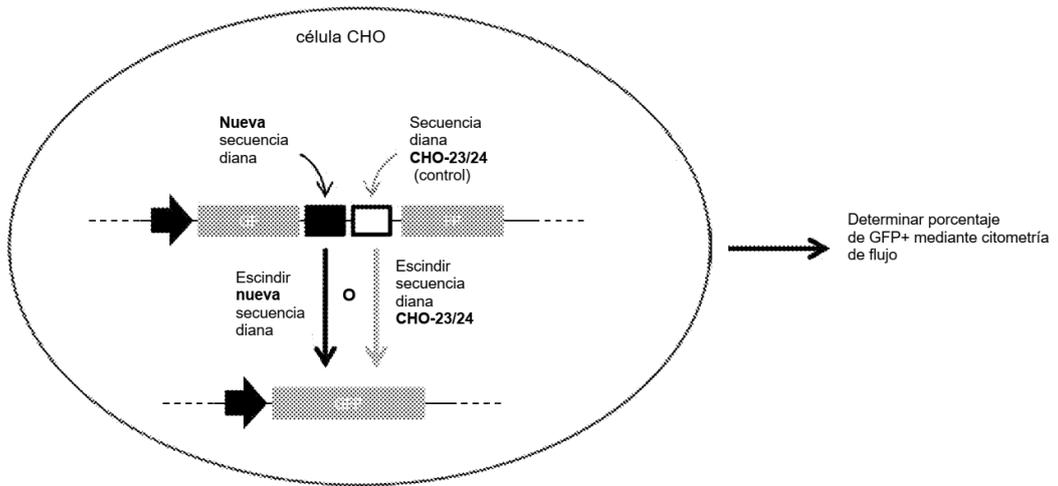
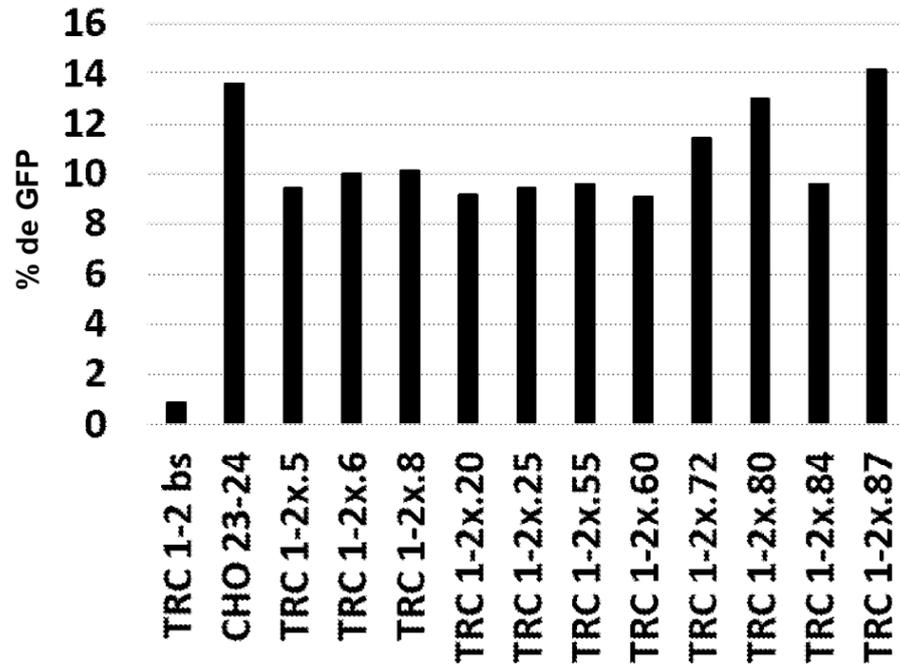


FIGURA 8

A.



B.

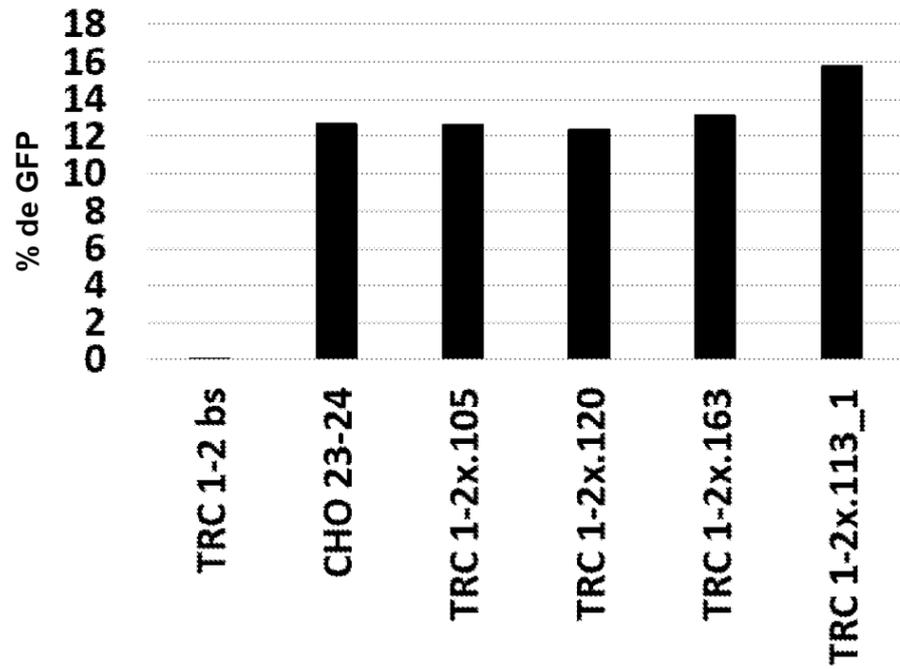
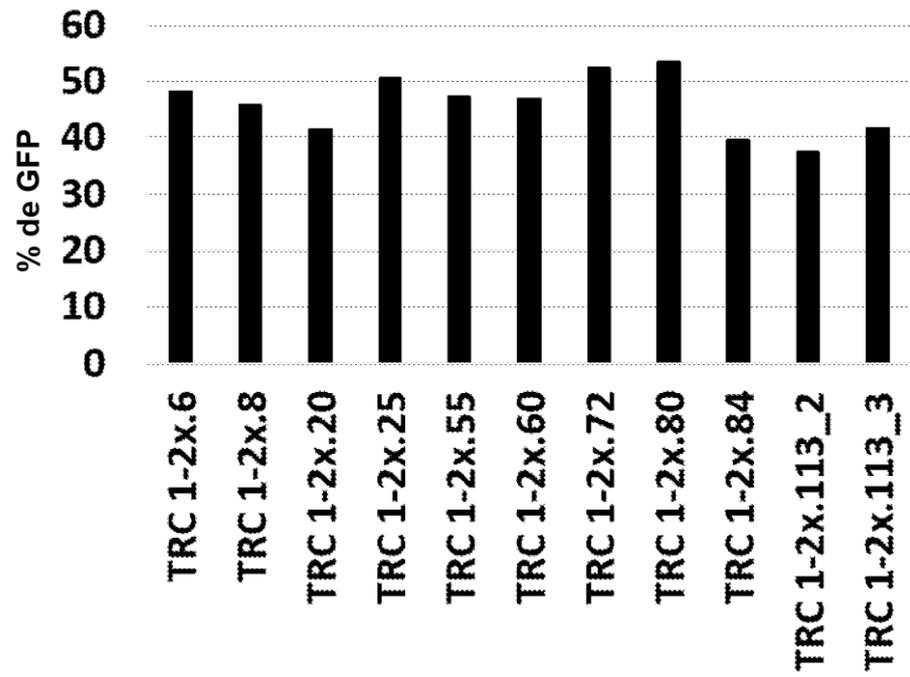


FIGURA 9

C.



D.

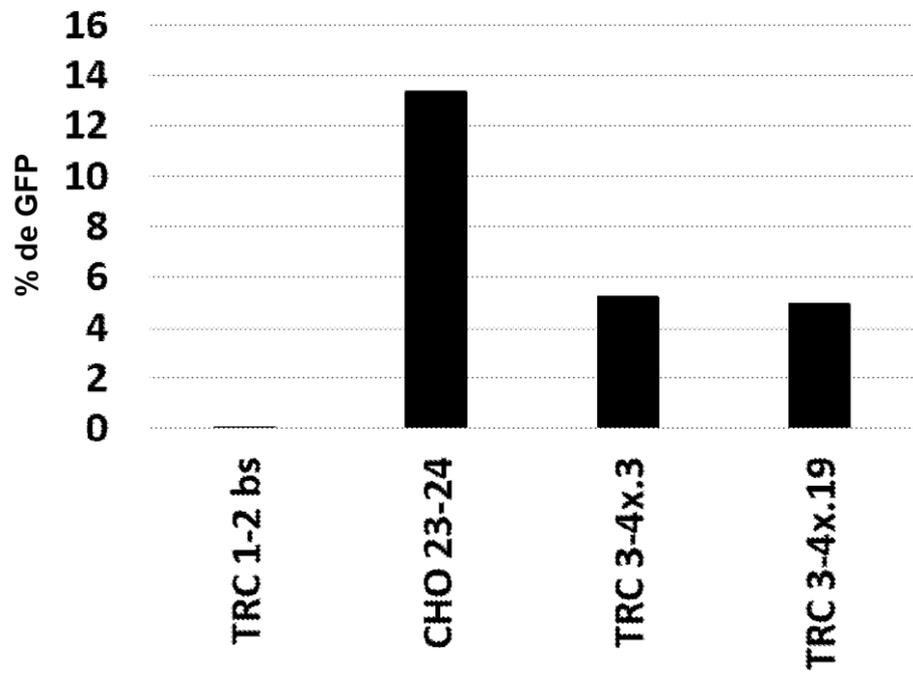
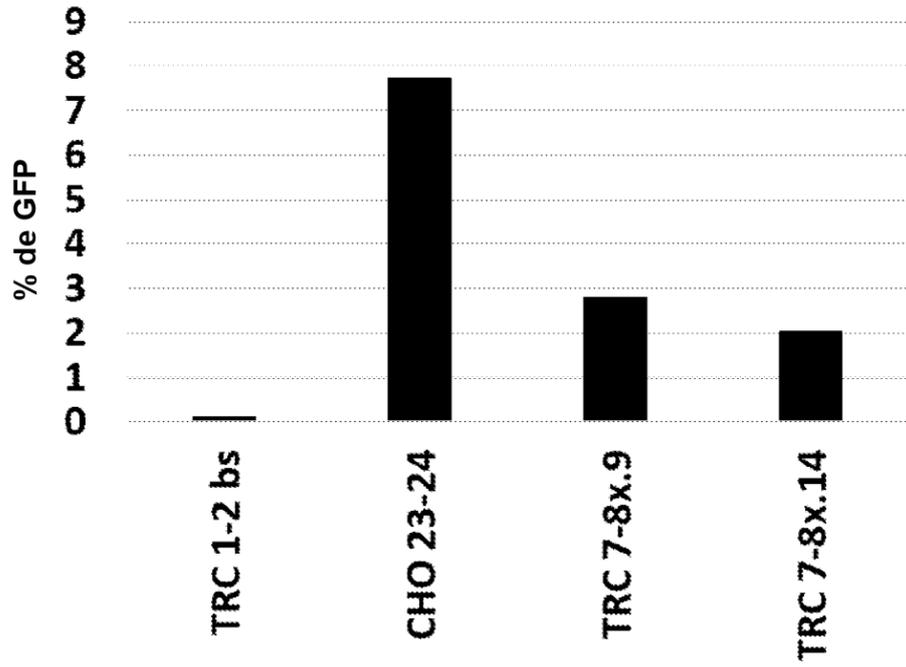


FIGURA 9 (cont.)

E.



F.

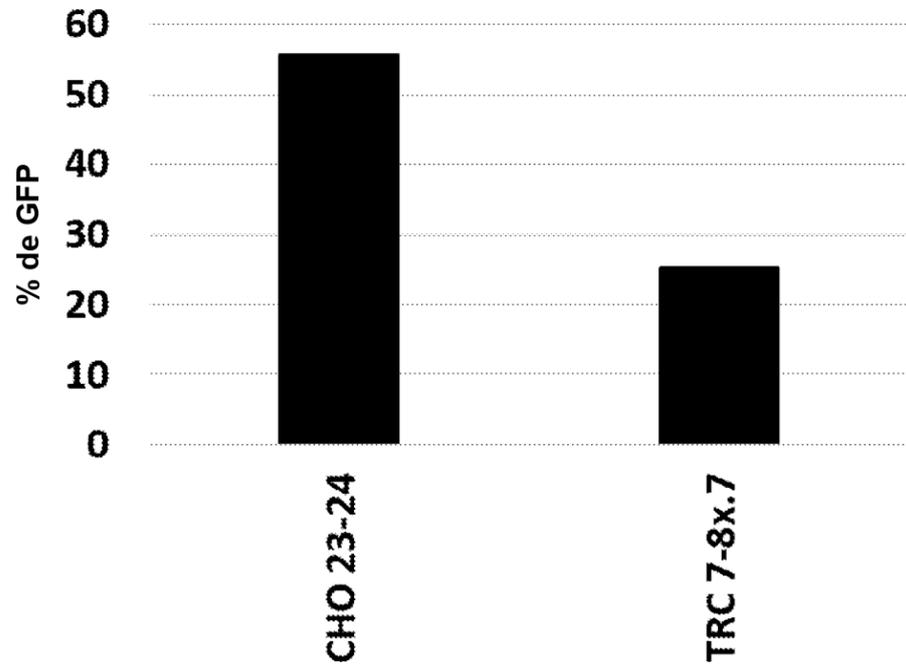


FIGURA 9 (cont.)

G.

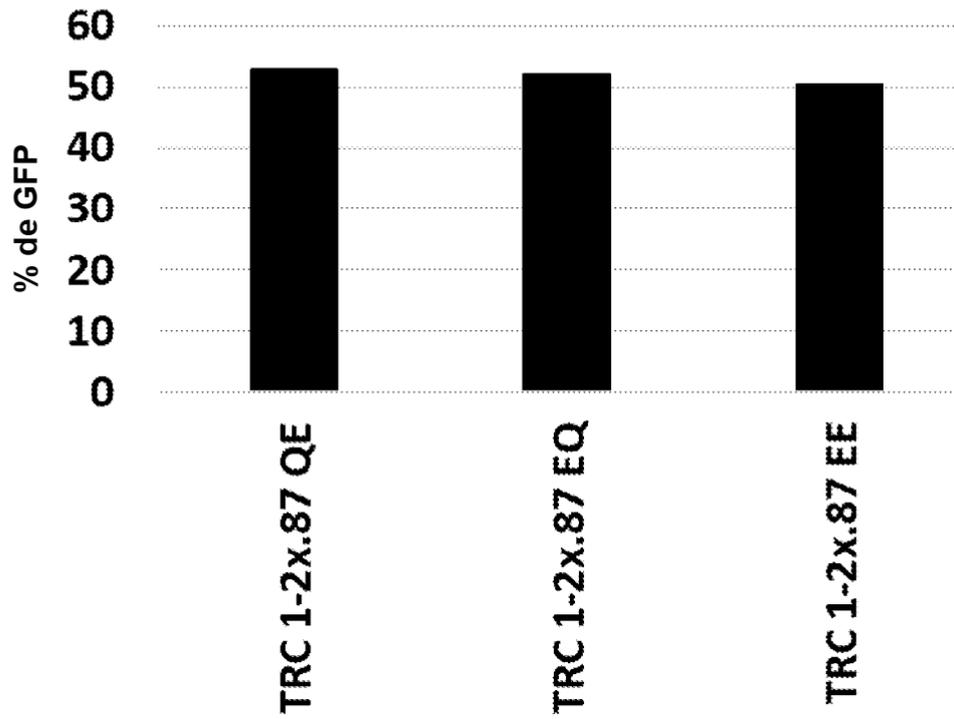


FIGURA 9 (cont.)

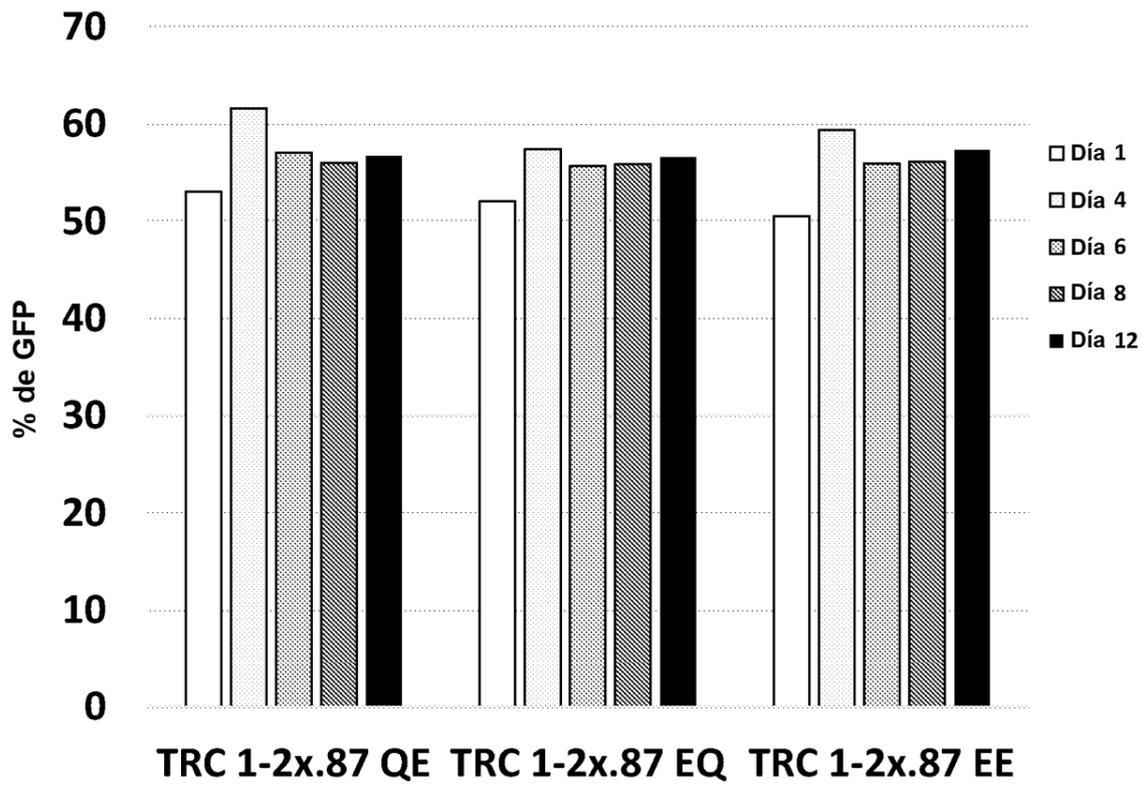


FIGURA 10

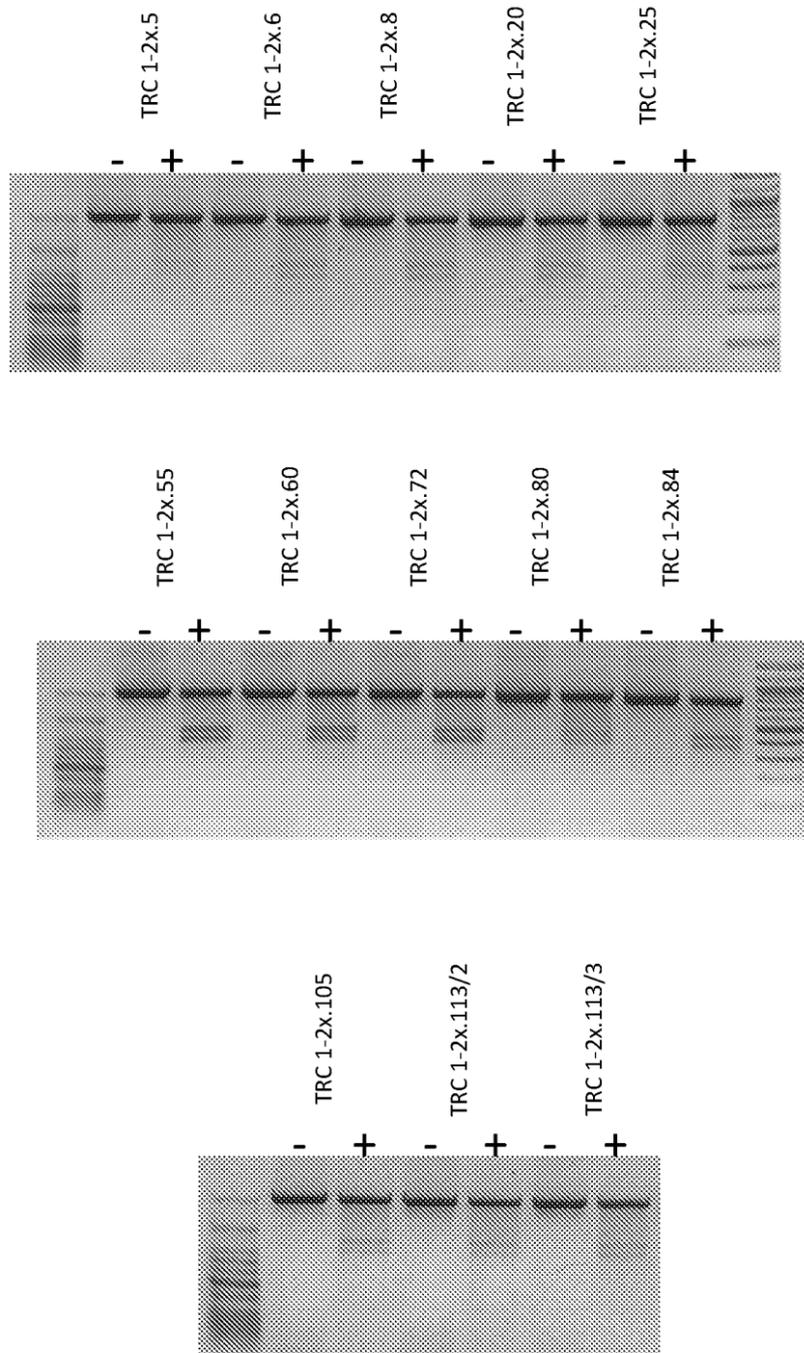


FIGURA 11

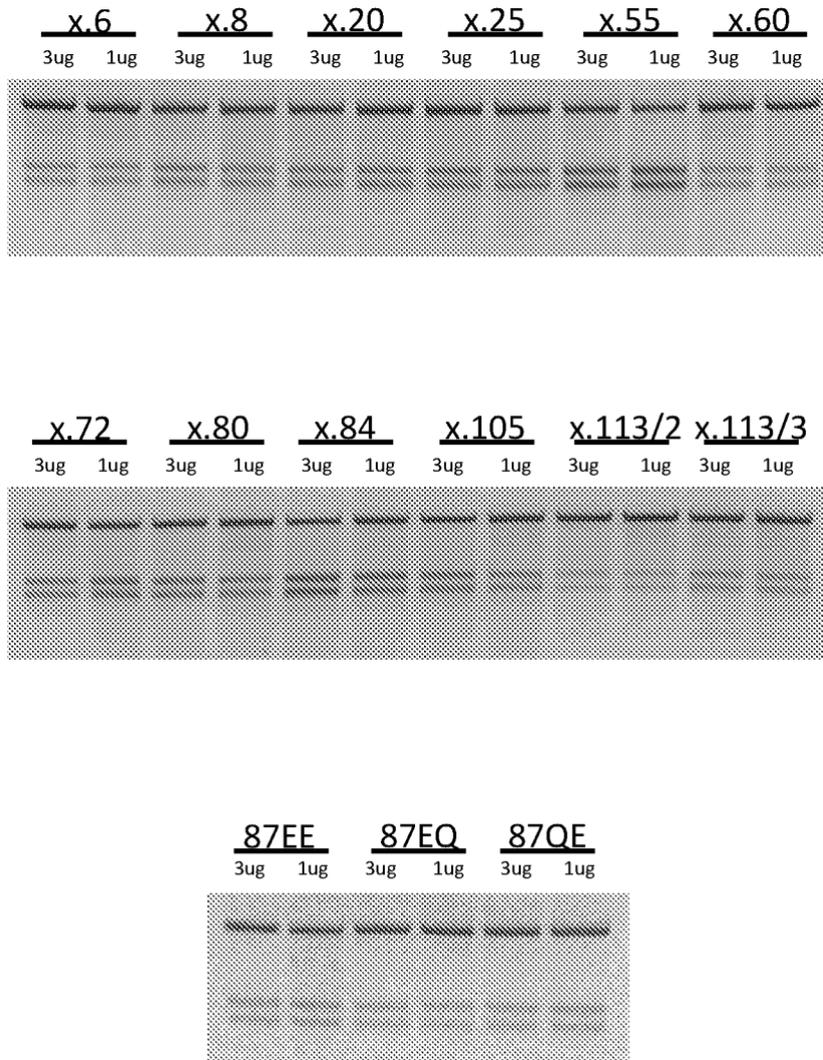
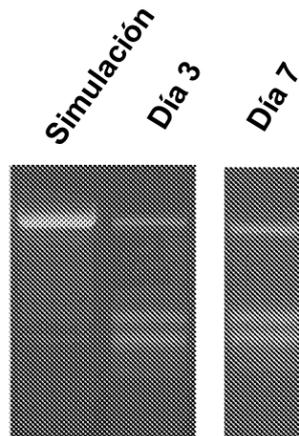


FIGURA 12

A.



B.

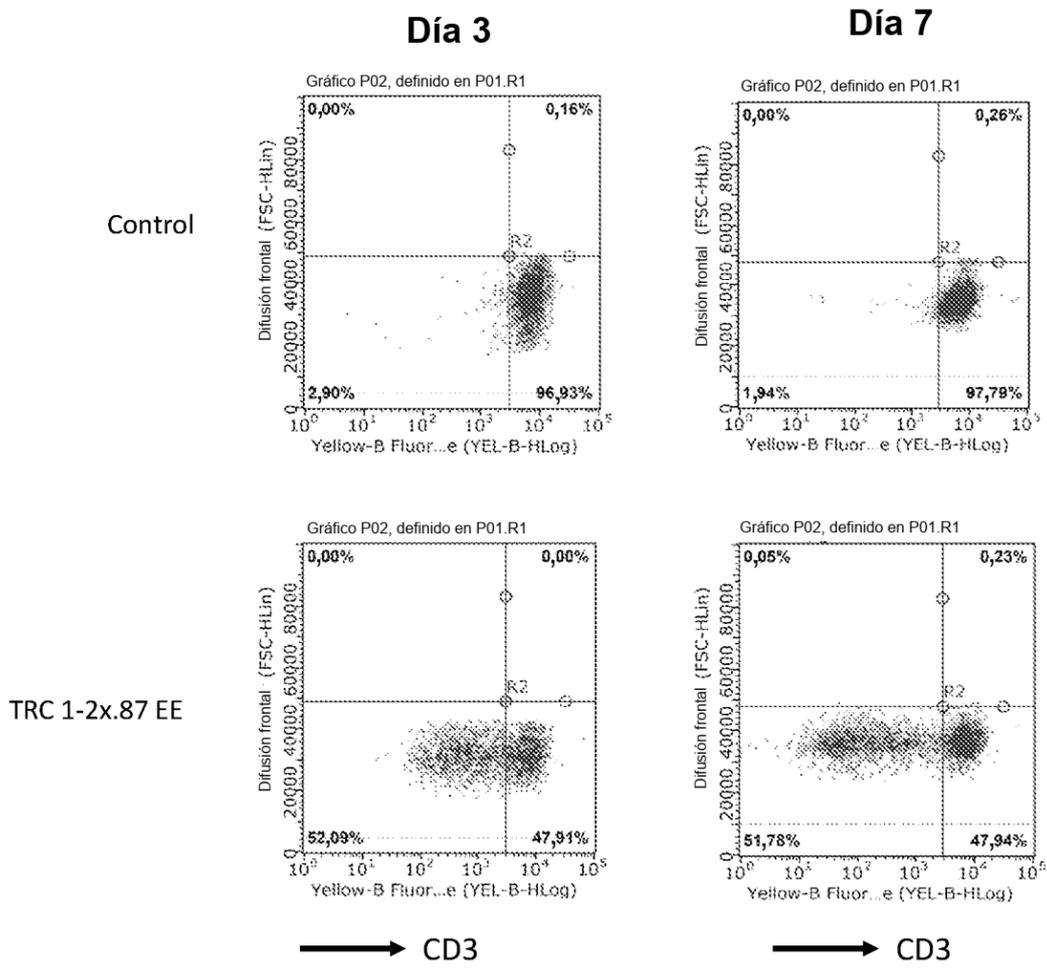


FIGURE 13

SEQ ID		162		233
NO:				
86	Tipo silvestre		ATGGACTTCAAGAGCAACAAGTGTCTGTGGCCCTGGAGCAACAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAAC	
87	Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAAGTGTCTGTGGCCCTGGAG--CAAACTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAAC	
88	Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACA-----AACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAAC	
89	Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAAGTGTCTGTGGCCCTGGAG---AATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAAC	
90	Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAAGTGTCTGTGGCCCTGGAG-----TCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAAC	
91	Indel		ATGGACTTCAAGAGCAA-----ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAAC	
92	Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAAGTGTCTGTGGCCCTGGAG--ACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAAC	
93	Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAAGTGTCTGTGGCCCTGGAGCAA---TCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAAC	
94	Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAAGTGTCTGTGGCCCTGGAGCAACAACAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAAC	
95	Indel		ATGGACTTCAAGAGCAACAAGTGTCTGTGGCCCTGGAGCAACAACAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAAC	

FIGURA 14

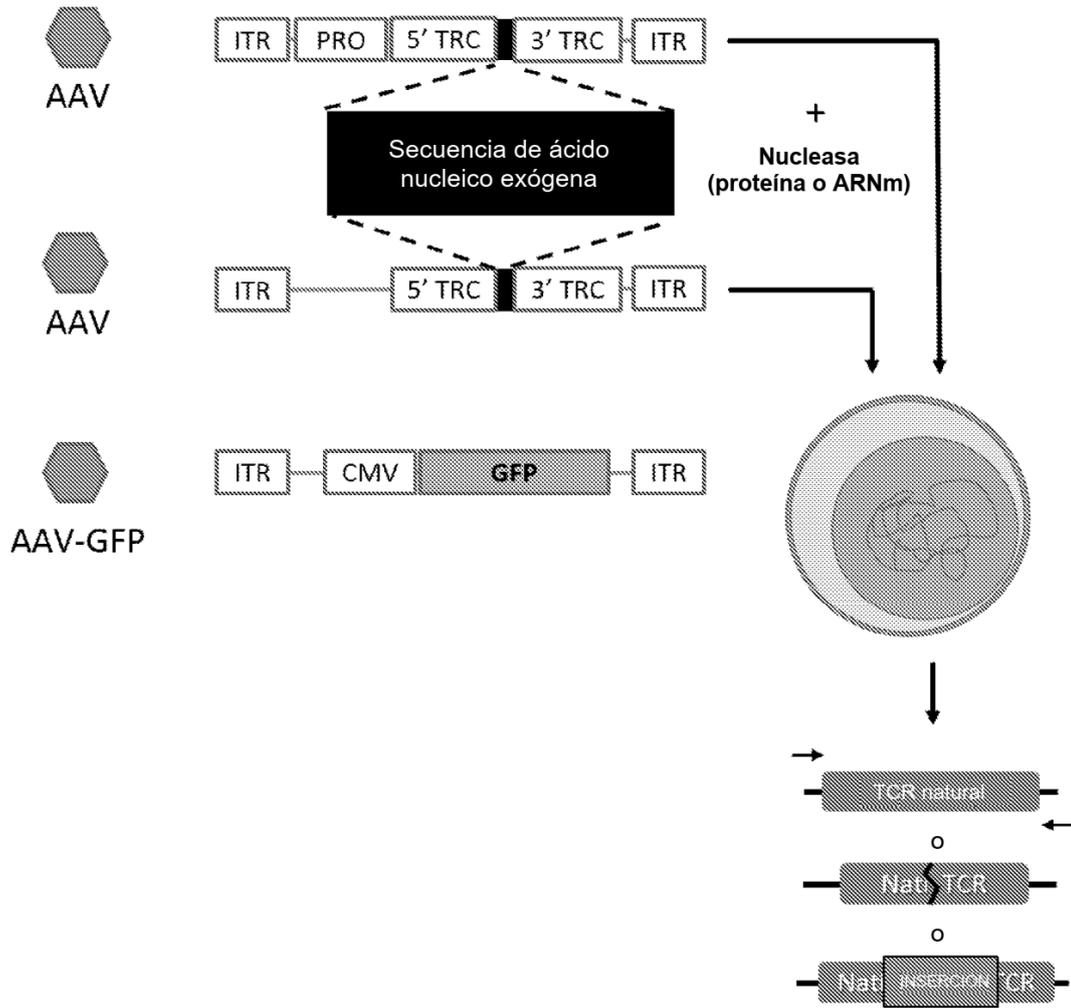


FIGURA 15

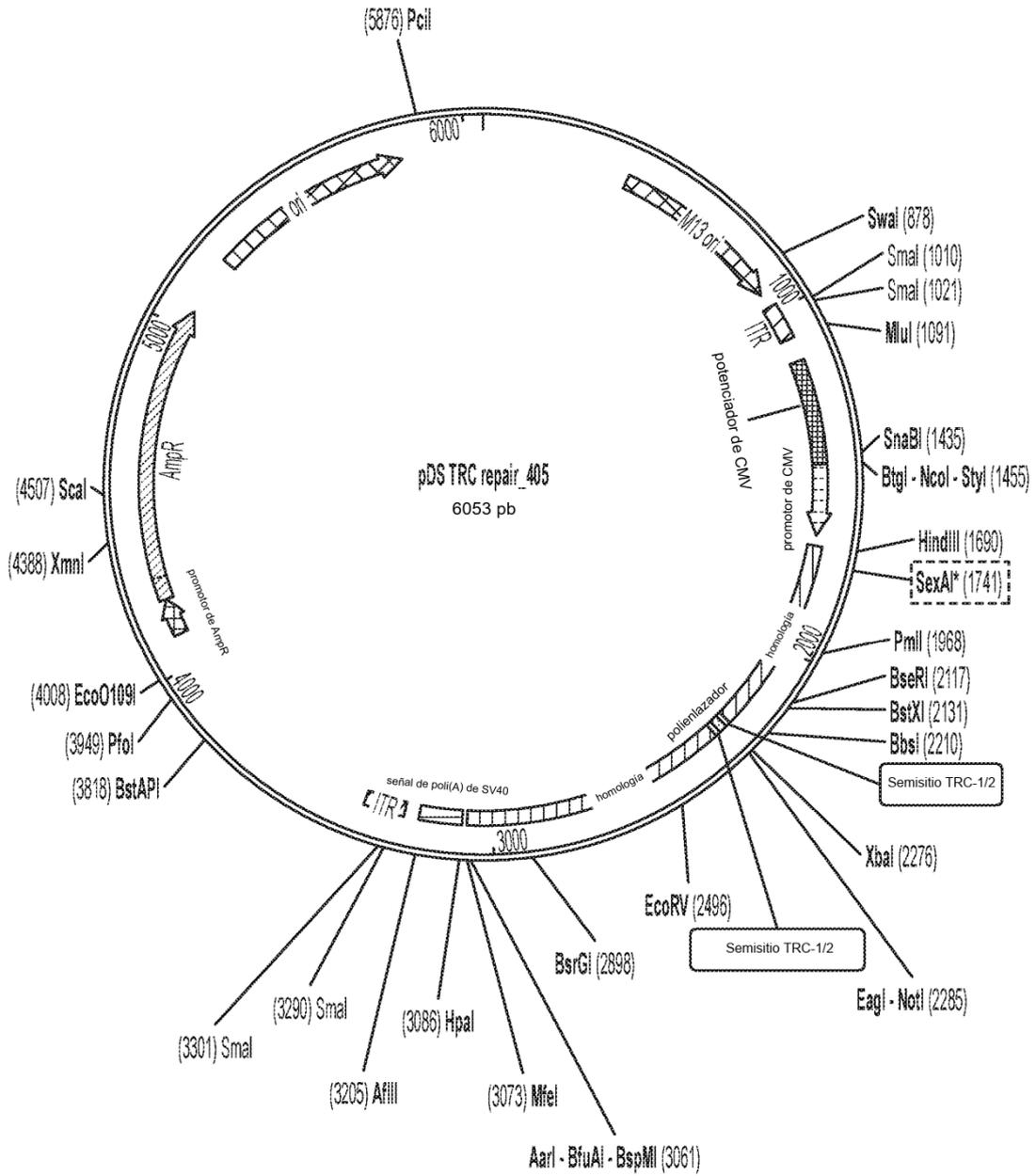


FIGURA 16

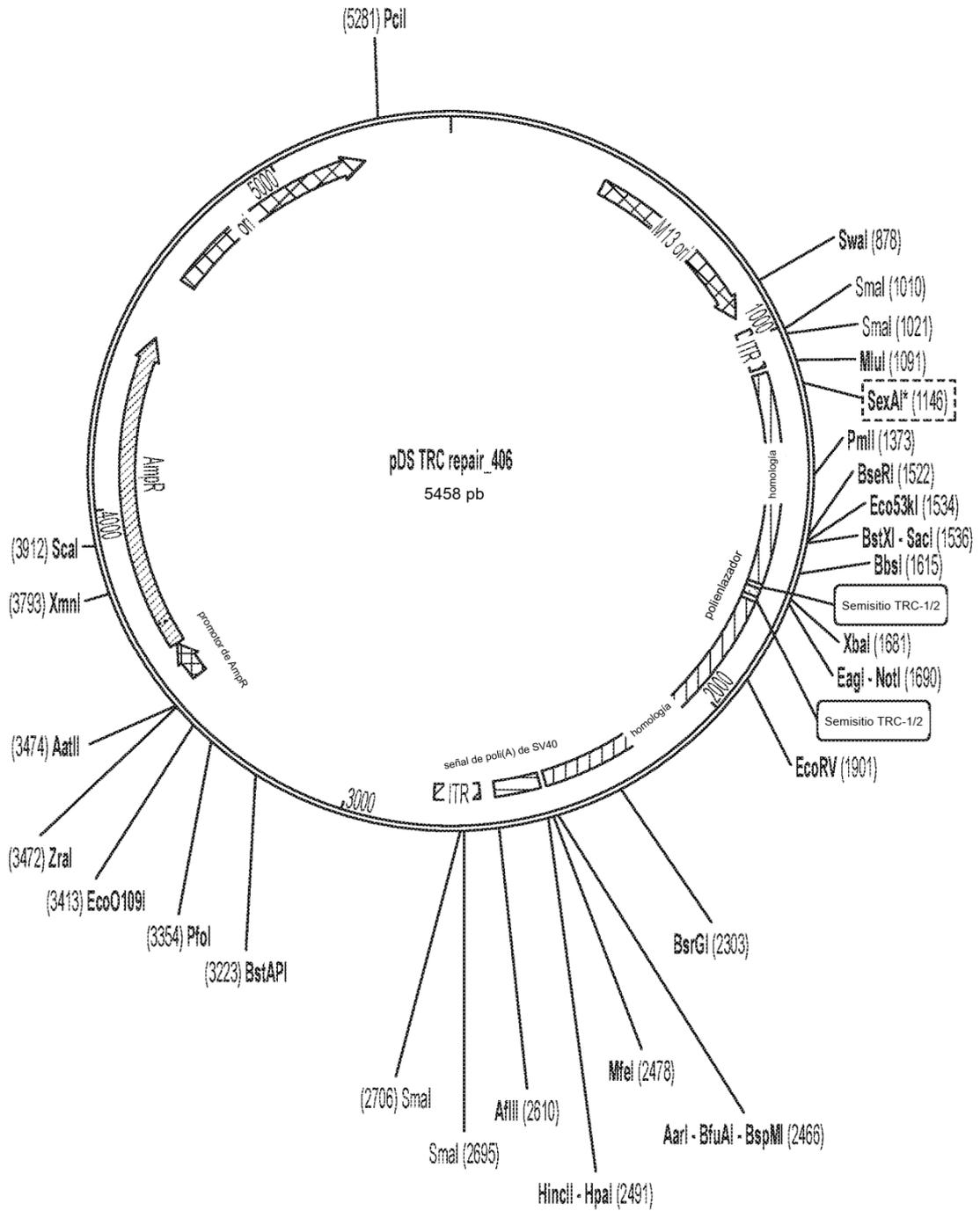


FIGURA 17

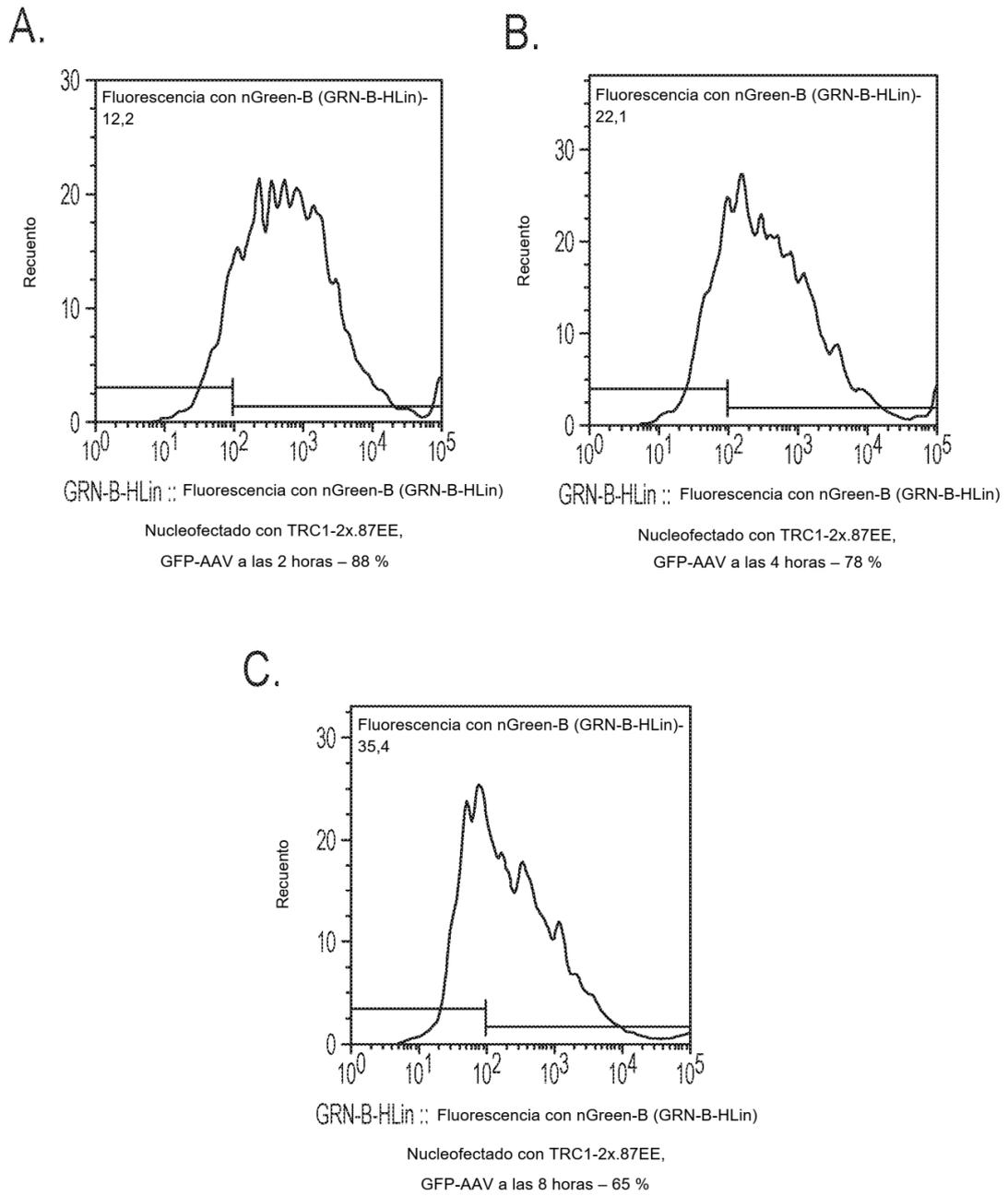


FIGURA 18

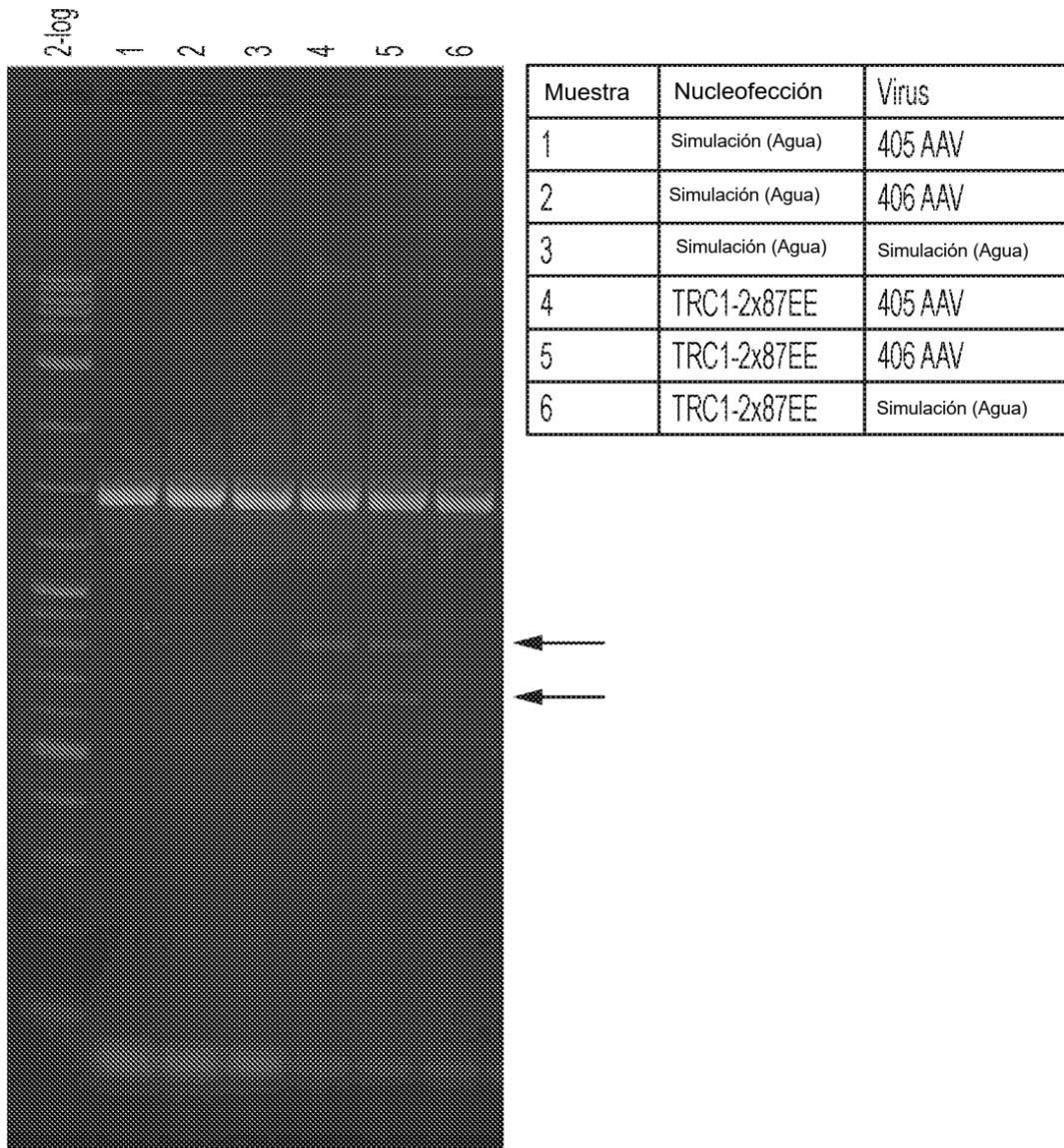
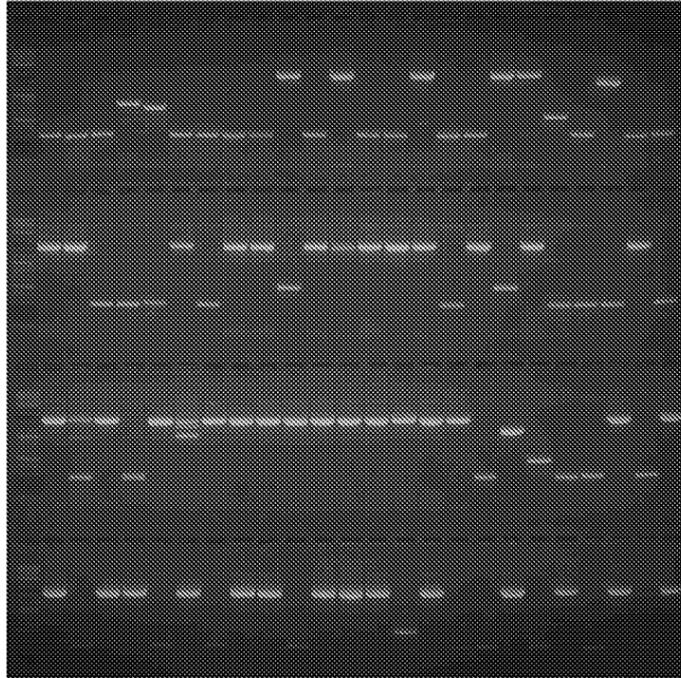


FIGURA 19

A.



B.

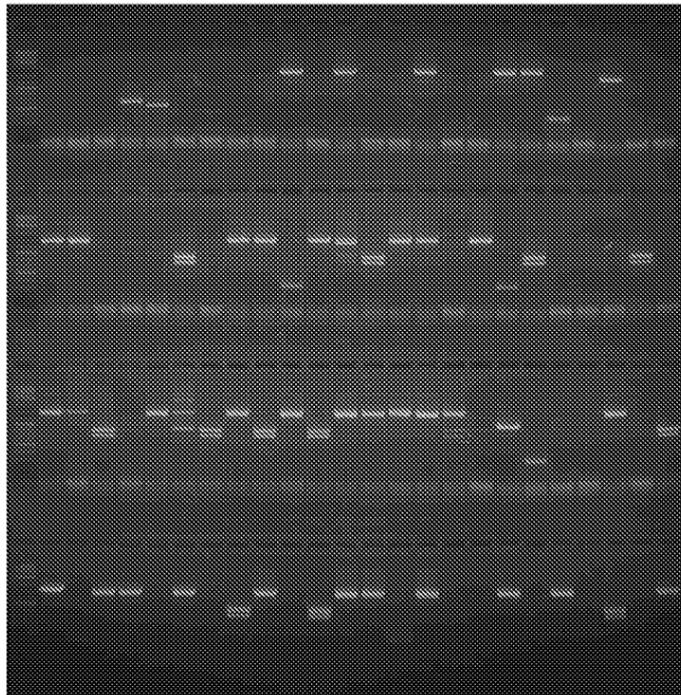
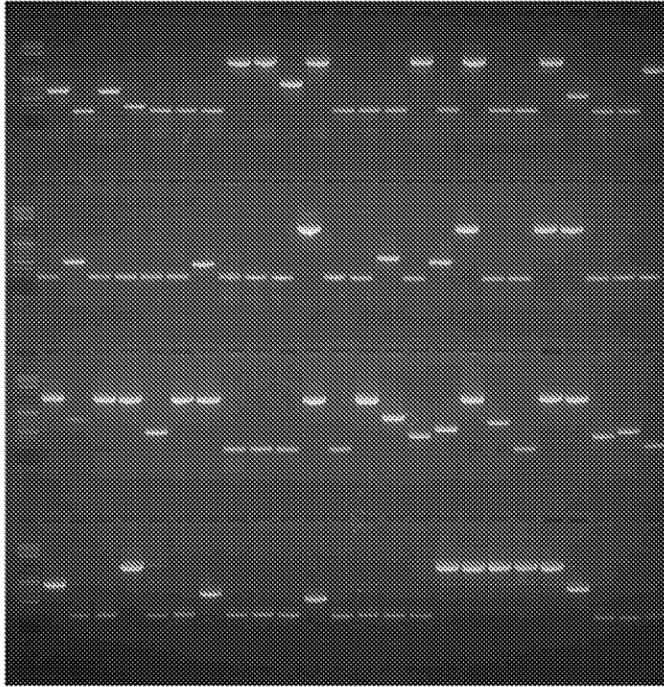


FIGURA 20

A.



B.

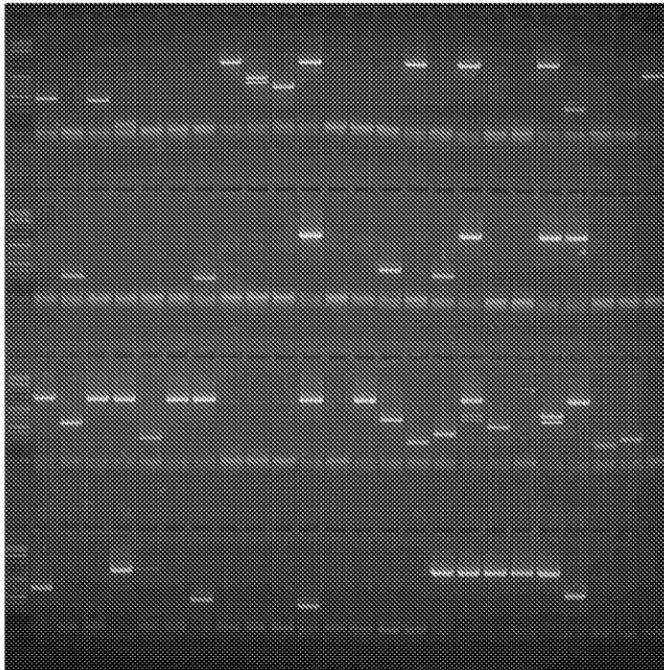


FIGURA 21

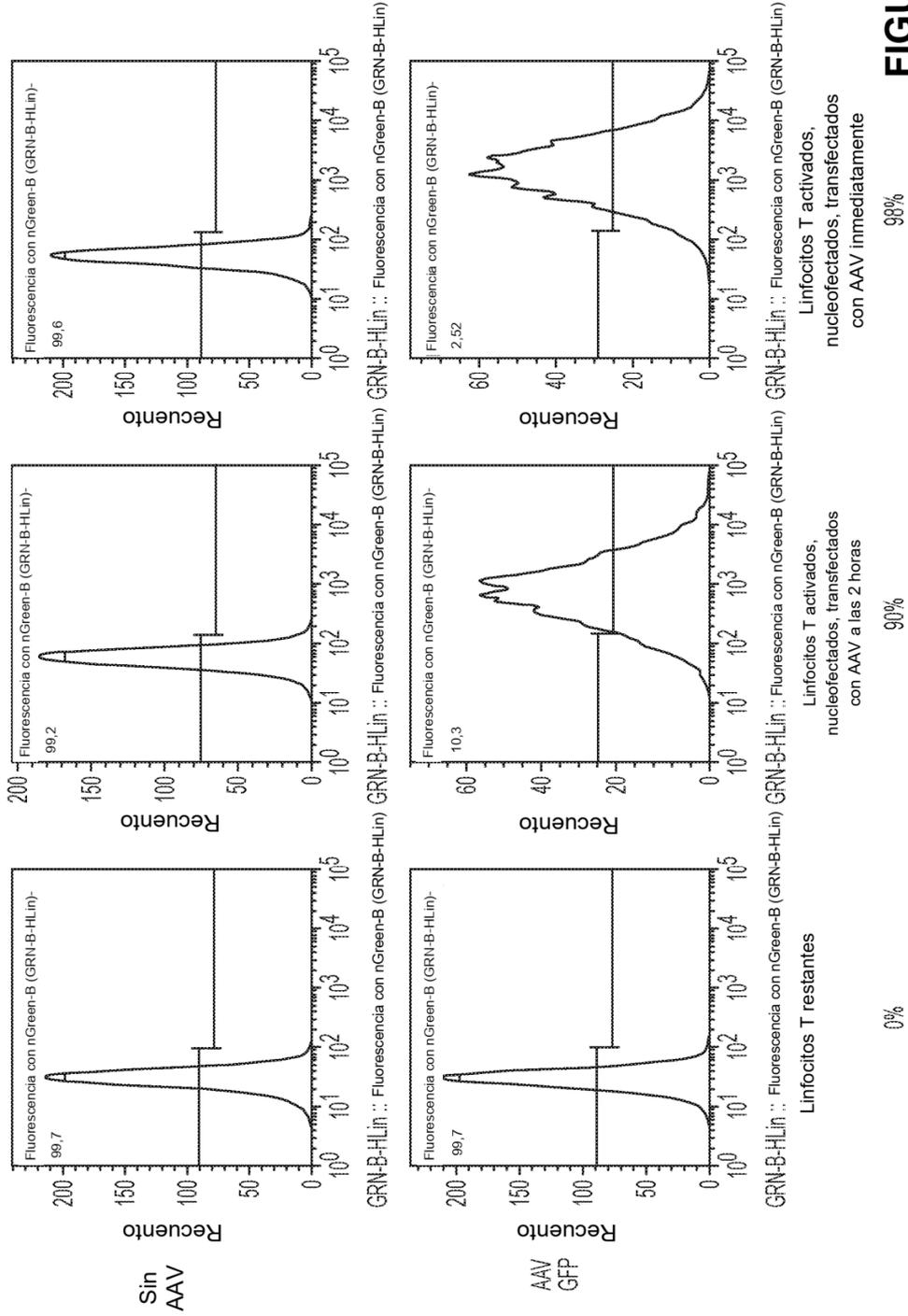


FIGURA 23

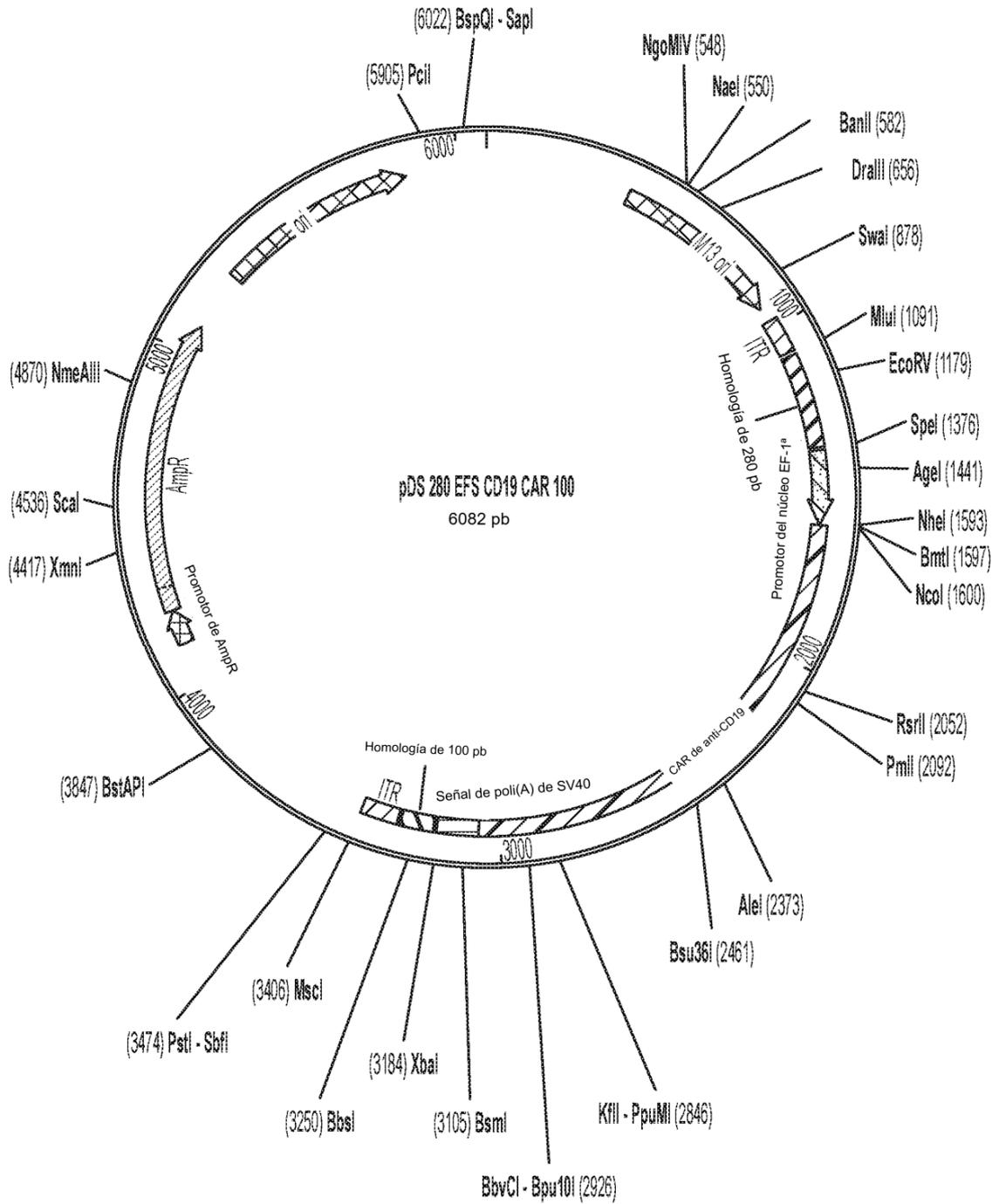


FIGURA 24

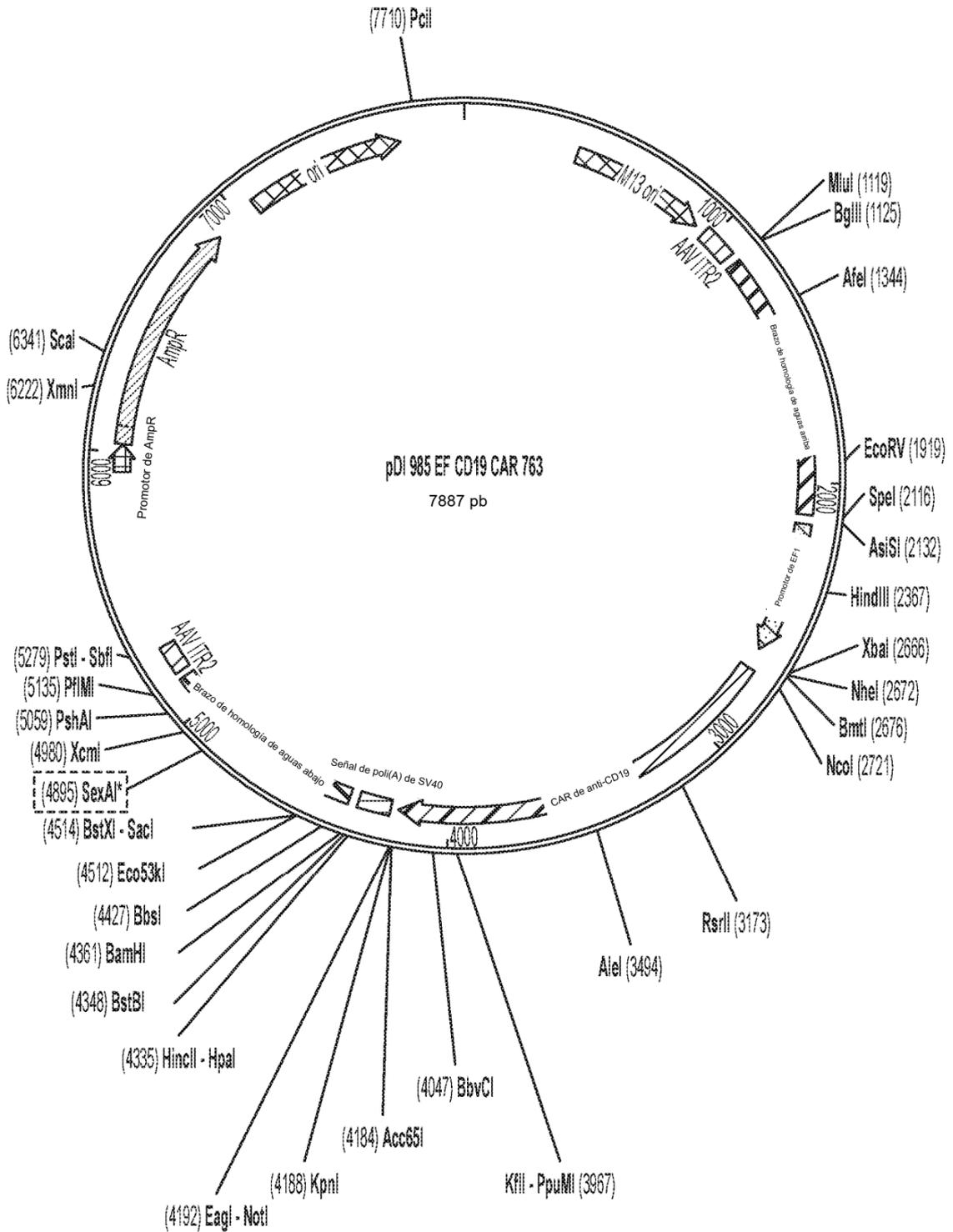


FIGURA 25

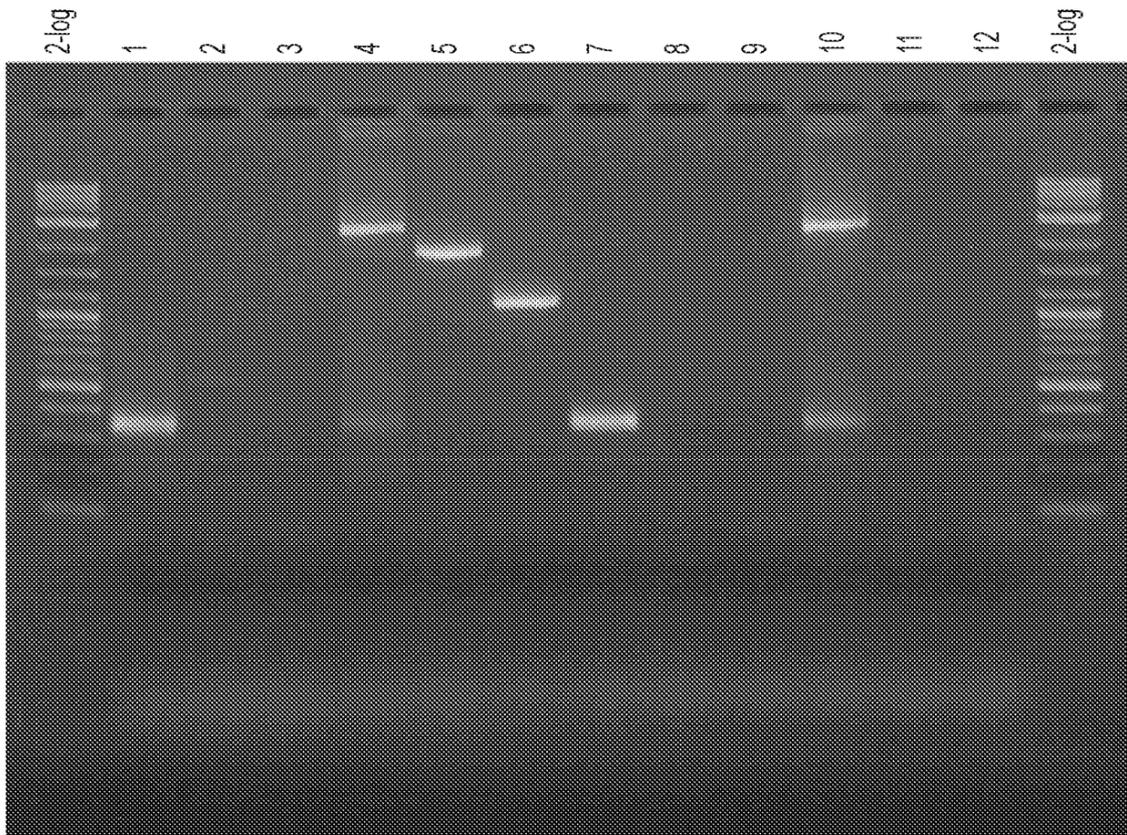
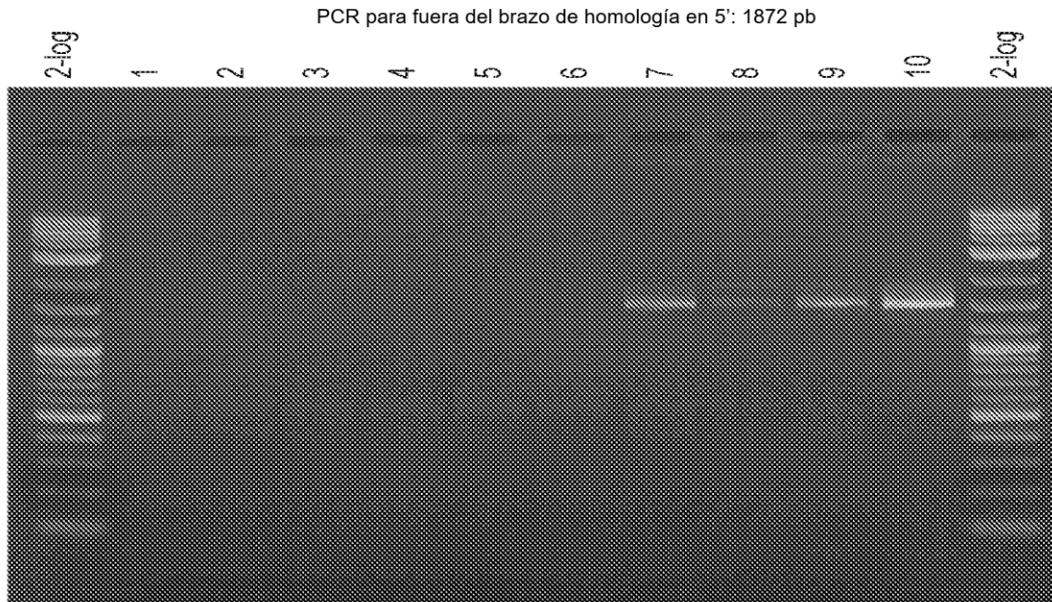


FIGURA 26

A.



B.

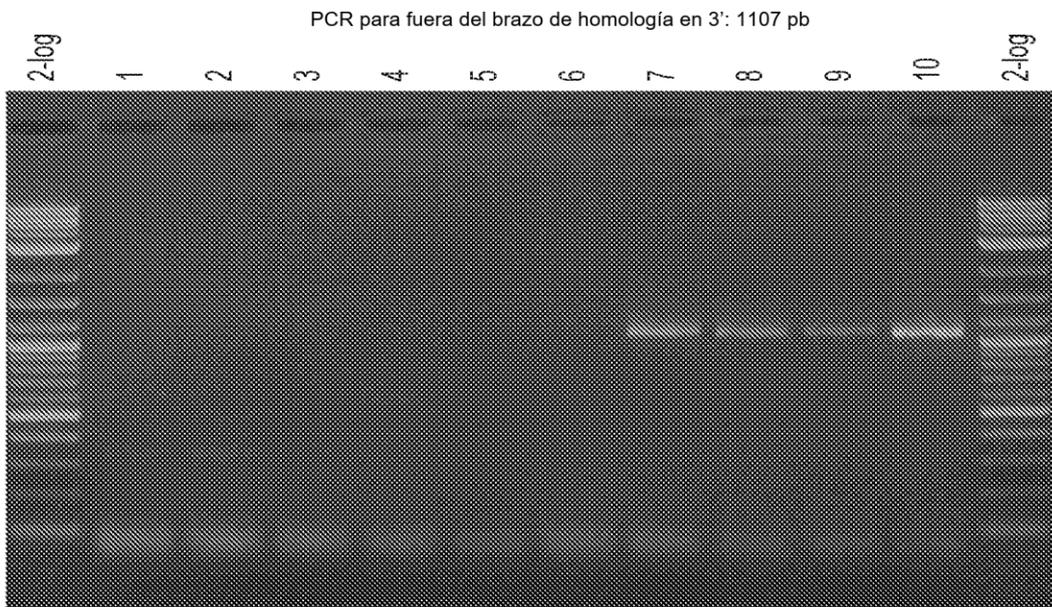
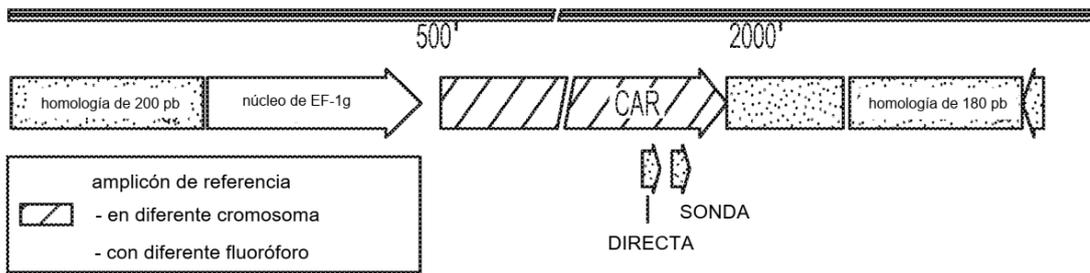


FIGURA 27

A.



B.

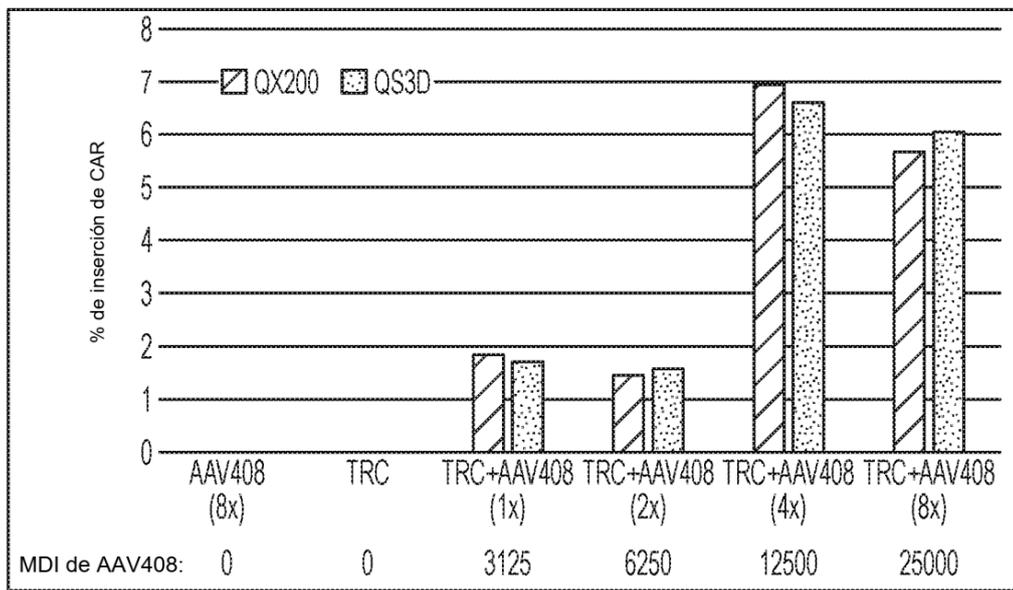


FIGURA 28

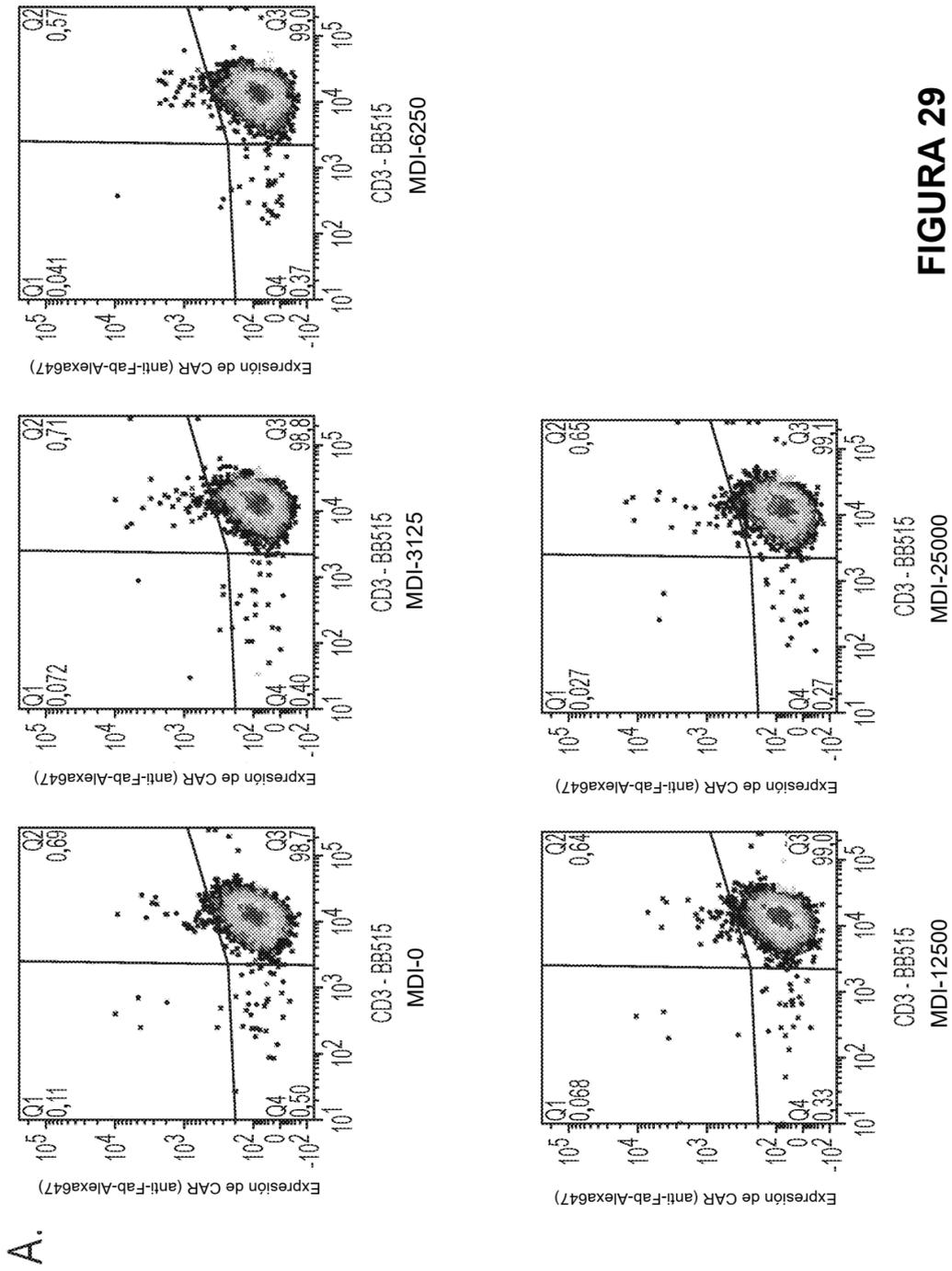


FIGURA 29

B.

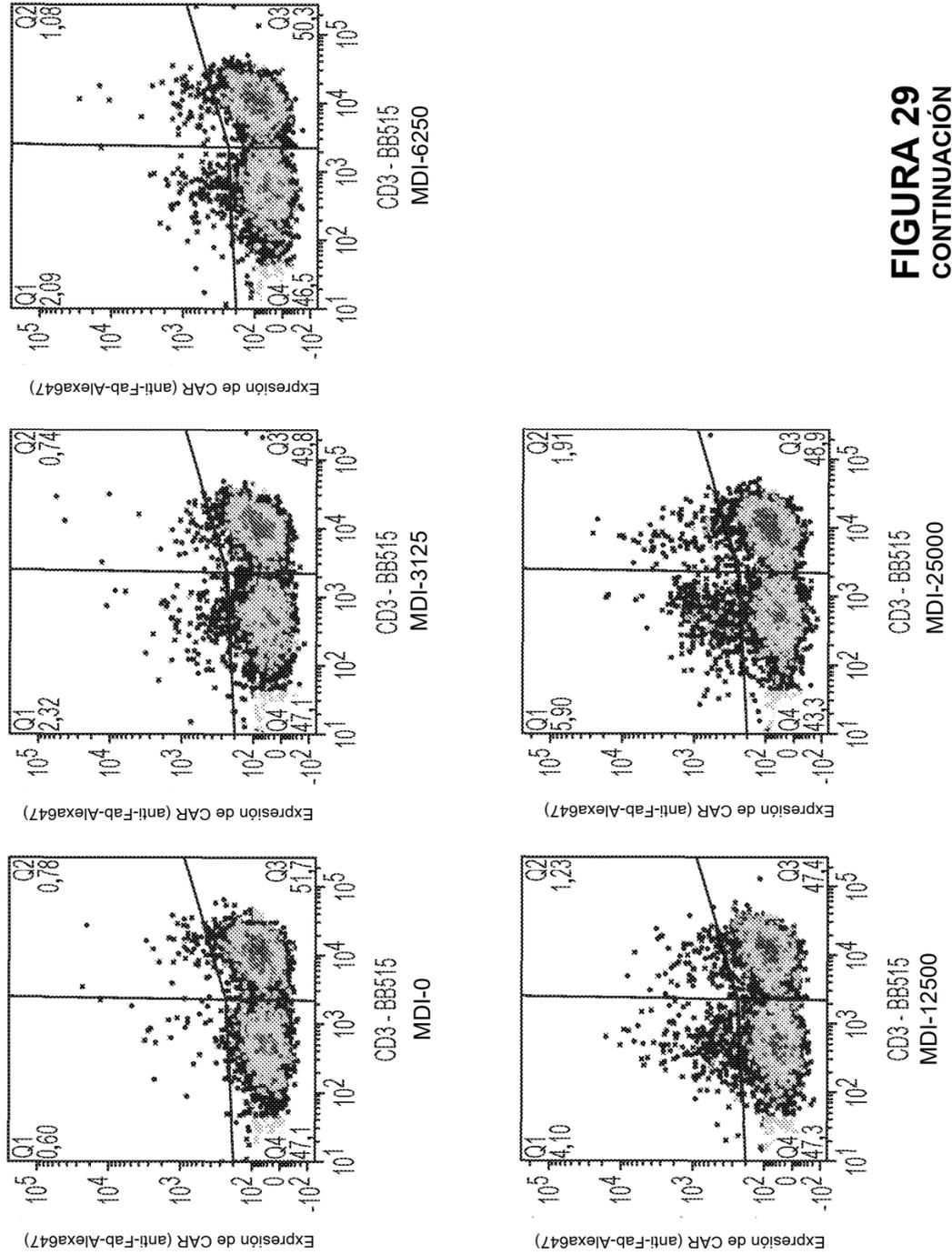


FIGURA 29
CONTINUACIÓN

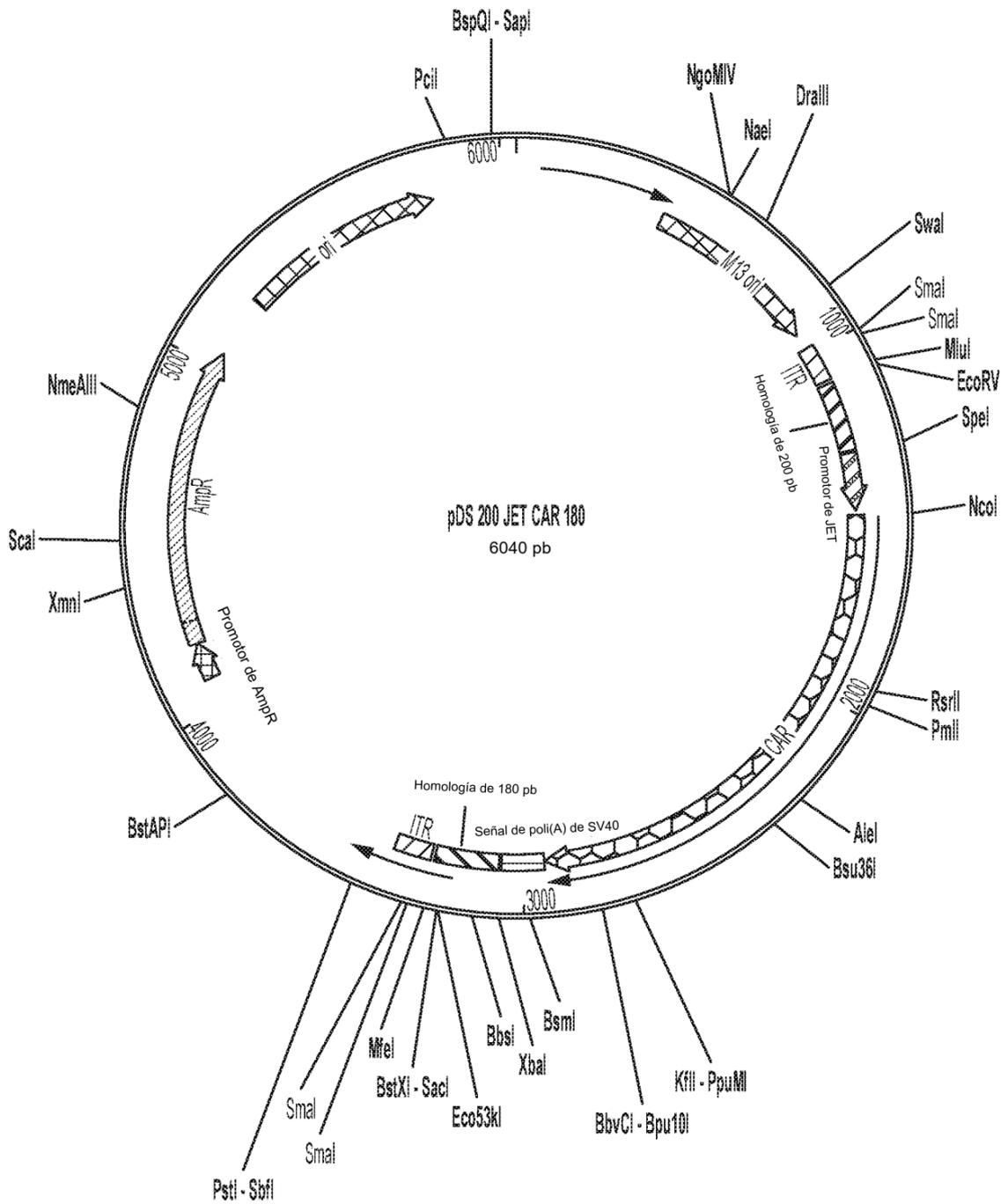


FIGURA 30

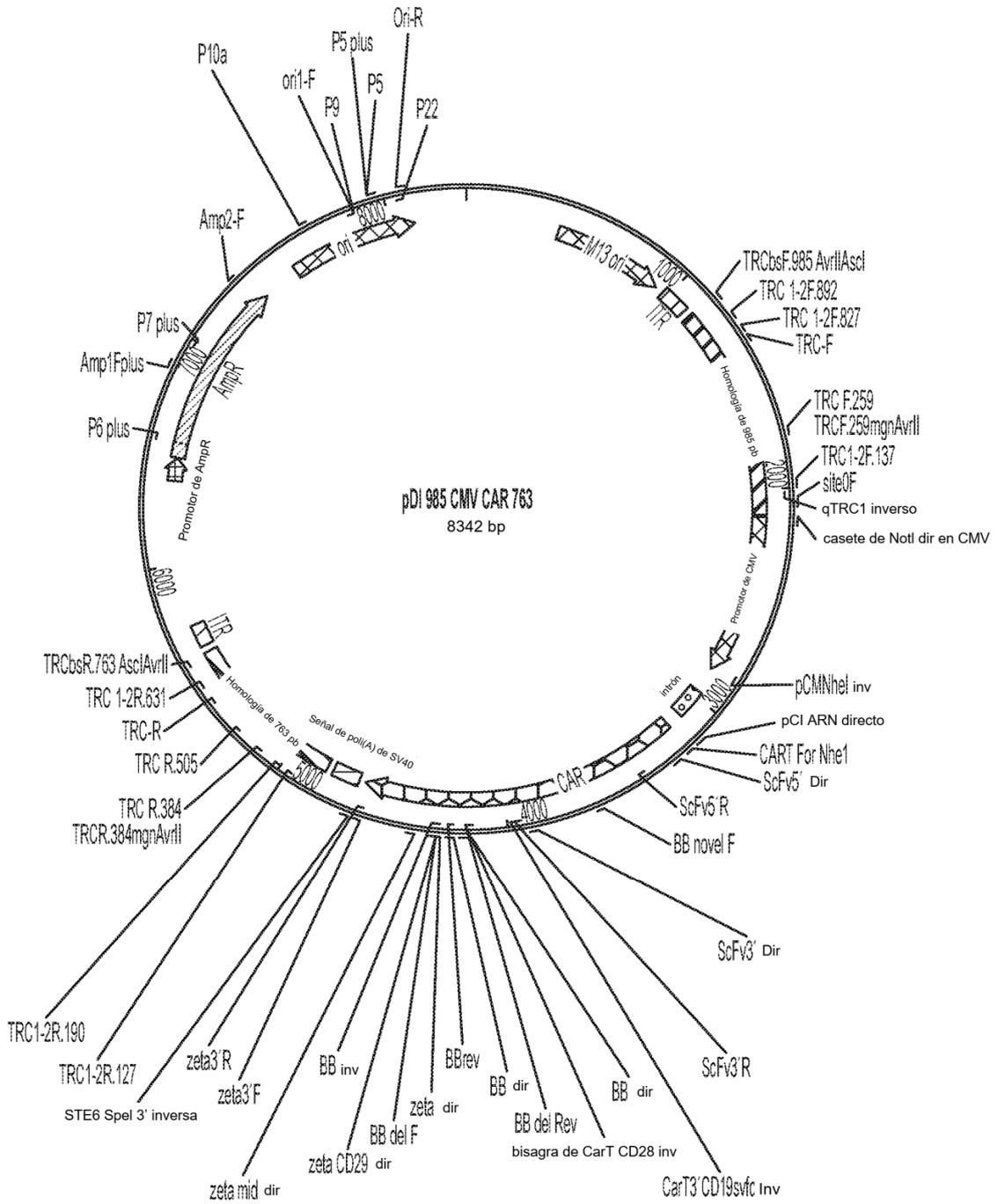


FIGURA 31

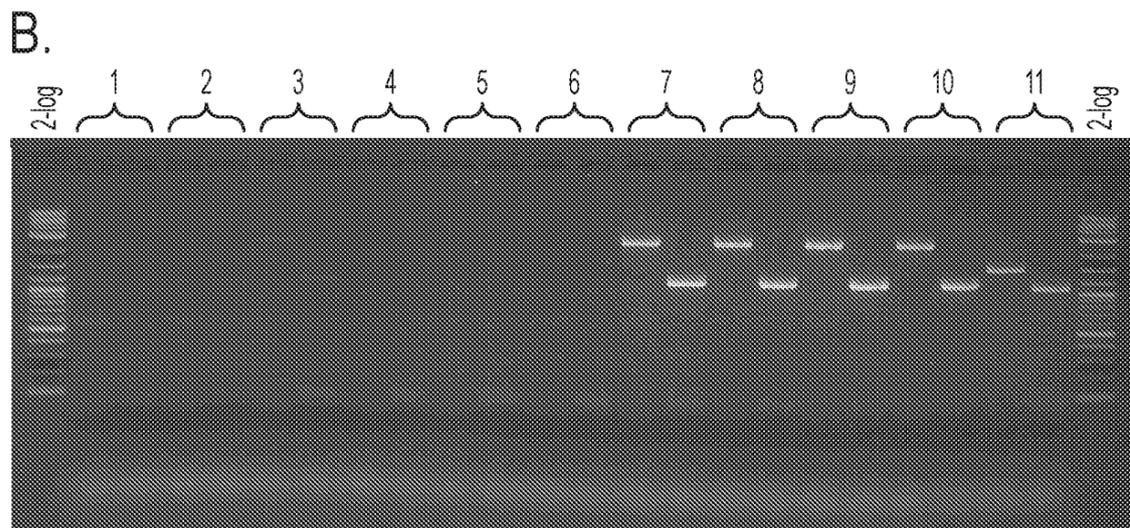
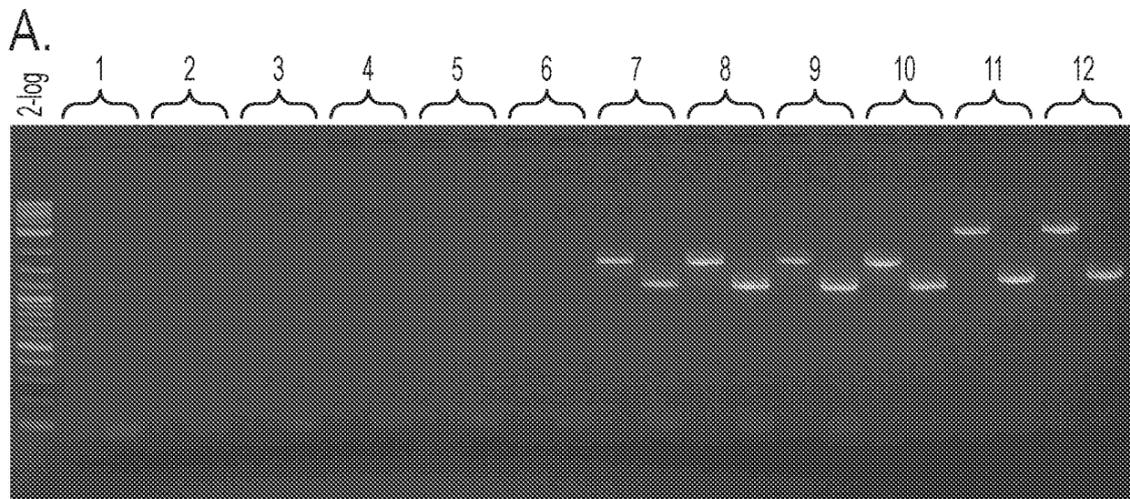


FIGURA 32

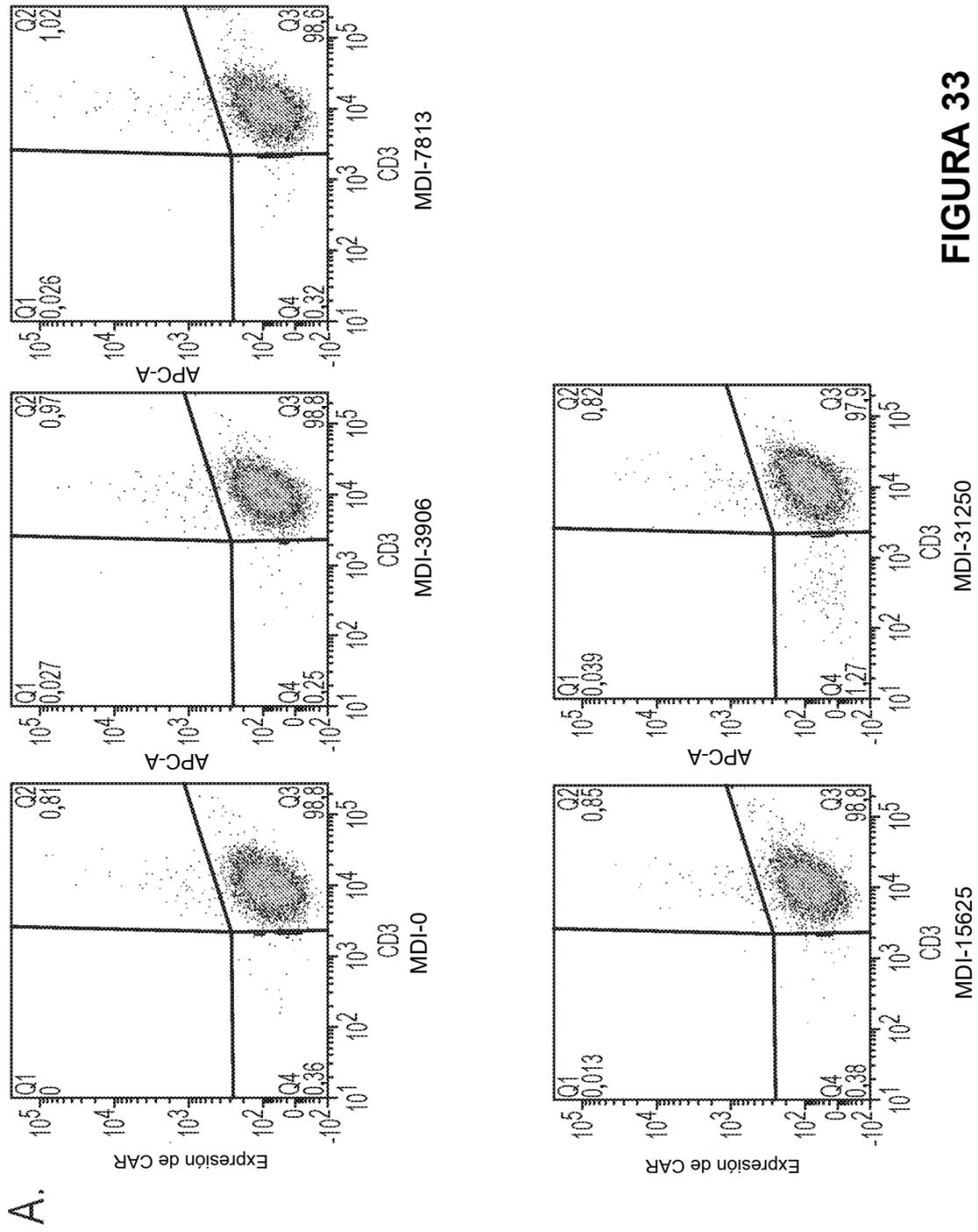


FIGURA 33

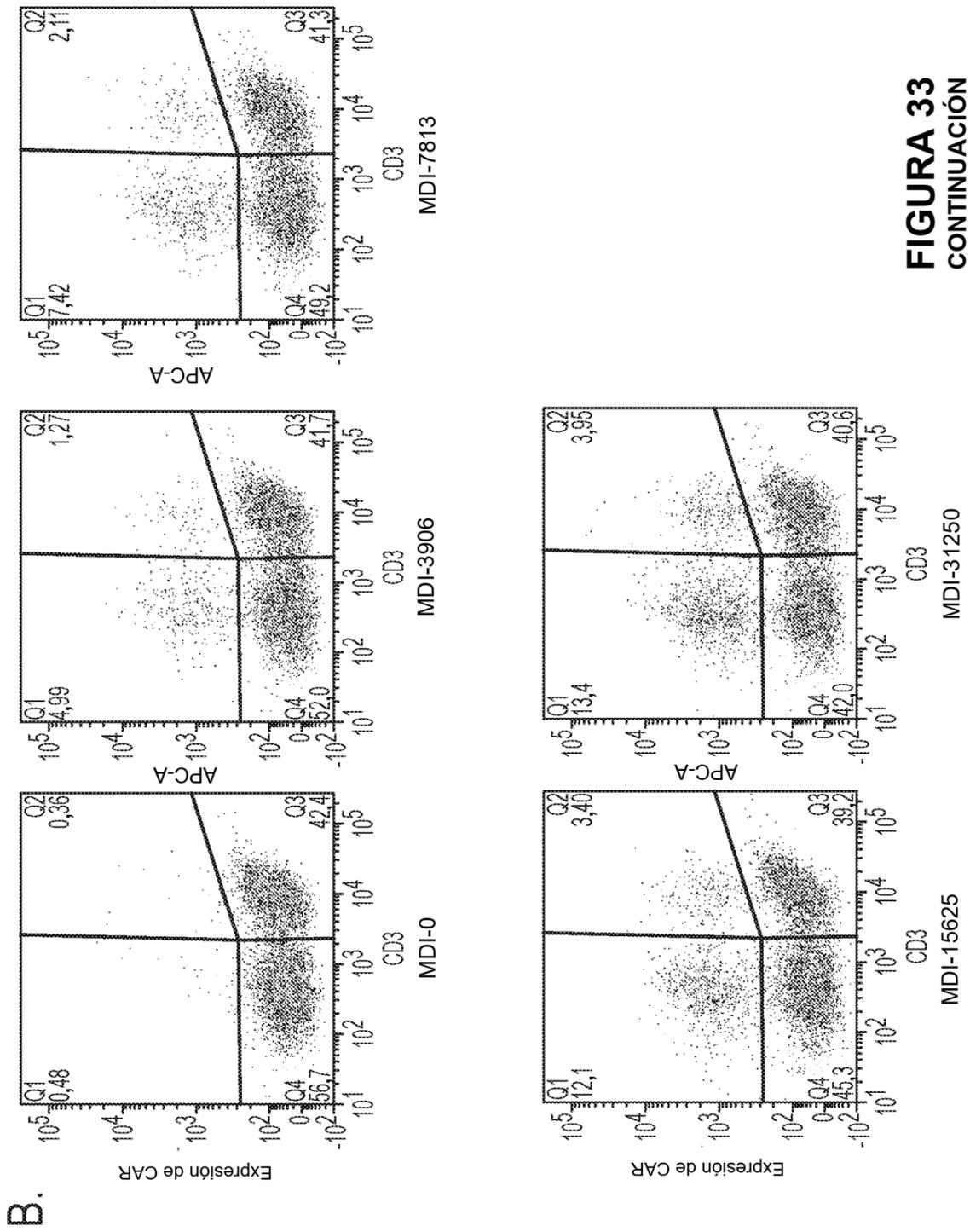


FIGURA 33
CONTINUACIÓN

A.

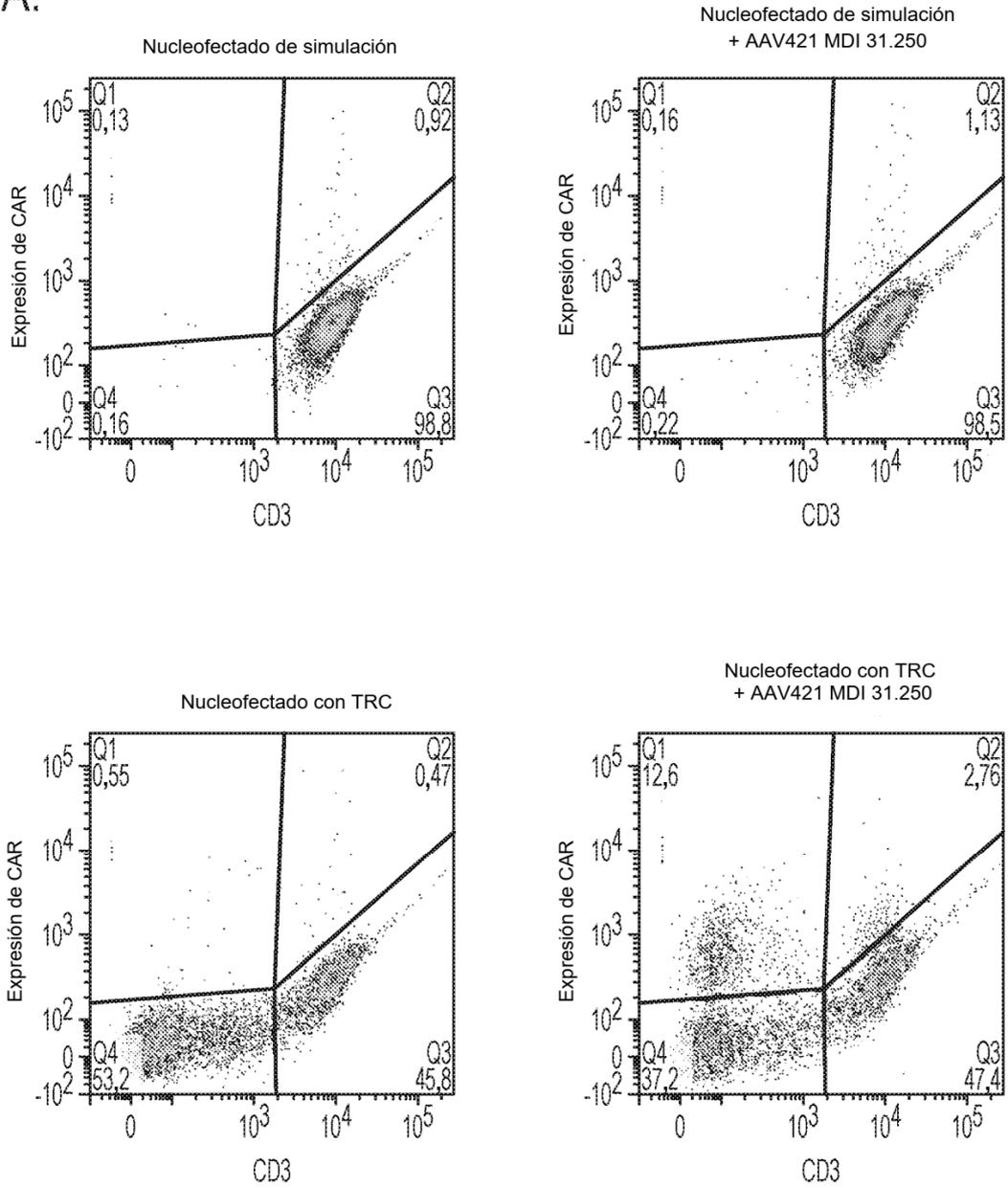


FIGURA 34

B.

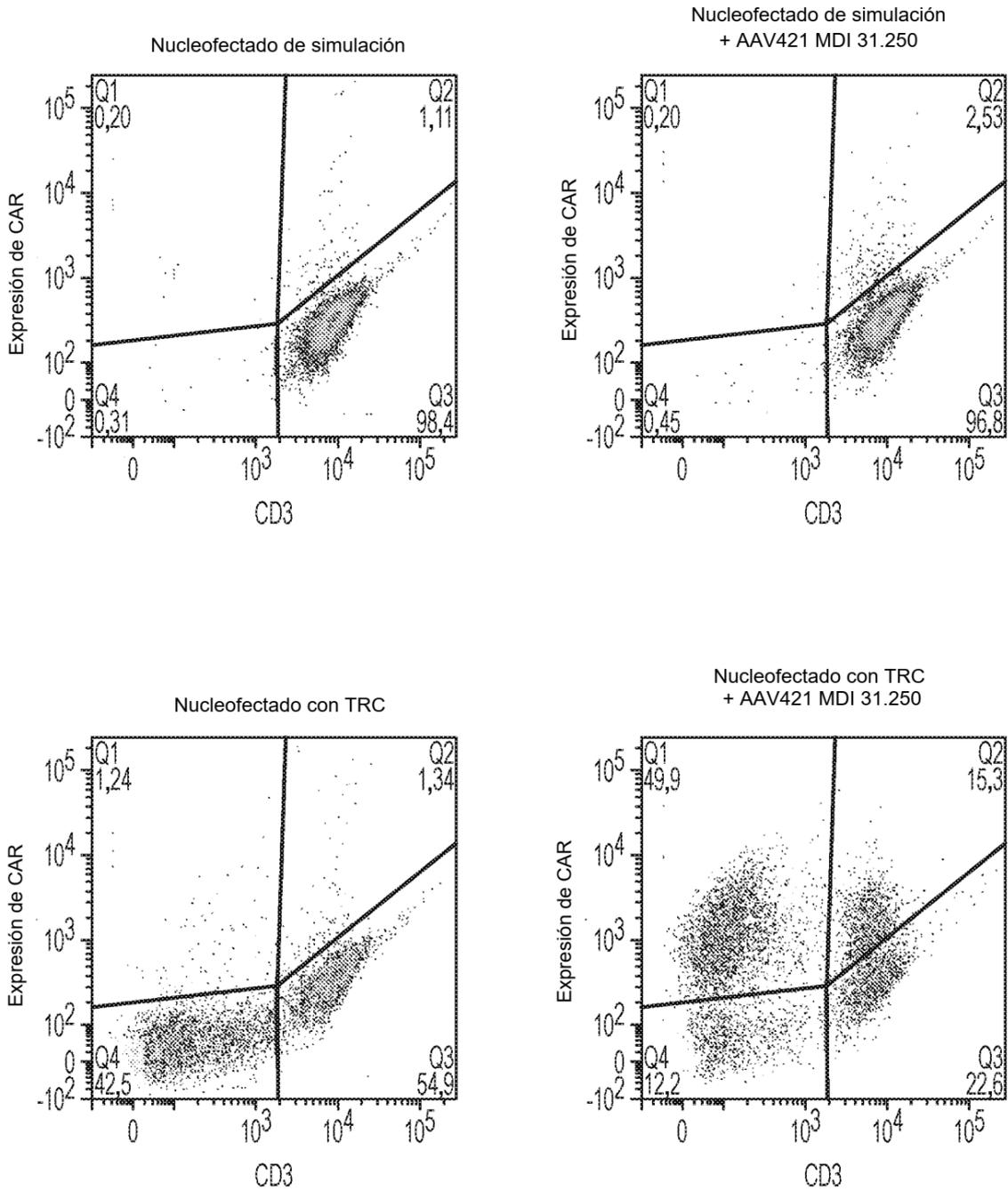


FIGURA 34
CONTINUACIÓN

C.

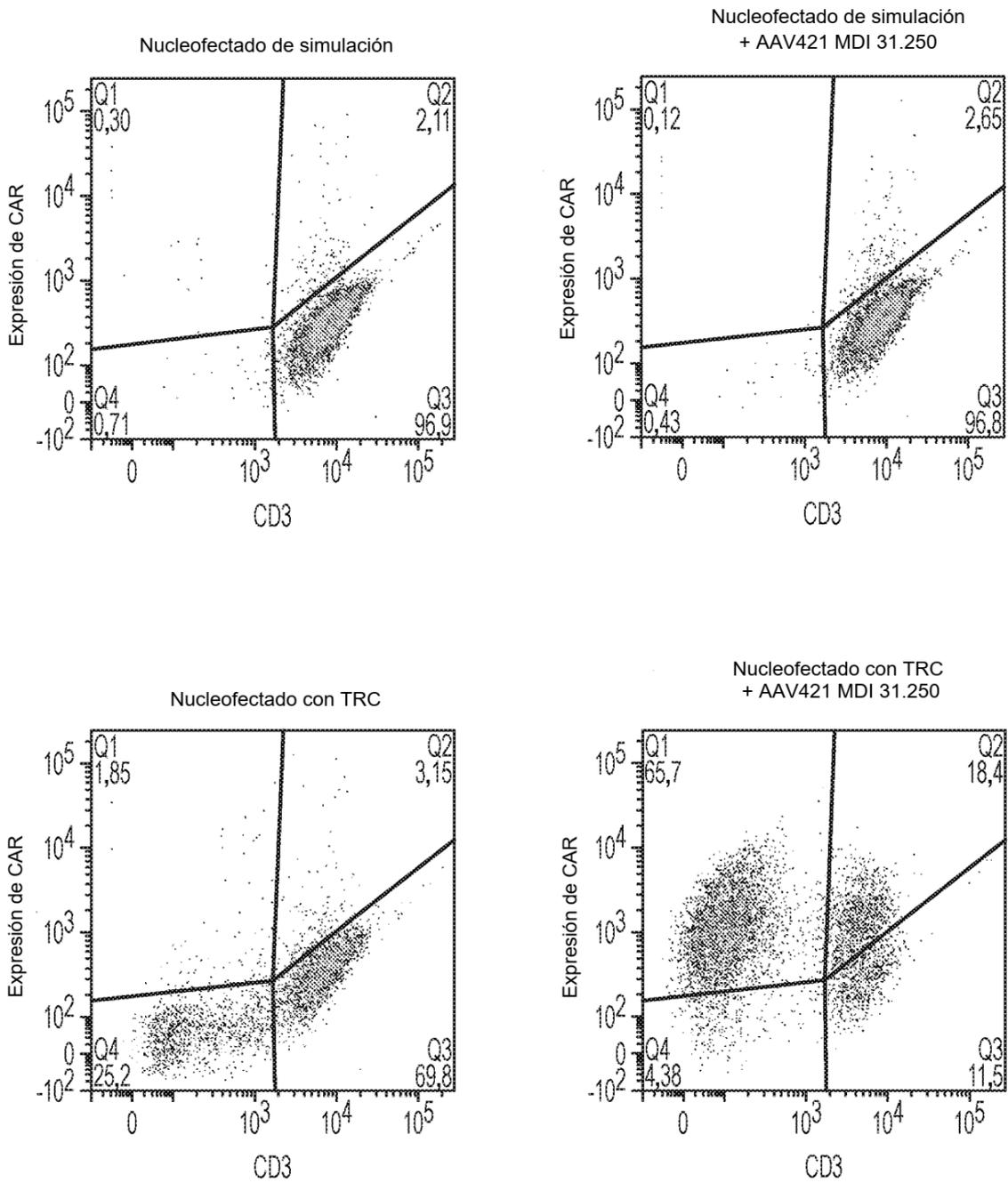


FIGURA 34
CONTINUACIÓN

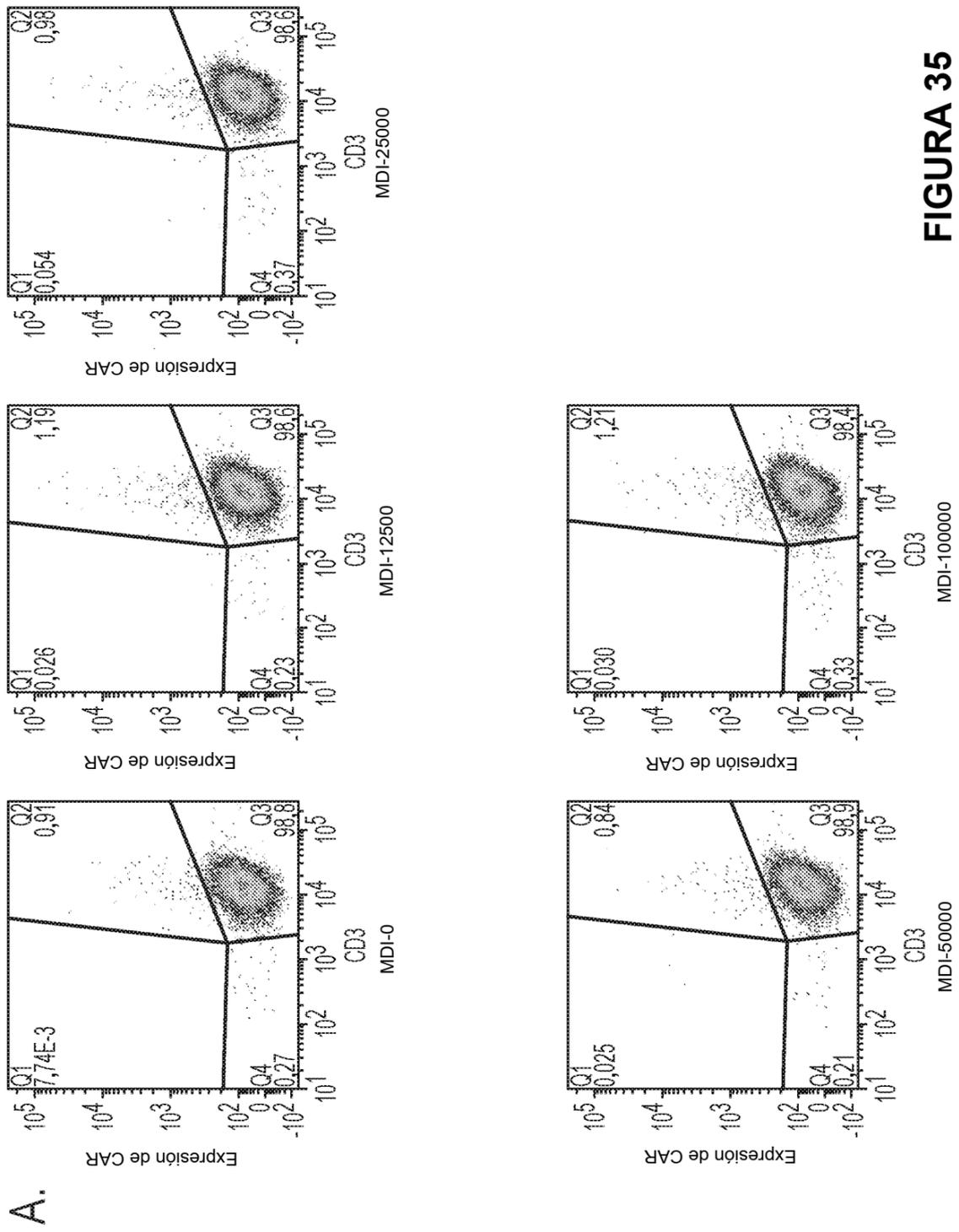


FIGURA 35

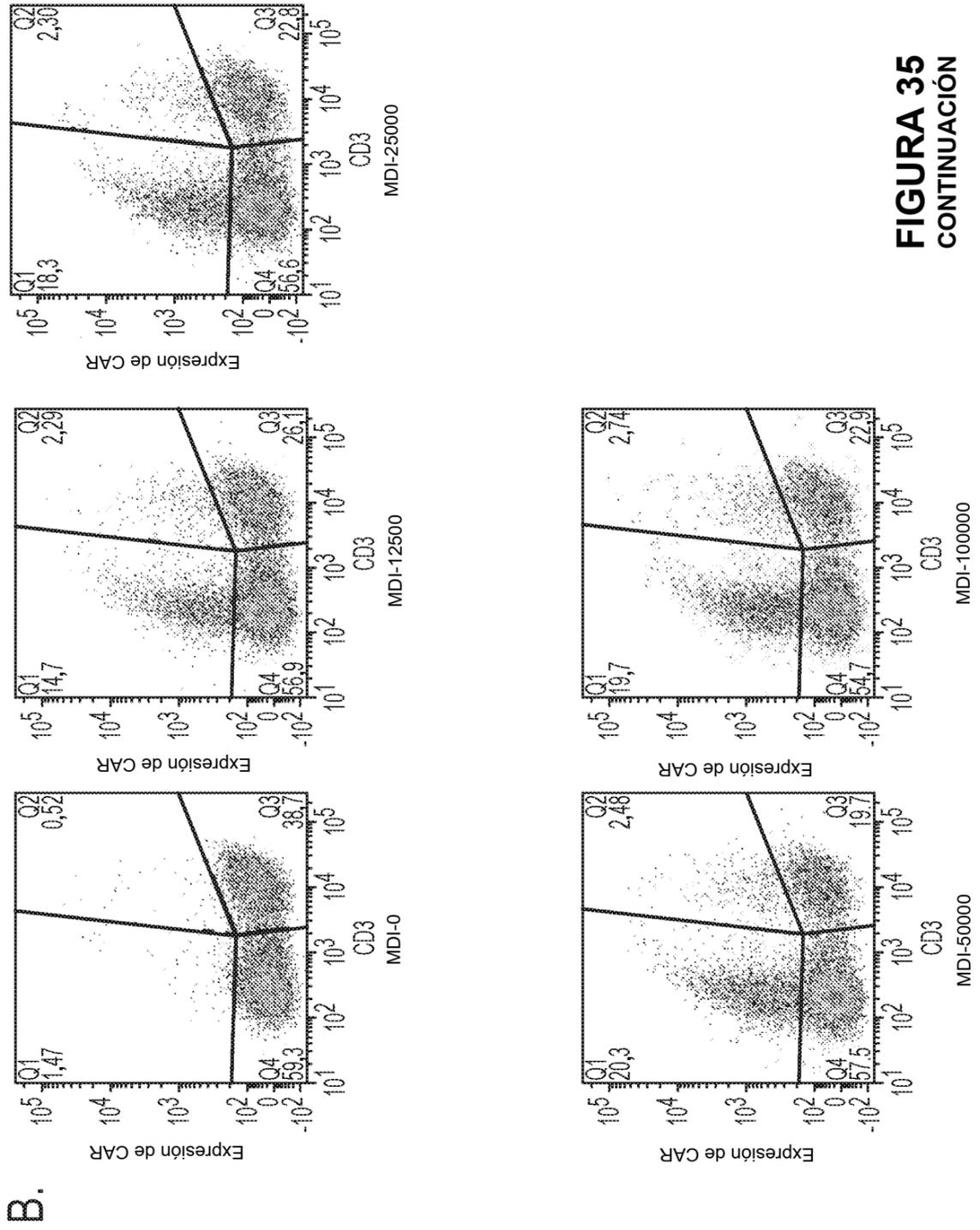


FIGURA 35
CONTINUACIÓN

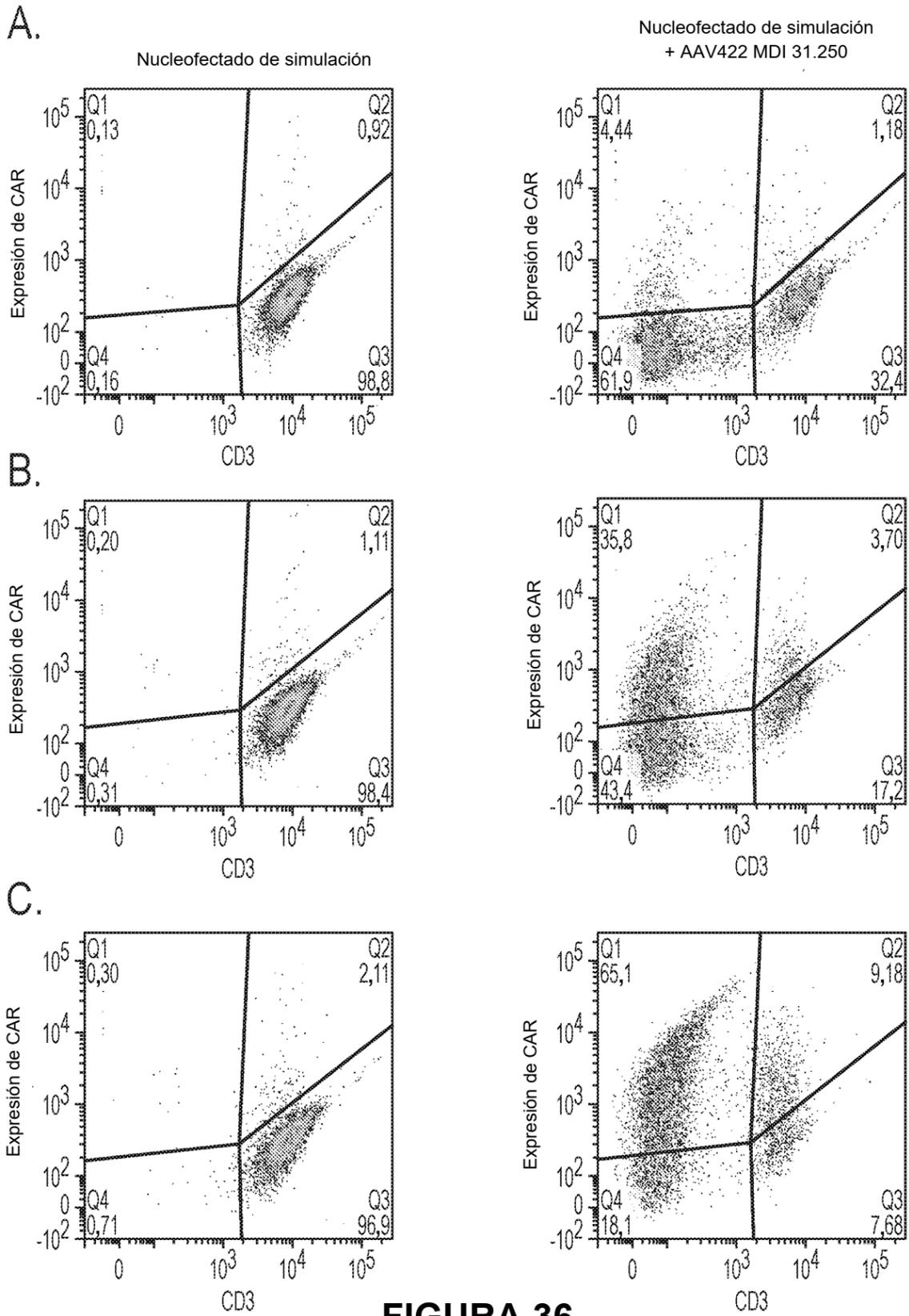


FIGURA 36

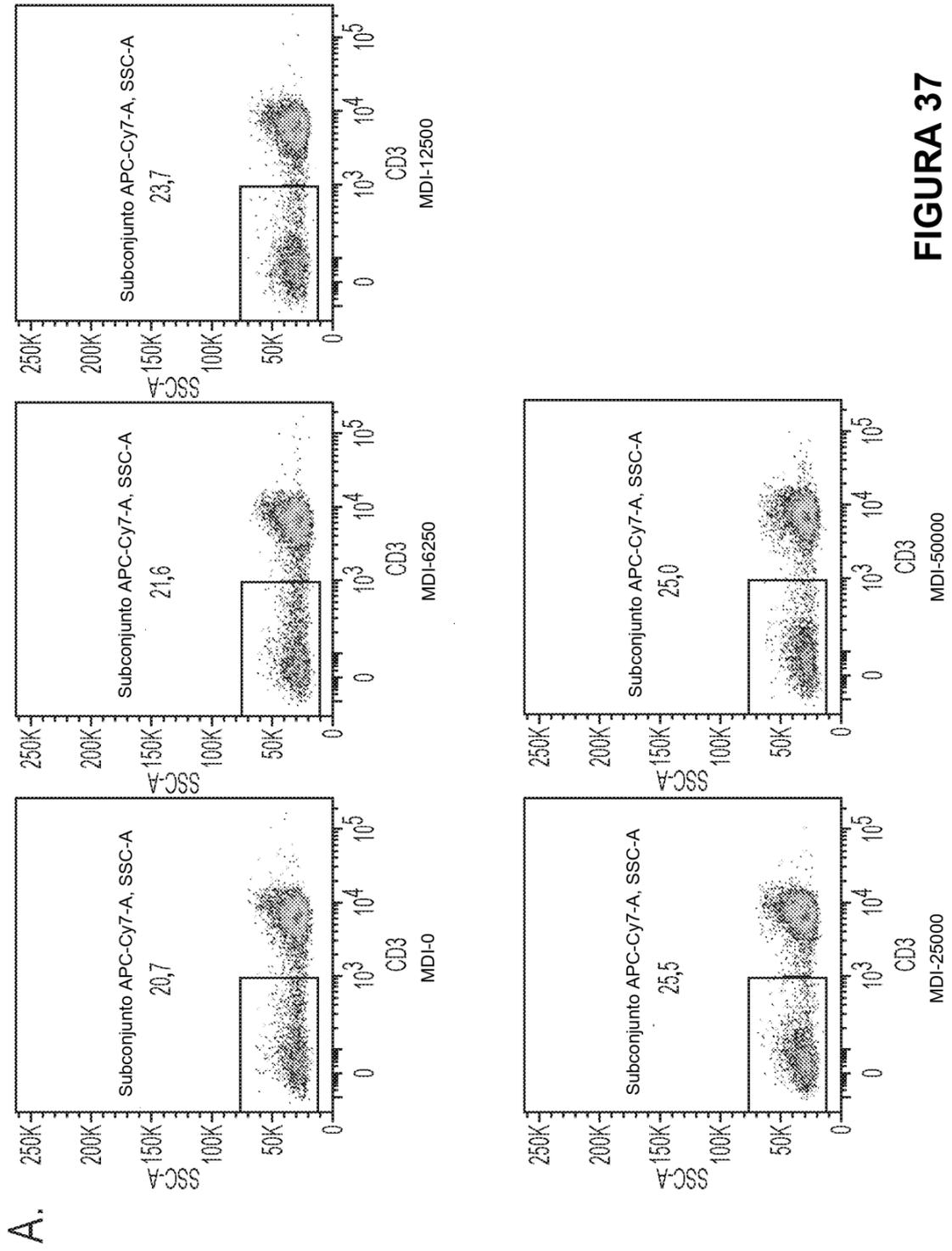


FIGURA 37

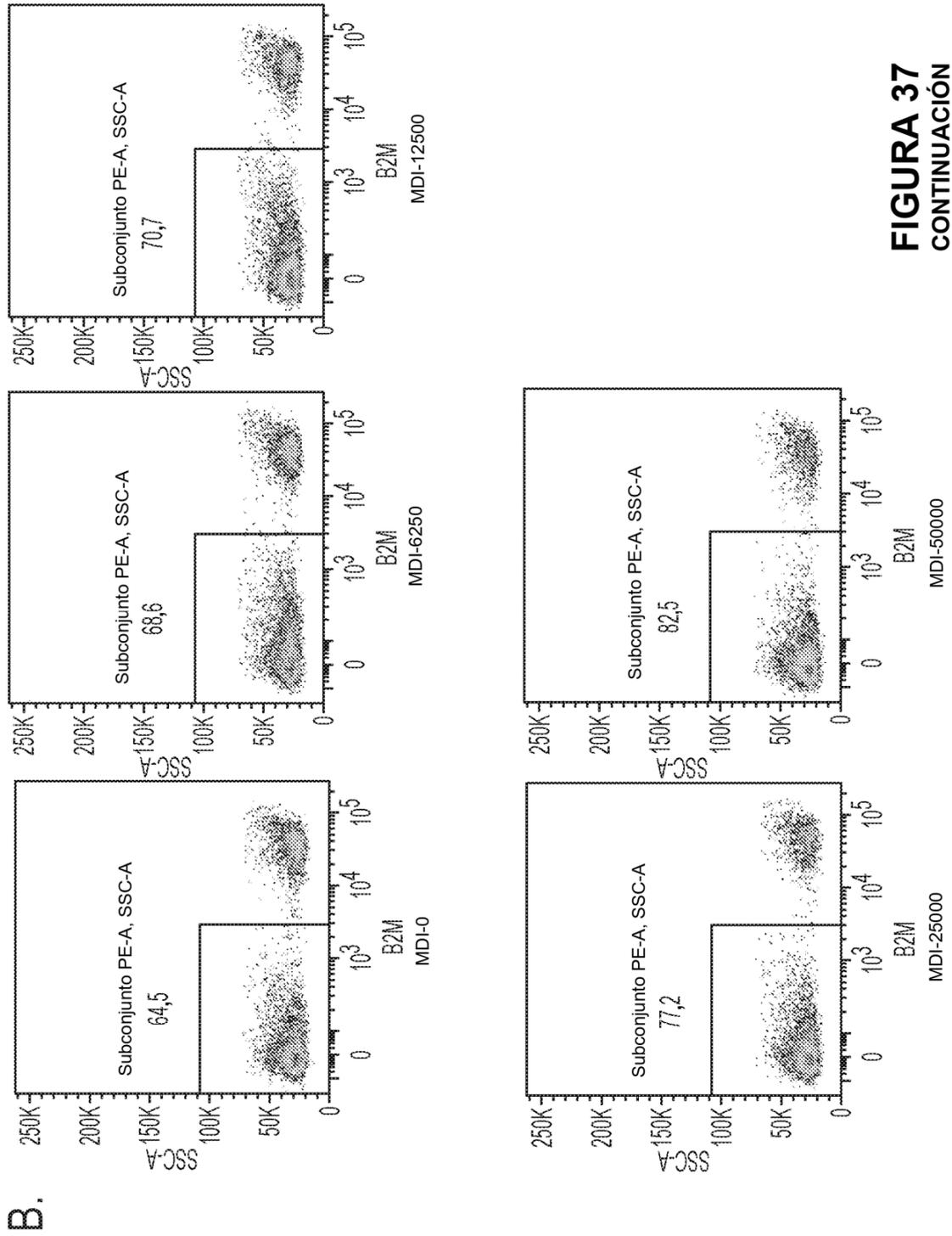


FIGURA 37
CONTINUACIÓN

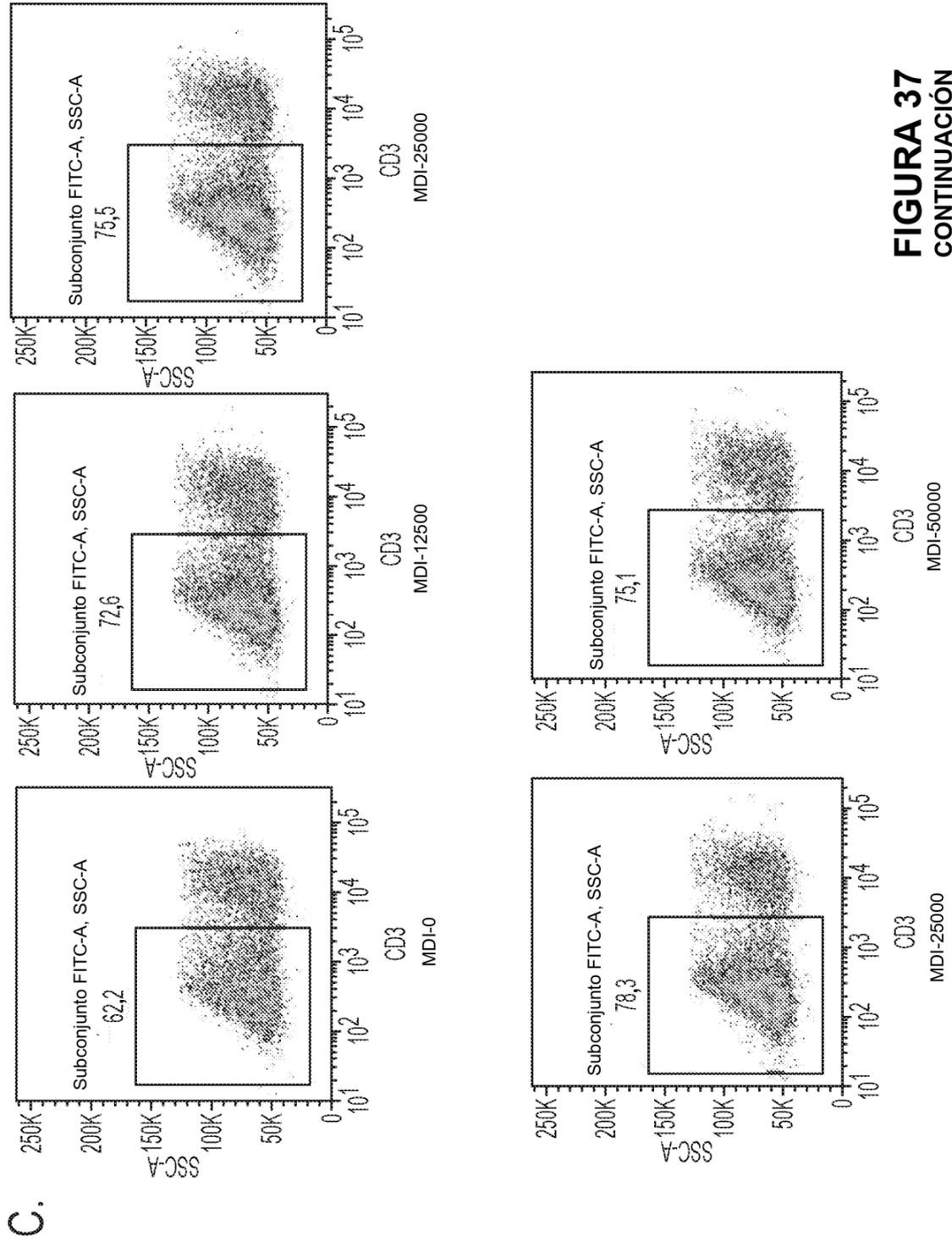
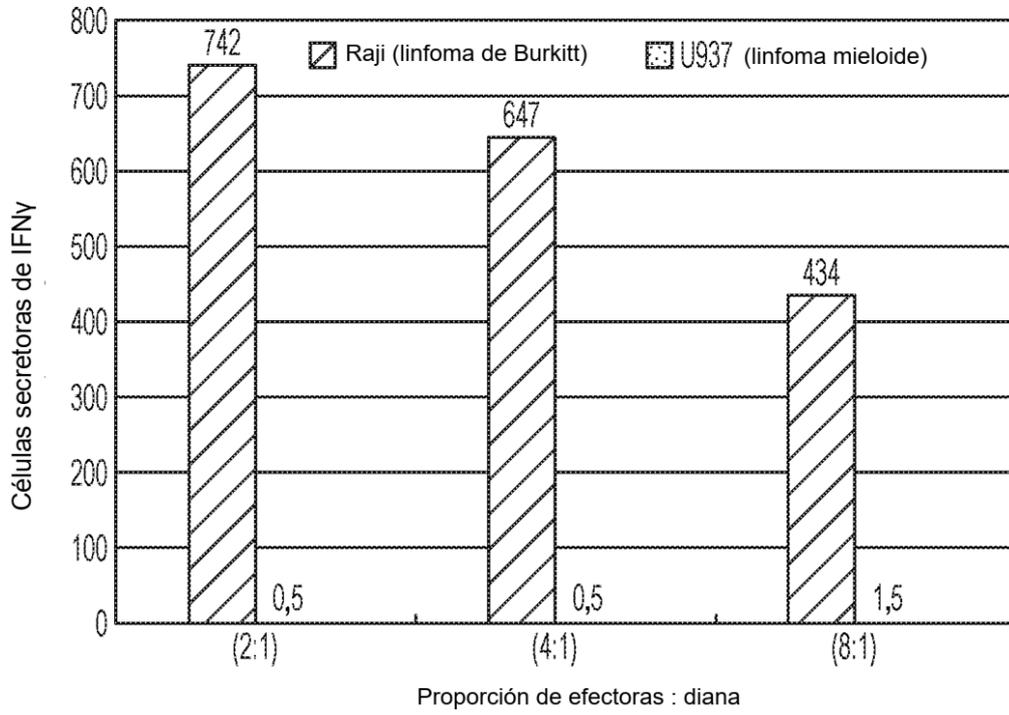


FIGURA 37
CONTINUACIÓN

A.



B.

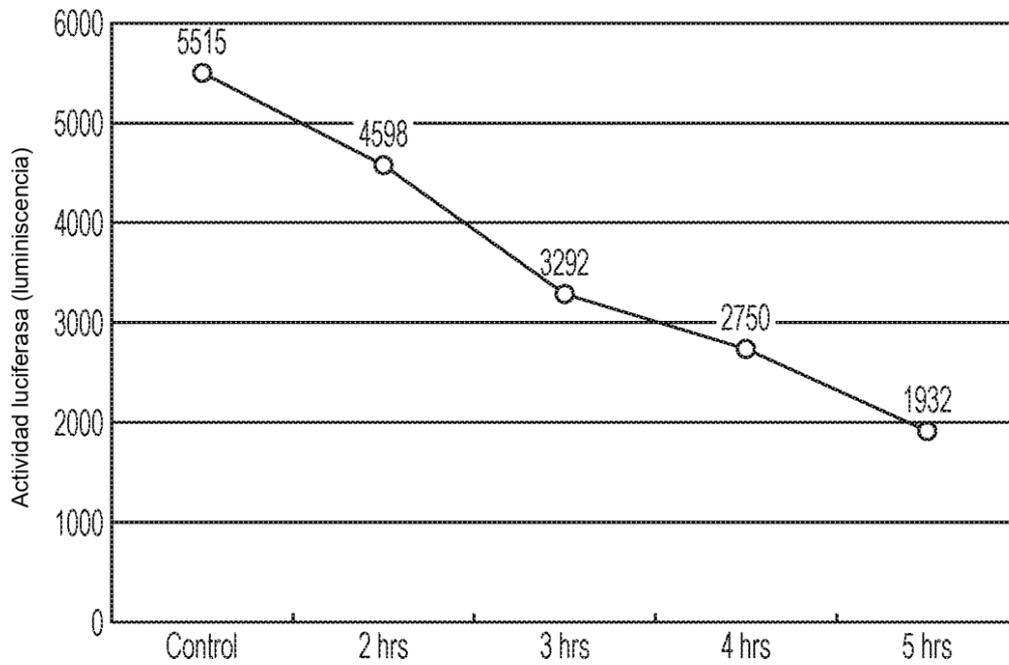


FIGURA 38

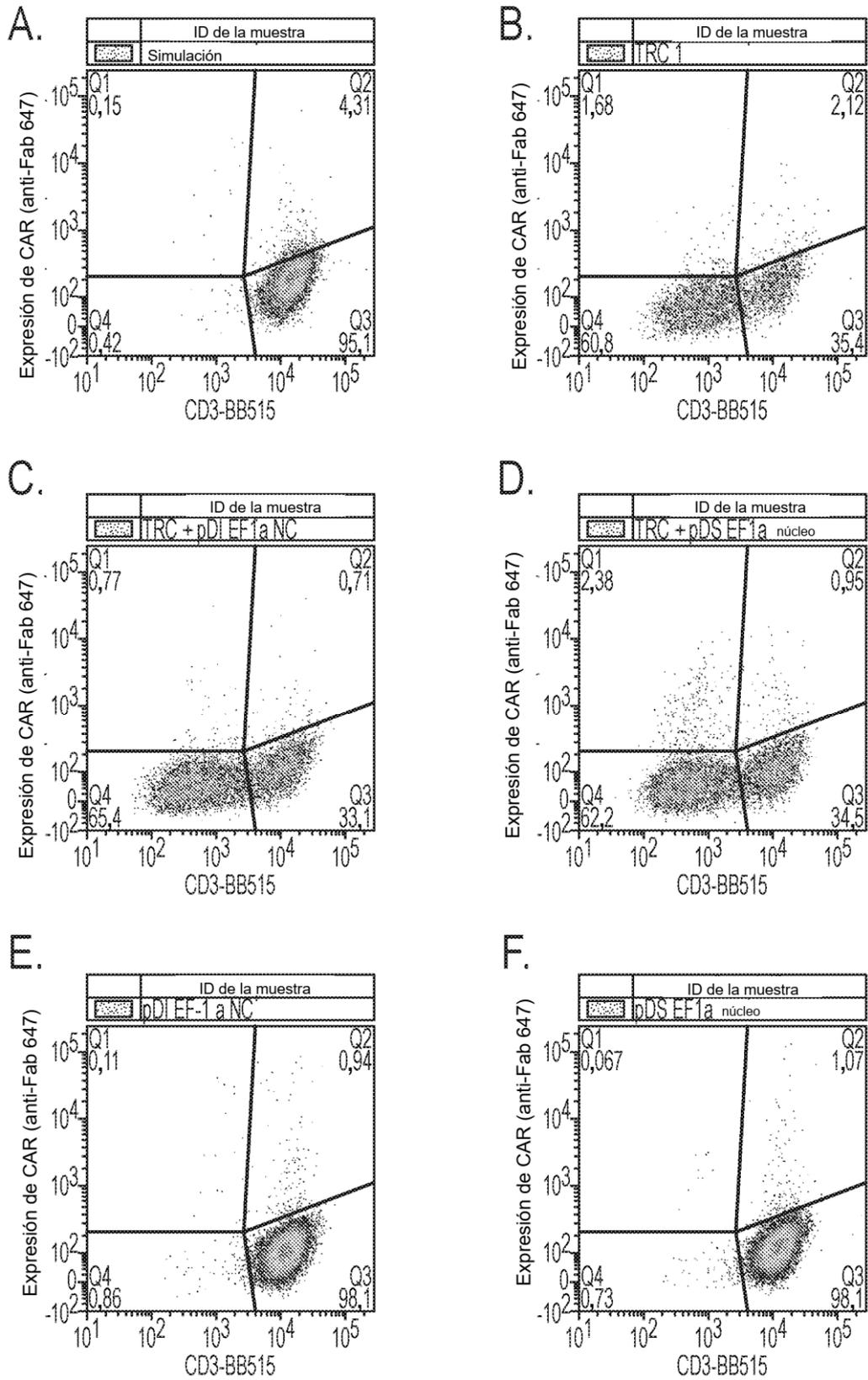


FIGURA 39

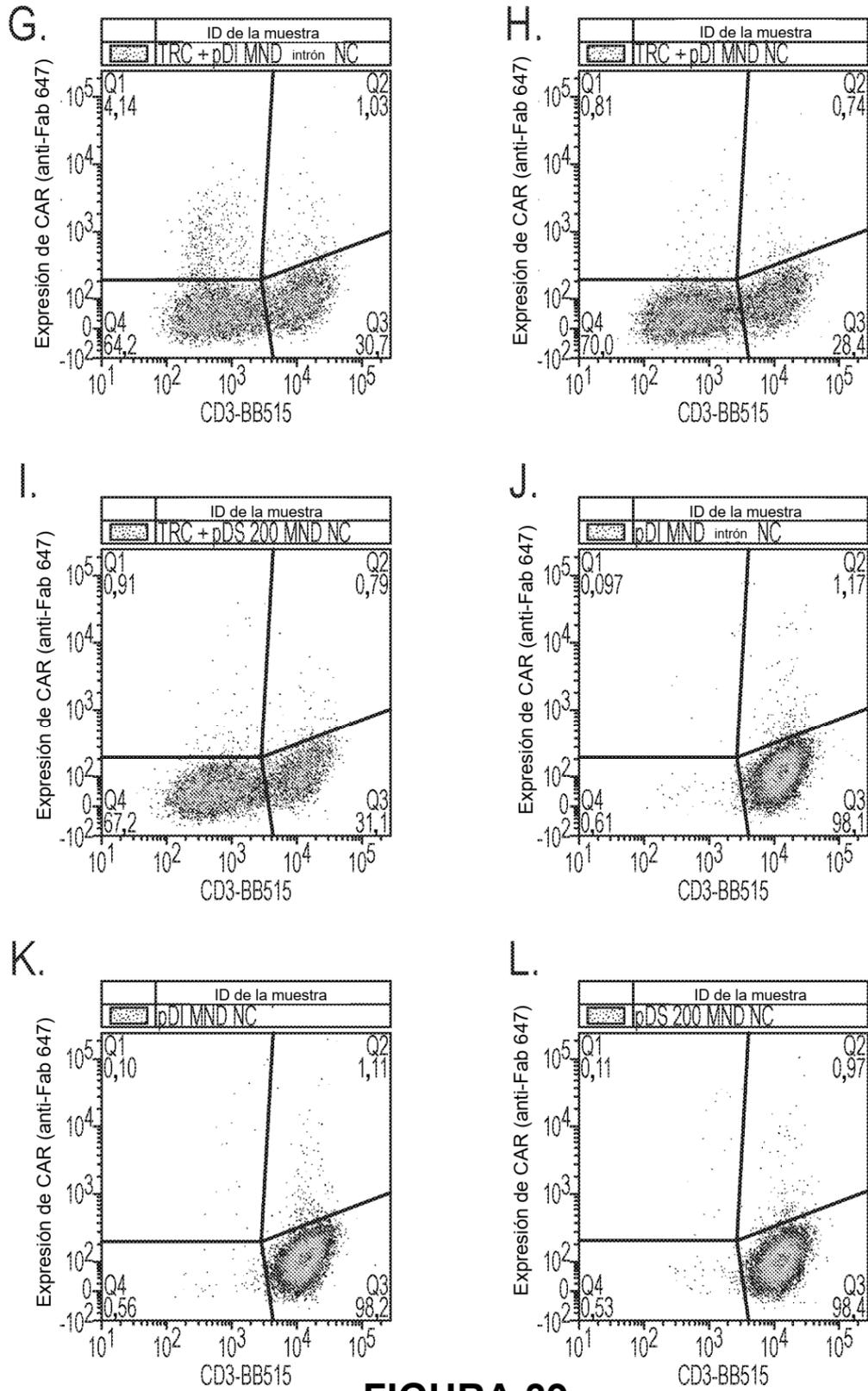
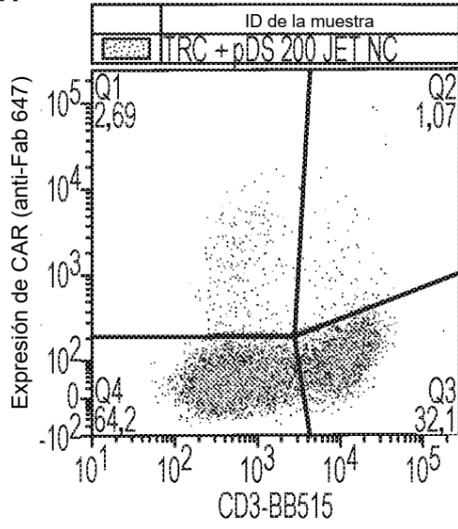
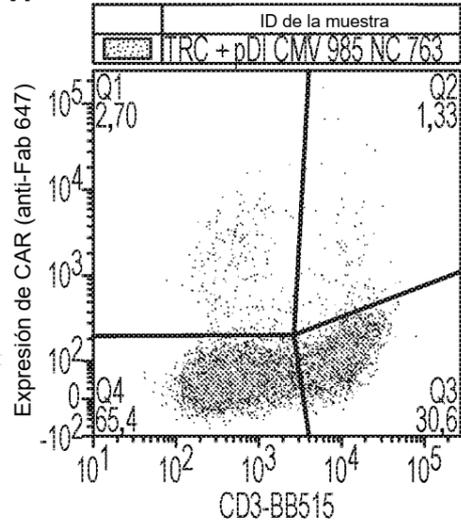


FIGURA 39
CONTINUACIÓN

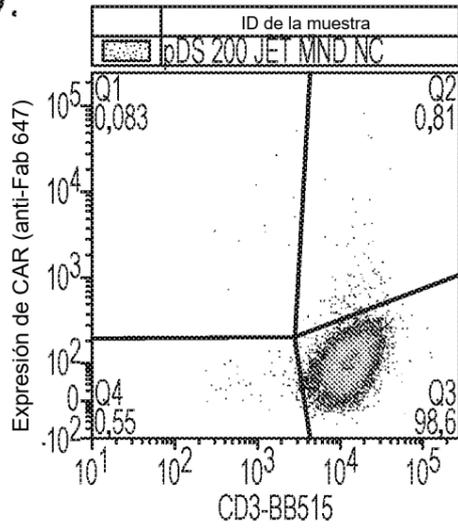
M.



N.



O.



P.

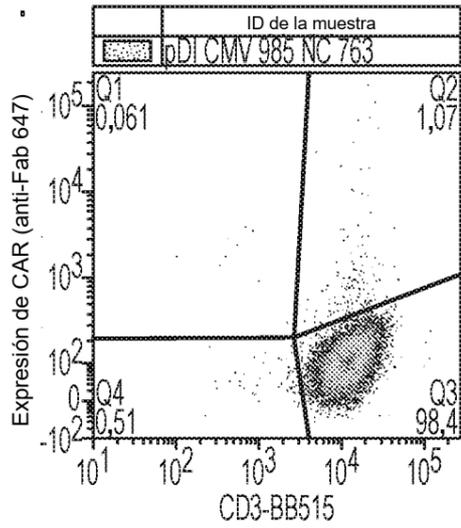


FIGURA 39
CONTINUACIÓN

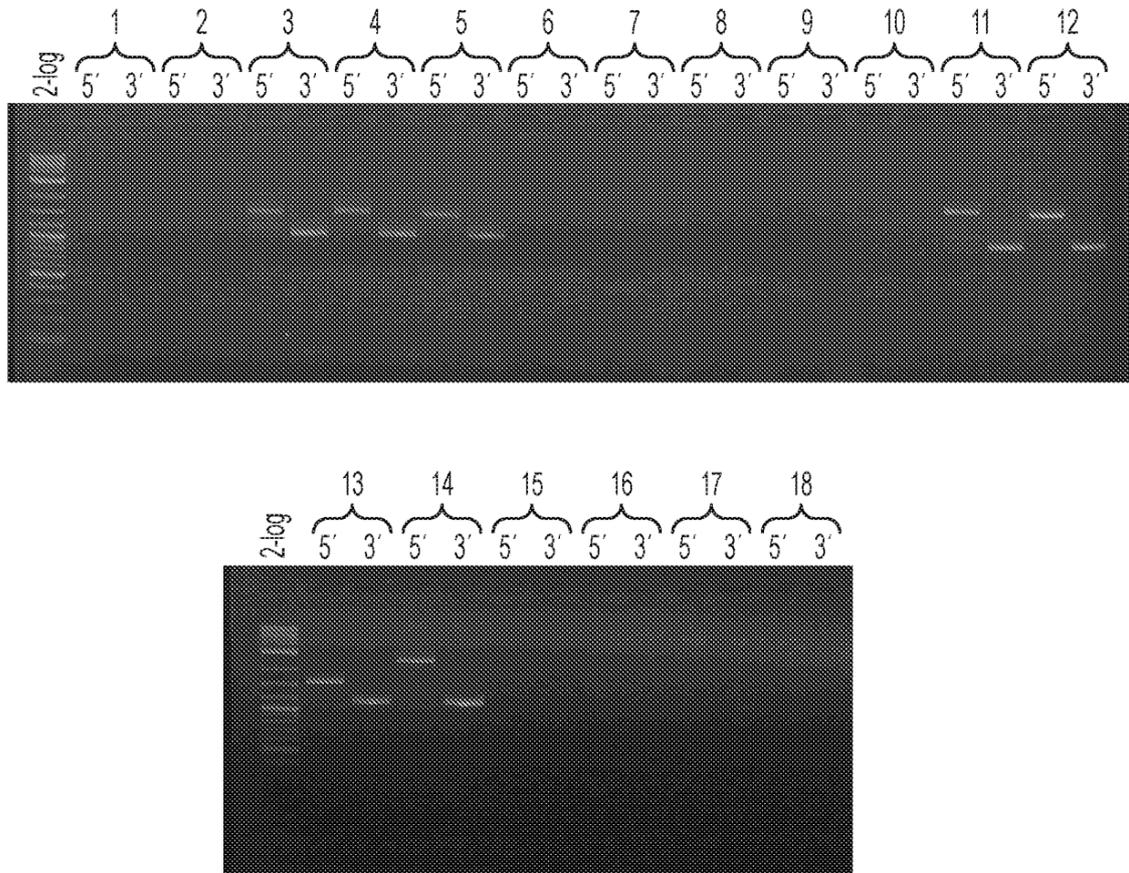


FIGURA 40

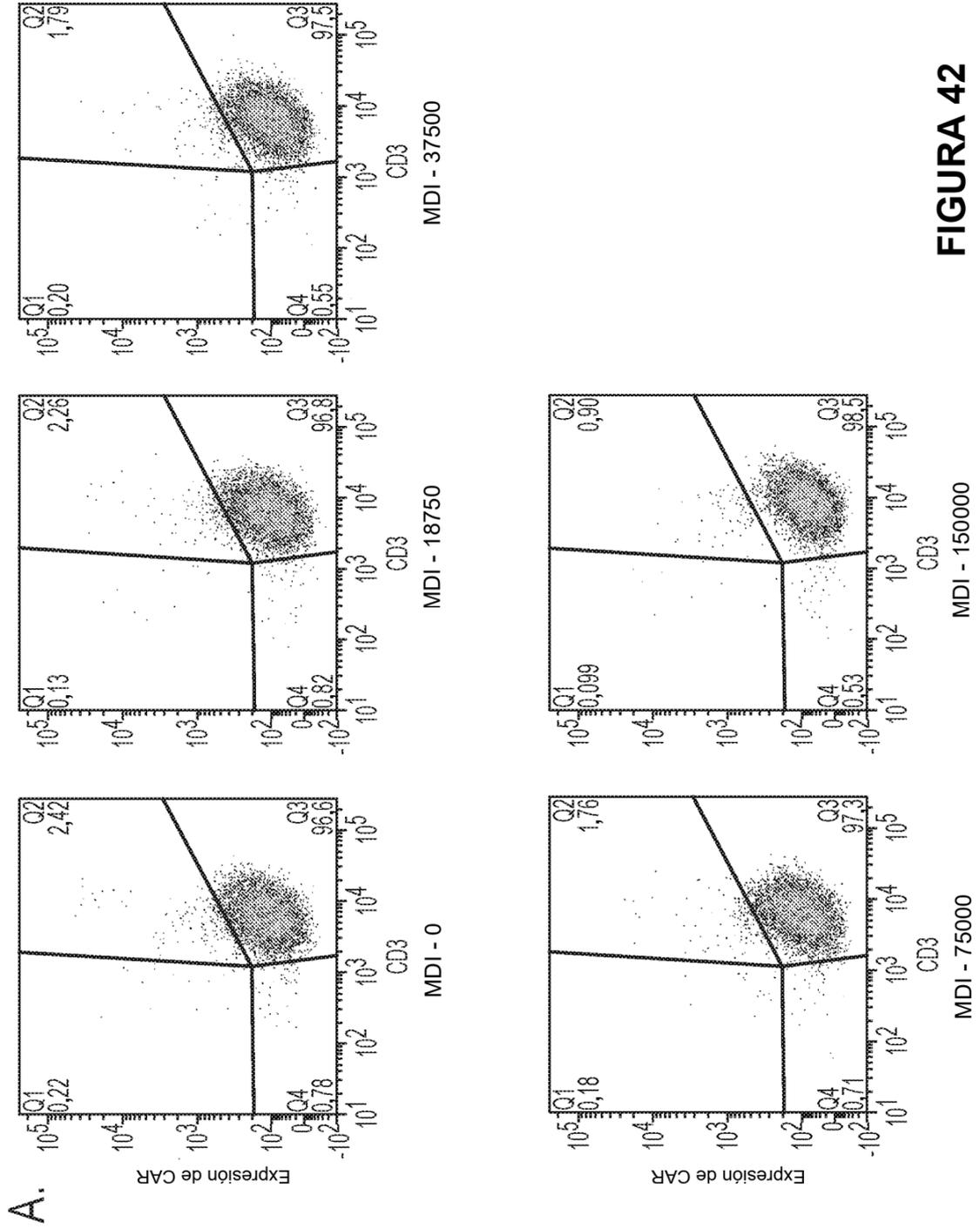
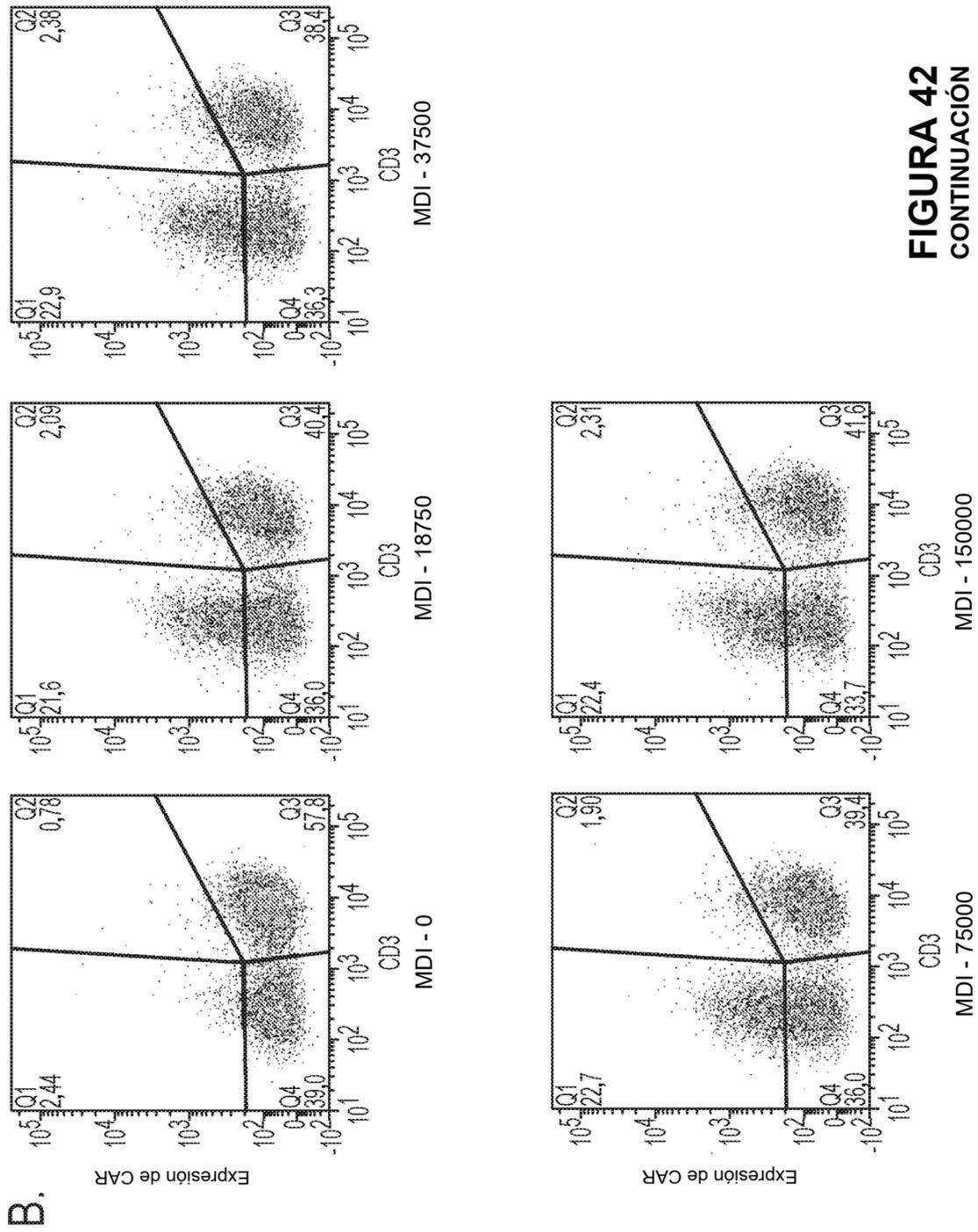


FIGURA 42



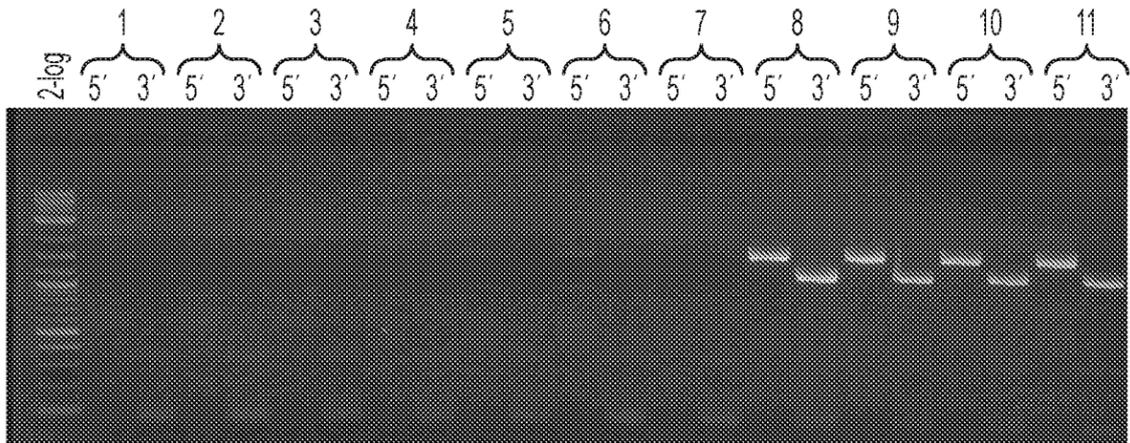


FIGURA 43

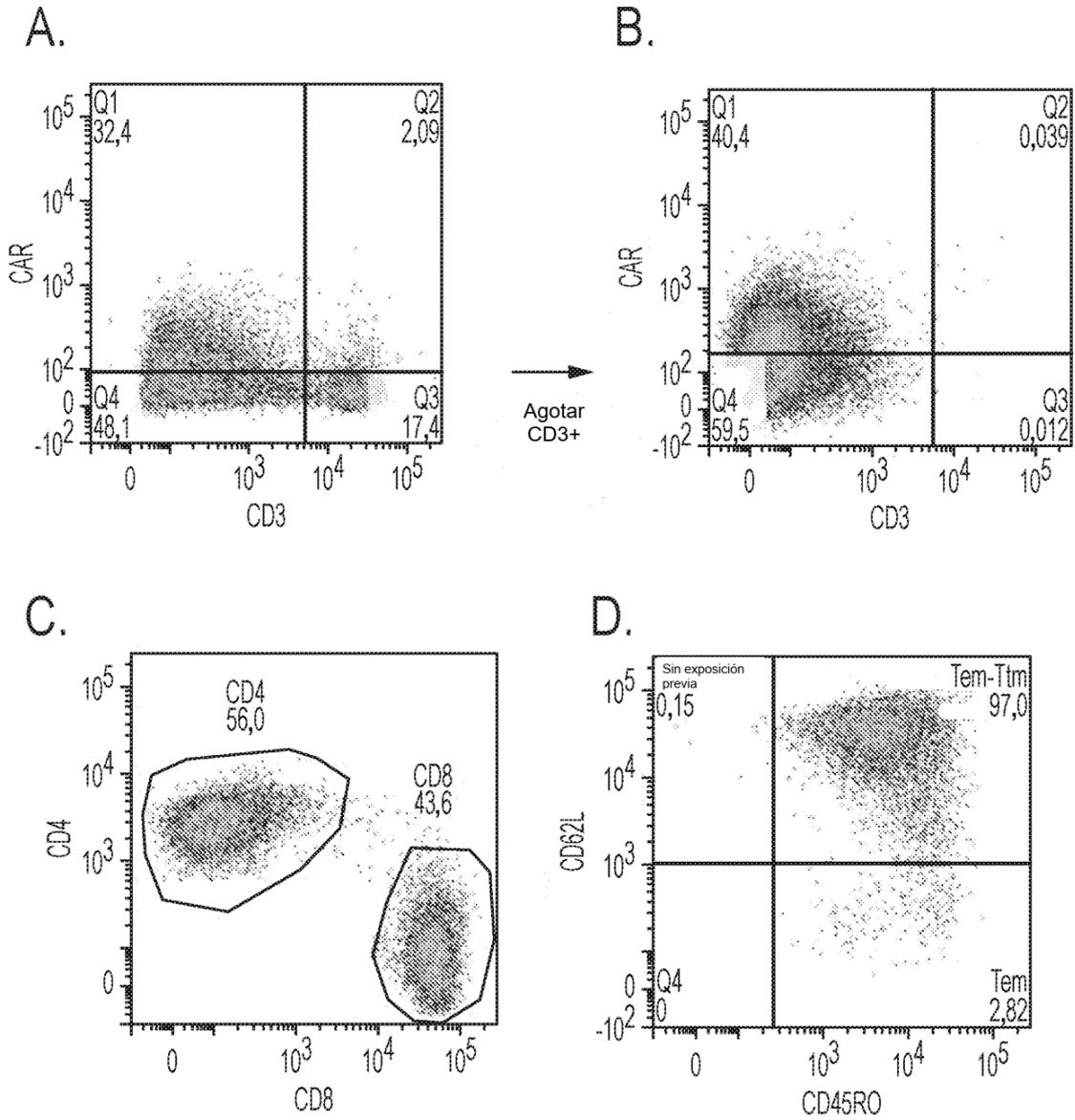


FIGURA 44

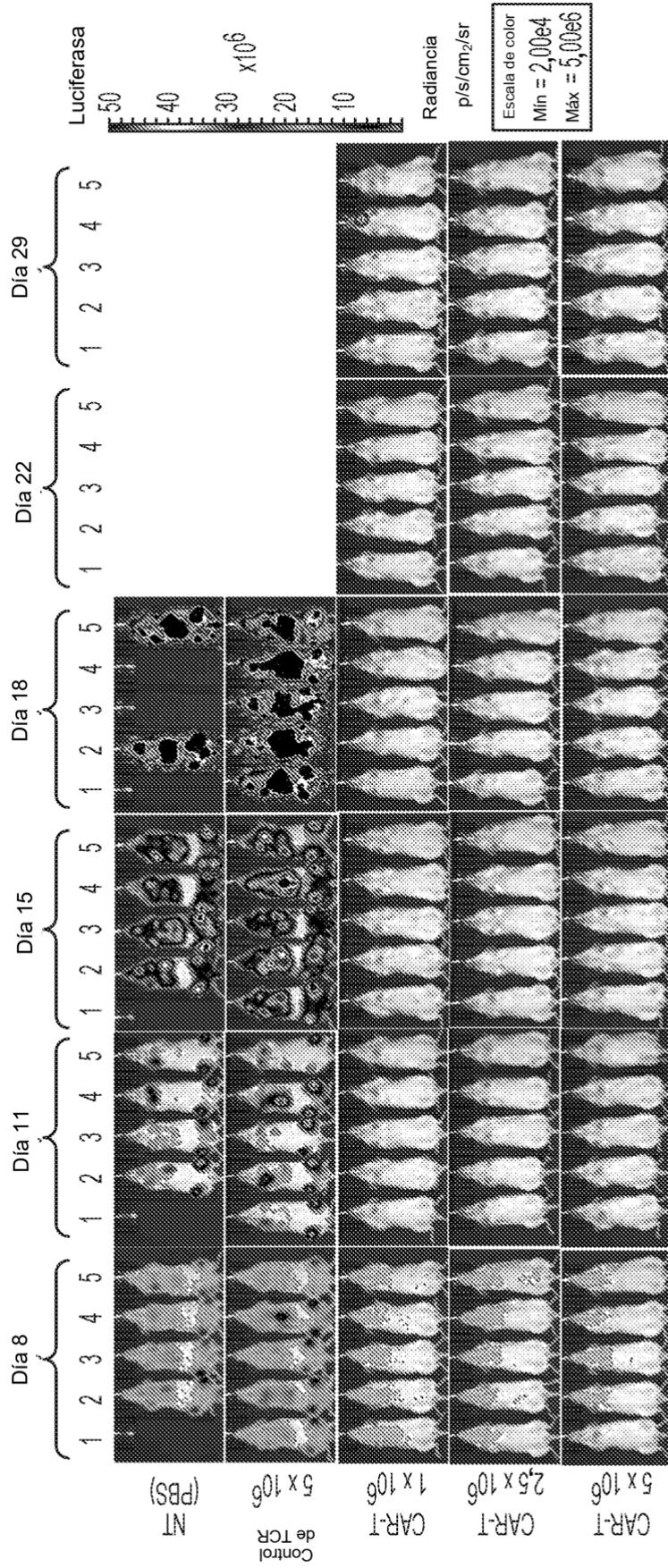


FIGURA 45