

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 500**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2017 PCT/US2017/055133**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2018 WO18067697**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2017 E 17800638 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3523326**

54 Título: **Dominios coestimuladores para su uso en células genéticamente modificadas**

30 Prioridad:

**04.10.2016 US 201662403880 P
04.05.2017 US 201762501475 P
08.09.2017 US 201762556199 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2021

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;
MARTIN, AARON y
MACLEOD, DANIEL, T.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 811 500 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

Dominios coestimuladores para su uso en células genéticamente modificadas

Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere al campo de la biología molecular y la tecnología de ácidos nucleicos recombinantes. En particular, la presente divulgación se refiere a novedosos dominios coestimuladores diseñados mediante ingeniería genética para estimular la producción de linfocitos T y evitar el agotamiento de linfocitos T. La presente divulgación se refiere además a células genéticamente modificadas que comprenden los novedosos dominios coestimuladores y dichas células para su uso en el tratamiento de enfermedades, tales como el cáncer.

Antecedentes de la invención

10 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 (CAR) 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 CAR obtienen su especificidad de los dominios variables de un anticuerpo monoclonal. Por lo tanto, los linfocitos T que expresan los CAR inducen inmunorreactividad tumoral en el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) 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 (LLA), 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.

15 La activación de los linfocitos T se inicia por el receptor endógeno de linfocitos T, que proporciona también especificidad de antígeno a la célula. La señalización del linfocito T se amplifica mediante los receptores coestimuladores de la superficie celular, tales como CD28. En ausencia de coestimulación, la estimulación mediante el receptor de linfocitos T puede ser insuficiente para activar la proliferación de linfocitos T, dando como resultado una anergia celular. La coestimulación sirve también un papel de evitar el agotamiento de linfocitos T y algunas formas de muerte celular inducida por activación. Los primeros receptores activadores de linfocitos T quiméricos se generaron fusionando la cadena- ζ de CD3 al dominio extracelular de los correceptores de linfocitos T, que incluyen CD4, CD8 y CD25.

20 La denominada "primera generación" de receptores de antígenos quiméricos se generó a continuación fusionando la cadena- ζ de CD3 con un fragmento variable monocatenario (scFv), que dio como resultado la especificidad de antígeno y la activación de linfocitos T inducida por el antígeno. Aunque la primera generación de CAR pudo mediar la citotoxicidad, no pudieron dirigir la expansión inducida por el antígeno de linfocitos T primarios modificados. De hecho, los estudios en los primeros modelos de ratón transgénico desvelaron que los linfocitos T que expresan la primera generación de CAR produjeron solo un efecto moderado sobre la progresión tumoral *in vivo* debido a la anergia y a la producción de bajas cantidades de interferón gamma (IFN- γ). Se generaron receptores de antígenos quiméricos de "segunda generación" fusionando adicionalmente un único dominio coestimulador en cis con la cadena- ζ de CD3 citoplásmico. Los estudios demostraron que la adición del dominio coestimulador permitió la expansión de linfocitos T-CAR primarios tras la exposición repetida al antígeno, así como un aumento en la secreción de citoquinas tales como IFN- γ . De hecho, los primeros ensayos clínicos que utilizaron linfocitos T-CAR de segunda generación presentaron persistencia y expansión significativamente mejoradas en pacientes con linfoma de linfocitos B, LLC y LLA de linfocitos B. Se han introducido numerosos dominios coestimuladores en los CAR, tales como elementos CD28, 4-1BB u OX-40, que se han utilizado en células CART administradas a pacientes con neoplasias de linfocitos B. La denominada "tercera generación" de receptores de antígenos quiméricos introdujo dos dominios coestimuladores en tándem con la cadena- ζ de CD3 citoplásmico para permitir una potenciación adicional de la expansión celular y/o la secreción de citoquinas tras la exposición repetida al antígeno.

25 Además de utilizar los dominios coestimuladores en las construcciones CAR, se han incorporado también grupos de dominios coestimuladores en varios "interruptores de seguridad" que se pueden separar del CAR. Uno de dichos interruptores de seguridad comprende los dominios de señalización MyD88 y CD40, fusionados a un dominio de unión que se dimeriza cuando se une con una molécula pequeña tal como rimiducid. Este interruptor de seguridad se usa en tándem con una construcción CAR que comprende solo una cadena ζ de CD3 citoplásmica para fomentar la activación celular. Al administrar la molécula pequeña, el interruptor de seguridad se dimeriza y permite la señalización coestimuladora de MyD88/CD40 para fomentar la expansión de linfocitos T-CAR y la secreción de citoquinas tras el reconocimiento del antígeno por la construcción CAR separada.

30 Se han desvelado previamente numerosos dominios coestimuladores tanto en patentes como en las referencias. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 8.399.645 reivindica un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende el dominio de señalización 4-1BB y el dominio de señalización ζ de CD3. Sin embargo, ninguna ha desvelado los dominios de la presente divulgación ni cualesquiera dominios que tengan una identidad de secuencia del 80 % con los dominios de la presente divulgación.

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

- La presente divulgación proporciona novedosos dominios coestimuladores que son útiles para proporcionar células genéticamente modificadas para fomentar la proliferación celular y/o fomentar la secreción de citoquinas. La presente divulgación adelanta la técnica proporcionando nuevos dominios coestimuladores que fomentan diferentes grados de proliferación celular y/o secreción de citoquinas tras la activación celular inducida por antígenos. Por ejemplo, los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento proporcionan una actividad superior cuando se comparan con aquellos dominios, tales como 4-1BB y CD28. Se desvelan también en el presente documento células genéticamente modificadas que comprenden un receptor de antígeno quimérico (CAR) que incorpora uno o más dominios coestimuladores desvelados en el presente documento. En otros ejemplos, las células genéticamente modificadas desveladas en el presente documento comprenden una construcción reguladora inducible que incorpora uno o más dominios coestimuladores desvelados en el presente documento. Se proporcionan también en el presente documento moléculas de ácidos nucleicos, construcciones de ADN recombinante (por ejemplo, plásmidos), y vectores víricos que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios coestimuladores, y las composiciones que comprenden los novedosos dominios coestimuladores para su uso en los procedimientos de administrar los mismos a sujetos a fin de reducir los síntomas, la progresión o la ocurrencia de una enfermedad. En algunas realizaciones, las células genéticamente modificadas que comprenden los novedosos dominios coestimuladores desvelados en el presente documento se formulan como composiciones farmacéuticas para su uso, por ejemplo, como inmunoterapia en el tratamiento del cáncer.
- Por lo tanto, en un aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8.
- En algunas de dichas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR que comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8.
- En otras de estas realizaciones, el CAR comprende un dominio de unión a antígeno extracelular. En realizaciones particulares, el dominio de unión a antígeno extracelular es un fragmento variable monocatenario (scFv). En diversas realizaciones, el dominio de unión a antígeno tiene especificidad para un antígeno de cáncer o un antígeno tumoral. En realizaciones específicas, el CAR codificado comprende un dominio de unión a antígeno específico de CD 19.
- En dichas realizaciones adicionales, el CAR codificado comprende al menos dos dominios coestimuladores. En dichas realizaciones, los al menos dos dominios coestimuladores son dominios coestimuladores descritos en el presente documento o, como alternativa, son al menos un dominio coestimulador descrito en el presente documento y al menos un dominio coestimulador adicional conocido en la técnica (por ejemplo, 4-1BB, CD28, OX40, ICOS). En algunas realizaciones, el CAR codificado comprende además al menos un dominio de señalización intracelular. En realizaciones particulares, el al menos un dominio de señalización intracelular es el dominio ζ de CD3.
- En realizaciones particulares, la molécula de ácido nucleico es un ARNm, una construcción de ADN recombinante (por ejemplo, un plásmido), o está incluida en un genoma vírico de un vector vírico.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una construcción de ADN recombinante, en el que la construcción de ADN recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la construcción de ADN recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR descrito en el presente documento, en el que el CAR comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8.
- En algunas de dichas realizaciones, la construcción de ADN recombinante codifica un vector vírico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, el vector vírico es un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector de un virus adenoasociado (VAA). En una realización específica, el vector vírico es un vector de VAA recombinante.
- En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un vector vírico que comprende la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, el vector vírico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR descrito en el presente documento, en el que el CAR comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8.
- En realizaciones particulares, el vector vírico es un vector retrovírico, un vector lentivírico, un vector adenovírico o un vector de un virus adenoasociado (VAA). En una realización específica, el vector vírico es un vector de VAA recombinante.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un linfocito T humano genéticamente modificado, en el que el linfocito T humano genéticamente modificado comprende la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, el linfocito T humano genéticamente modificado comprende un casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR descrito en el presente documento, en el que el CAR comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8. En realizaciones particulares, el linfocito T humano genéticamente modificado comprende un casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una construcción reguladora inducible descrita en el presente documento, en el que la construcción reguladora inducible comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8. En algunas de dichas realizaciones, la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, o el casete de expresión descrito en el presente documento, está presente en el genoma del linfocito T humano modificado genéticamente o, como alternativa, no está integrado en el genoma de la célula. En algunas de dichas realizaciones, la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, o el casete de expresión descrito en el presente documento, está presente en el linfocito T humano modificado genéticamente en una construcción de ADN recombinante, en un ARNm o en un genoma vírico, que no está integrado en el genoma de la célula.

En algunas realizaciones, el linfocito T humano modificado genéticamente es un linfocito T humano primario. En realizaciones adicionales, la célula modificada genéticamente es un linfocito T-CAR humano.

En realizaciones particulares, el linfocito T humano modificado genéticamente descrito en el presente documento presenta un aumento en la proliferación y/o secreción de citoquinas en comparación con una célula del control que no comprende un dominio coestimulador descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el aumento en la proliferación y/o la secreción de citoquinas se presenta *in vitro* y/o *in vivo*. En realizaciones particulares, el aumento en la secreción de citoquinas comprende un aumento en IFN- γ , IL-2, TNF-alfa, u otras citoquinas asociadas con la activación y/o la proliferación celular en comparación con una célula del control que no comprende un dominio coestimulador descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un linfocito T humano modificado genéticamente que comprende al menos un dominio coestimulador descrito en el presente documento, comprendiendo el procedimiento introducir en una célula al menos una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones del procedimiento, la molécula de ácido nucleico introducida codifica un CAR descrito en el presente documento que comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además introducir en la célula: (i) una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una nucleasa diseñada mediante ingeniería genética, en el que la nucleasa diseñada mediante ingeniería genética se expresa en la célula, o (ii) una proteína nucleasa diseñada mediante ingeniería genética; en la que la nucleasa diseñada mediante ingeniería genética reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento para producir un sitio de escisión en el genoma de la célula y en la que el ácido nucleico que codifica el al menos un dominio coestimulador o variante activa o fragmento del mismo se inserta en el genoma en el sitio de escisión. En algunas realizaciones, la nucleasa diseñada mediante ingeniería genética es una meganucleasa diseñada mediante ingeniería genética, una nucleasa de dedo de zinc recombinante (ZEN), una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción recombinante (TALEN), una nucleasa CRISPR/Cas, o una nucleasa megaTAL. En una realización particular del procedimiento, la nucleasa diseñada mediante ingeniería genética es una meganucleasa diseñada mediante ingeniería genética. En una realización específica, la meganucleasa diseñada mediante ingeniería genética es una meganucleasa monocatenaria.

En una de estas realizaciones del procedimiento, la molécula de ácido nucleico que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8 introducida en la célula comprende además secuencias homólogas a las secuencias que flanquean el sitio de escisión de la nucleasa, de tal manera que la molécula de ácido nucleico se inserta en el genoma en el sitio de escisión mediante recombinación homóloga. En otra dicha realización del procedimiento, la molécula de ácido nucleico carece de homología sustancial con el sitio de escisión de la nucleasa de tal manera que la molécula de ácido nucleico se inserta en el genoma mediante una unión final no homóloga.

En algunas realizaciones del procedimiento, la célula es un linfocito T humano primario. En determinadas realizaciones, la célula modificada genéticamente producida con el procedimiento es un linfocito T-CAR humano.

En realizaciones específicas del procedimiento, la molécula de ácido nucleico que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende secuencias de aminoácidos que se definen en la SEQ ID NO: 8 se introduce en la célula usando un ARNm descrito en el presente documento, una construcción de ADN recombinante descrita en el presente documento o un vector vírico descrito en el presente documento.

En algunas realizaciones, la introducción de al menos una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8 aumenta la activación, proliferación, y/o secreción de citoquinas de la célula modificada genéticamente. En realizaciones específicas, el aumento en la secreción de citoquinas comprende un aumento en la secreción de IFN- γ , IL-2, TNF-alfa, o cualquier otra citoquina asociada con la activación y/o la proliferación celular cuando se compara con una célula del control que no comprende un dominio coestimulador descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable y linfocitos T humanos modificados genéticamente descritos en el presente documento que comprenden al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8. En realizaciones particulares, los linfocitos T humanos modificados genéticamente comprenden un CAR descrito en el presente documento que comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8.

En realizaciones específicas, los linfocitos T humanos modificados genéticamente son linfocitos T-CAR. En algunas de dichas realizaciones, los linfocitos T-CAR comprenden un CAR que incluye un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8. En diversas realizaciones, los linfocitos T-CAR tienen especificidad para un antígeno específico de cáncer o de tumor, y la composición farmacéutica es útil en procedimientos de inmunoterapia contra el cáncer.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona linfocitos T humanos modificados genéticamente para su uso en un procedimiento de inmunoterapia para tratar el cáncer en un sujeto, en el que los linfocitos T humanos modificados genéticamente son aquellos descritos en el presente documento que comprenden al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID: 8. En algunas realizaciones del procedimiento, los linfocitos T humanos modificados genéticamente comprenden un CAR descrito en el presente documento que comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos que se define en la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, las células genéticamente modificadas son linfocitos T-CAR. En dichas realizaciones, los linfocitos T-CAR tienen especificidad para un antígeno específico de cáncer o de tumor y son procedimientos útiles en inmunoterapia contra el cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia de linfocitos B (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (LLA), linfoma no de Hodgkin de linfocitos B (LNH) linfoma no de Hodgkin (LNH) de linfocitos B o leucemia linfocítica crónica), mieloma múltiple, neuroblastoma, glioblastoma, gliomas avanzados, cáncer de ovario, mesotelioma, melanoma o cáncer de páncreas. En realizaciones particulares, el cáncer es un linfoma de linfocitos B.

En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de carcinoma, linfoma, sarcoma, blastomas, y leucemia.

En algunas realizaciones, el cáncer 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, rabdomiosarcoma, leucemia y linfoma de Hodgkin. En algunas realizaciones, 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.

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, varias 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 desvelan en el presente documento como si todas y cada una de las subcombinaciones se desvelaran 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 a cada uno del resto de aspectos de la invención de manera análoga haciendo los cambios necesarios.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la alineación de los novedosos dominios coestimuladores Novell (SEQ ID NO: 5), Novel3 (SEQ ID NO: 6), Novel5 (SEQ ID NO: 7), y Novel6 (SEQ ID NO: 8). Se identifican motivos de unión a TRAF individuales, y se pueden encontrar regiones espaciadoras entre los motivos de unión a TRAF en cada dominio coestimulador relacionado.

La Figura 2 muestra construcciones CAR que comprenden un scFv anti-CD 19, una bisagra de CD8 y un dominio

transmembrana, un dominio coestimulador y un dominio de señalización intracelular ζ de CD3. Los dominios coestimuladores que se muestran incluyen CD28, 4-1BB, Novell (N1), Novel3 (N3), Novel5 (N5), y Novel6 (N6). Se muestra también una construcción de CAR que carece de dominio coestimulador.

Las Figuras 3A-3H notifican los resultados de un análisis GFP que demuestra la expresión de CAR tras la transducción con lentivirus de linfocitos T procedentes de un donante humano. Se notifican los resultados para cada uno de los novedosos dominios coestimuladores Novell (N1), Novel3 (N3), Novel5 (N5), y Novel6 (N6). Figura 3A) Transducción simulada. Figura 3B) Transducido con CAR que comprende un dominio coestimulador 4-1BB. Figura 3C) Transducido con CAR que comprende un dominio coestimulador CD28. Figura 3D) Transducido con CAR que comprende un dominio no coestimulador (BB-). Figura 3E) Transducido con CAR que comprende un dominio coestimulador Novell (N1). Figura 3F) Transducido con CAR que comprende un dominio coestimulador Novel3 (N3). Figura 3G) Transducido con CAR que comprende un dominio coestimulador Novel5 (N5). Figura 3H) Transducido con CAR que comprende un dominio coestimulador Novel6 (N6).

Las Figuras 4A, 4B y 4C muestran las cifras de expansión de linfocitos T-CAR medidas en el tiempo tras activación repetida inducida por antígenos en un cultivo de células Raji. Se notifican los resultados para cada uno de los novedosos dominios coestimuladores Novell (N1), Novel3 (N3), Novel5 (N5), y Novel6 (N6). La Figura 4A muestra los resultados obtenidos para poblaciones mixtas de linfocitos T-CAR CD4⁺ y CD8⁺. La Figura 4B muestra los resultados obtenidos para una población de linfocitos T-CAR CD4⁺. La Figura 4C muestra los resultados obtenidos para una población de linfocitos T-CAR CD8⁺.

Las Figuras 5A, 5B y 5C muestran la secreción de citoquinas en cada población de linfocitos T-CAR transducidos a los 3, 7, 10, y 14 días después de la transducción. La Figura 5A muestra la secreción de interferón gamma (IFN- γ). La Figura 5B muestra la secreción de TNF-alfa (TNF- α). La Figura 5C muestra la secreción de IL-2.

Las Figuras 6A, 6B y 6C muestran numerosas expansiones de linfocitos T-CAR medidas en el tiempo tras activación repetida inducida por antígenos en un cultivo de células Raji usando un encuentro de antígenos más frecuente y una relación diana:efector más alta. Se notifican los resultados para cada uno de los novedosos dominios coestimuladores Novell (N1), Novel3 (N3), Novel5 (N5), y Novel6 (N6). La Figura 6A muestra los resultados obtenidos para poblaciones mixtas de linfocitos T-CAR CD4⁺ y CD8⁺. La Figura 6B muestra los resultados obtenidos para una población de linfocitos T-CAR CD4⁺. La Figura 6C muestra los resultados obtenidos para una población de linfocitos T-CAR CD8⁺.

La Figura 7 muestra construcciones de moldes del donante que comprenden, de 5' a 3', una repetición terminal invertida en 5' (ITR), un brazo de homología en 5', un promotor, secuencias de codificación de un scFv anti-CD19, una bisagra de CD8 y un dominio transmembrana, un dominio coestimulador, y un dominio de señalización intracelular ζ de CD3, una señal poliA de SV40, un brazo de homología en 3' y una ITR en 3'. Los dominios coestimuladores que se muestran incluyen 4-1BB, Novell (N1), y Novel6 (N6).

La Figura 8A y 8B muestran la proliferación de linfocitos T-CAR con el tiempo en respuesta a un antígeno que utiliza linfocitos T-CAR preparados a partir de dos donantes diferentes. La proliferación se midió para linfocitos T-CAR que comprendían los dominios coestimuladores 4-1BB, N1, o N6. Se descubrió que los novedosos dominios de señalización coestimuladores respaldan niveles de proliferación que son iguales o mejores que los niveles respaldados por la señalización de 4-1BB. La Figura 8A muestra resultados usando linfocitos T-CAR preparados a partir del donante K799.

La Figura 8B muestra resultados usando linfocitos T-CAR preparados a partir del donante z4100.

Las Figuras 9A y 9B muestran la destrucción de células K19 a diversas relaciones de efector:diana (E:T) a las 24 h y a las 72 h de un cocultivo con linfocitos T-CAR que comprende los dominios coestimuladores 4-1BB, N1 o N6. La Figura 9A muestra linfocitos T-CAR preparados a partir del donante K799. La Figura 9B muestra linfocitos T-CAR preparados a partir del donante z4100.

Las Figuras 10A, 10B y 10C muestran histogramas de los resultados del ensayo de proliferación de células utilizado para determinar la proliferación relativa de linfocitos T-CAR que comprenden los dominios coestimuladores 4-1BB, N1 o N6 en respuesta a las células diana CD19⁺. La Figura 10A muestra la proliferación de linfocitos T-CAR-4-1BB CAR en comparación con los linfocitos T TRC KO del control en dos relaciones E:T diferentes. La Figura 10B muestra la proliferación de linfocitos T-CAR-4-1BB en comparación con los linfocitos T CAR-N1. La Figura 10C muestra la proliferación de linfocitos T CAR-4-1BB en comparación con los linfocitos T CAR-N6.

La Figura 11 muestra las construcciones molde del donante 7241, 7205, y 7206 que comprenden, de 5' a 3', una repetición terminal invertida en 5' (ITR), un brazo de homología en 5', un promotor, secuencias de codificación de un scFv anti-CD19, una bisagra de CD8 y un dominio transmembrana, un dominio coestimulador, y un dominio de señalización intracelular ζ de CD3, una señal poli A de SV40 o una señal bi-poliA de SV40, un brazo de homología en 3' y una ITR en 3'. Los dominios coestimuladores que se muestran incluyen 4-1BB (construcción 7241) y Novel 6 (N6; construcciones 7205 y 7206).

Las Figuras 12A-12G muestran los valores del flujo total dorsal y ventral observado *in vivo* en ratones tras el injerto y crecimiento de células Raji-ffluc y el posterior tratamiento con células TCR KO o linfocitos T-CAR que llevan las construcciones 7205, 7206, o 4-1BB CAR. La Figura 12A muestra el flujo dorsal después del tratamiento con células TCR KO. La Figura 12B muestra el flujo dorsal después del tratamiento con linfocitos T CAR 7205. La Figura 12C muestra el flujo dorsal después del tratamiento con linfocitos T CAR 7206. La Figura 12D muestra el flujo dorsal después del tratamiento con linfocitos T CAR 4-1BB. La Figura 12E muestra el flujo ventral después del tratamiento con células TCR KO. La Figura 12F muestra el flujo ventral después del tratamiento con linfocitos T CAR 7205.

La Figura 12G muestra el flujo ventral después del tratamiento con linfocitos T CAR 7206. La Figura 12H muestra el flujo ventral después del tratamiento con linfocitos T CAR 4-1BB.

Las Figuras 13A-13D muestran las imágenes del flujo total dorsal y ventral observado *in vivo* en ratones tras el injerto y crecimiento de células Raji-ffluc y el posterior tratamiento con células TCR KO o linfocitos T-CAR que llevan las construcciones 7205, 7206, o 4-1BB CAR. La Figura 13A muestra las imágenes del flujo dorsal en los días 7, 10 y 16 en los grupos tratados con células TCR KO, linfocitos T CAR 7205, linfocitos T CAR 7206, y linfocitos T CAR 4-1BB. La Figura 13B muestra las imágenes del flujo dorsal en los días 24, 31 y 38 en grupos tratados con linfocitos T CAR 7205, linfocitos T CAR 7206, y linfocitos T CAR 4-1BB. La Figura 13C muestra las imágenes del flujo ventral en los días 7, 10 y 16 en los grupos tratados con células TCR KO, linfocitos T CAR 7205, linfocitos T CAR 7206, y linfocitos T CAR 4-1BB. La Figura 13D muestra las imágenes del flujo ventral en los días 24, 31, y 38 en los grupos tratados con linfocitos T CAR 7205, linfocitos T CAR 7206, y linfocitos T CAR 4-1BB.

La Figura 14 muestra la curva de supervivencia de ratones tras el injerto y crecimiento de células Raji-ffluc y el posterior tratamiento con células TCR KO o linfocitos T-CAR que llevan las construcciones 7205, 7206, o 4-1BB CAR.

La Figura 15 muestra la construcción molde del donante 7240 que comprende, de 5' a 3', una repetición terminal invertida en 5' (ITR), un brazo de homología en 5', un promotor, secuencias de codificación para un scFv anti-CD19, una bisagra de CD8 y un dominio transmembrana, un dominio de coestimulador MyD88, un dominio coestimulador Novel6 (N6), y un dominio de señalización intracelular ζ de CD3, una señal bi-poliA de SV40, un brazo de homología en 3' y una ITR en 3'.

Las Figuras 16A-16F muestran los resultados de un ensayo de proliferación Cell Trace Violet utilizando linfocitos T humanos transfectados para expresar un CAR anti-CD19 que comprende el dominio coestimulador Novel6 (N6), o un CAR que comprende ambos dominios coestimuladores MyD88 y Novel6 (N6). Las células transfectadas se marcaron con Cell Trace Violet y se cocultivaron con células K562 negativas para CD19 o células K562 positivas para CD19 diseñadas mediante ingeniería genética (células K19). Se evaluó la proliferación mediante citometría de flujo para los subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. La Figura 16A muestra linfocitos CD4⁺ transfectados solamente con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE. La Figura 16B muestra linfocitos CD8⁺ transfectados solamente con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE. La Figura 16C muestra linfocitos CD4⁺ transfectados con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y un molde del donante de N6 CAR del donante. La Figura 16D muestra linfocitos CD8⁺ transfectados con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y un molde del donante de N6 CAR del donante. La Figura 16E muestra linfocitos CD4⁺ transfectados con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y un molde de MyD88/N6 CAR del donante. La Figura 16F muestra linfocitos CD8⁺ transfectados con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y un molde de MyD88/N6 CAR del donante.

La Figura 17 muestra la construcción molde del donante 7235 que comprende, de 5' a 3', una repetición terminal invertida en 5' (ITR), un brazo de homología en 5', un promotor, las secuencias de codificación de un dominio coestimulador MyD88, un dominio coestimulador Novel6 (N6), los dominios FKBP12v36 de unión a ligando en tándem (Fv), un elemento T2A, secuencias de codificación para un scFv anti-CD19, un CD8 bisagra y un dominio transmembrana, y un dominio de señalización intracelular ζ de CD3, una señal bi-poliA de SV40, un brazo de homología en 3' y una ITR en 3'.

Las Figuras 18A y 18B muestran los resultados de un ensayo de proliferación Cell Trace Violet que utiliza linfocitos T humanos transfectados para expresar solamente la meganucleasa TRC 1-2x.87EE sin un molde del donante. Las células transfectadas se marcaron con Cell Trace Violet y se cocultivaron con células K562 negativas para CD19 o células K562 positivas para CD19 diseñadas mediante ingeniería genética (células K19). Se evaluó la proliferación mediante citometría de flujo para los subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. La Figura 18A muestra el subconjunto de células CD4⁺. La Figura 18B muestra el subconjunto de células CD8⁺.

Las Figuras 19A-9D muestran los resultados de un ensayo de proliferación Cell Trace Violet que utiliza linfocitos T humanos transfectados para expresar un CAR anti-CD19 que comprende un dominio Novel6 (N6). Las células transfectadas se marcaron con Cell Trace Violet y se cocultivaron con células K562 negativas para CD 19 o células K562 positivas para CD19 diseñadas mediante ingeniería genética (células K19). Se evaluó la proliferación mediante citometría de flujo para los subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Además, se evaluaron las células en un cocultivo de K19 en presencia o ausencia de rimiducid. La Figura 19A muestra el subconjunto de linfocitos CD4⁺ cultivados en células K19 o K562. La Figura 19B muestra el subconjunto de linfocitos CD4⁺ cultivados en células K19 en presencia o ausencia de rimiducid. La Figura 19C muestra el subconjunto de linfocitos CD8⁺ cultivados en células K19 o K562. La Figura 19D muestra el subconjunto de linfocitos CD8⁺ cultivados en células K19 en presencia o ausencia de rimiducid.

Las Figuras 20A-20D muestran los resultados de un ensayo de proliferación Cell Trace Violet utilizando linfocitos T humanos transfectados para expresar un CAR anti-CD19 que carece de un dominio coestimulador junto con una construcción inducible que comprende los dominios coestimuladores MyD88 y Novel6 (N6) (iMyD88/N6 CAR). Las células transfectadas se marcaron con Cell Trace Violet y se cocultivaron con células K562 negativas para CD19 o células K562 positivas para CD19 diseñadas mediante ingeniería genética (células K19). Además, se evaluaron las células en un cocultivo de K19 en presencia o ausencia de rimiducid. Se evaluó la proliferación mediante citometría de flujo para los subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. La Figura 20A muestra el subconjunto de linfocitos CD4⁺ cultivados en células K19 o K562. La Figura 20B muestra el subconjunto de linfocitos CD4⁺ cultivados en células K19 en presencia o ausencia de rimiducid. La Figura 20C muestra el subconjunto de linfocitos CD8⁺ cultivados en células K19 o K562. La Figura 20D muestra el subconjunto de linfocitos CD8⁺ cultivados en células K19 en presencia o ausencia de rimiducid.

Breve descripción de las secuencias

- La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador Novel1.
 La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador Novel3.
 La SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador Novel5.
 La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador Novel6.
 5 La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio coestimulador Novel1.
 La SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio coestimulador Novel3.
 La SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio coestimulador Novel5.
 La SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio coestimulador Novel6.
 La SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de un motivo de unión a TRAF que se encuentra en un
 10 novedoso dominio coestimulador.
 La SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de un motivo de unión a TRAF que se encuentra en un
 novedoso dominio coestimulador.
 La SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de aminoácidos de un motivo de unión a TRAF que se encuentra en un
 novedoso dominio coestimulador.
 15 La SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia espaciadora que se encuentra en un
 novedoso dominio coestimulador.
 La SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia espaciadora que se encuentra en un
 novedoso dominio coestimulador.
 La SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia espaciadora que se encuentra en un
 20 novedoso dominio coestimulador.
 La SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de aminoácidos de una secuencia espaciadora que se encuentra en un
 novedoso dominio coestimulador.
 La SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos de un péptido de señalización del receptor de antígeno
 quimérico.
 25 La SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de aminoácidos de un de scFv receptor de antígeno quimérico contra CD
 19.
 La SEQ ID NO: 18 muestra la secuencia de aminoácidos de una bisagra CD8 del receptor de antígeno quimérico
 y la región transmembrana.
 La SEQ ID NO: 19 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio de señalización intracelular CD3-ζ.
 30 La SEQ ID NO: 20 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio coestimulador CD28.
 La SEQ ID NO: 21 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio coestimulador 4-1BB.
 La SEQ ID NO: 22 muestra la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 que
 carece de un dominio coestimulador.
 La SEQ ID NO: 23 muestra la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 que
 35 comprende un dominio coestimulador CD28.
 La SEQ ID NO: 24 muestra la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 que
 comprende un dominio coestimulador 4-1BB.
 La SEQ ID NO: 25 muestra la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 que
 comprende un dominio coestimulador Novel1.
 40 La SEQ ID NO: 26 muestra la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD 19 que
 comprende un dominio coestimulador Novel3.
 La SEQ ID NO: 27 muestra la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 que
 comprende un dominio coestimulador Novel5.
 La SEQ ID NO: 28 muestra la secuencia de aminoácidos de un receptor de antígeno quimérico anti-CD19 que
 45 comprende un dominio coestimulador Novel6.
 La SEQ ID NO: 29 muestra la secuencia de ácido nucleico de un vector que codifica un CAR anti-CD 19 que
 comprende un dominio coestimulador 4-1BB.
 La SEQ ID NO: 30 muestra la secuencia del ácido nucleico de un vector que codifica un CAR anti-CD 19 que
 comprende un dominio coestimulador Novel1.
 50 La SEQ ID NO: 31 muestra la secuencia de ácido nucleico de un vector que codifica un CAR anti-CD19 que
 comprende un dominio coestimulador Novel6.
 La SEQ ID NO: 32 muestra la secuencia de ácido nucleico del promotor JeT.
 La SEQ ID NO: 33 muestra la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de señalización poliA de SV40.
 La SEQ ID NO: 34 muestra la secuencia de nucleico de una primera secuencia de señalización bi-poliA de SV40.
 55 La SEQ ID NO: 35 muestra la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de señalización bi- poliA de SV40.
 La SEQ ID NO: 36 muestra la secuencia de ácido nucleico de un a vector que codifica la construcción CAR 7241
 anti CD 19 que comprende un dominio coestimulador 4-1BB. y una señal poliA de SV40.
 La SEQ ID NO: 37 muestra la secuencia de ácido nucleico de un a vector que codifica la construcción CAR 7205
 anti CD 19 que comprende un dominio coestimulador Novel6. y una señal poliA de SV40.
 60 La SEQ ID NO: 38 muestra la secuencia de ácido nucleico de un a vector que codifica la construcción CAR 7206
 anti CD 19 que comprende un dominio coestimulador Novel6 y una señal bi poliA de SV40.
 La SEQ ID NO: 39 muestra la secuencia de aminoácidos de un dominio coestimulador MyD88.
 La SEQ ID NO: 40 muestra la secuencia de ácido nucleico de un a vector que codifica la construcción CAR 7240
 anti CD 19 que comprende MyD88 y dominios coestimuladores Novel6.
 65 La SEQ ID NO: 41 muestra la secuencia de aminoácidos de los dominios FKBP12v36 de unión a ligando en
 tandem.

Las SEQ ID NO: 42 muestra la secuencia de ácido nucleico de un vector que codifica la construcción CAR 7235 dirigida contra CD19 CAR que codifica una primera generación de CAR y una construcción reguladora inducible que comprende los dominios coestimuladores MyD88 y Novel6 y los dominios FKBP12v36 de unión a ligando en tándem.

5 **Descripción detallada de la invención**

1.1 Referencias y definiciones

La patente y las referencias científicas referidas en el presente documento establecen el conocimiento que está disponible para los expertos en la materia.

10 La presente divulgación puede realizarse de diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones que se muestran en el presente documento. En su lugar, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación será minuciosa y completa, y transmitirá completamente el ámbito de la presente divulgación a los expertos en la materia. 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. Además, numerosas variaciones y adiciones de las realizaciones sugeridas en el presente documento
15 serán evidentes para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, que no se separan de la presente divulgación.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente divulgación. La terminología usada en la descripción de la divulgación del presente documento
20 tiene el fin de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitativa de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, "un", "uno", "una", o "el", "la" pueden significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una" célula puede significar una única célula o una multiplicidad de células.

Como se usa en el presente documento, salvo 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".

25 Como se usa en el presente documento, un "dominio coestimulador" se refiere a un dominio polipeptídico que transmite una señal proliferativa intracelular y/o de supervivencia celular tras la activación. Se puede producir la activación de un dominio coestimulador tras la homodimerización de dos polipéptidos de dominios coestimuladores. La activación también se puede producir, por ejemplo, tras la activación de una construcción que comprende el dominio coestimulador (por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico o una construcción reguladora inducible). En general,
30 un dominio coestimulador se puede derivar de un receptor transmembrana coestimulador, particularmente de una porción intracelular de un receptor coestimulador. Los ejemplos no limitantes de polipéptidos coestimuladores incluyen, aunque no de forma limitativa, los dominios coestimuladores descritos en el presente documento, 4-1BB, CD28, ICOS, OX-40 y CD27.

35 Como se usa en el presente documento, un "receptor de antígeno quimérico" o "CAR" se refiere a un receptor diseñado mediante ingeniería genética que injerta especificidad para un antígeno u otro ligando o molécula en una célula inmunitaria efectora (por ejemplo, un linfocito T o linfocito NK). Un receptor de antígeno quimérico típicamente comprende al menos un dominio o resto de unión a ligando extracelular y un dominio intracelular que comprende uno o más dominios de señalización y/o dominios coestimuladores.

40 En algunas realizaciones, el dominio o resto de unión a ligando extracelular puede estar en forma de un fragmento variable monocatenario (scFv) que deriva de un anticuerpo monoclonal, que proporciona especificidad para un epítipo o antígeno concreto (por ejemplo, un epítipo o antígeno preferentemente presente sobre la superficie de una célula, tal como una célula cancerosa u otra célula o partícula que causa enfermedades). En algunas realizaciones, el scFv se une a través de una secuencia enlazadora. En algunas realizaciones, el dominio de unión a ligando extracelular es específico para cualquier antígeno o epítipo de interés. En algunas realizaciones, el scFv está humanizado. En
45 algunas realizaciones, el dominio extracelular de un receptor de antígeno quimérico comprende un autoantígeno (véase, Payne y col. (2016) Science, Vol. 353 (6295): 179-184), que es reconocido por los receptores de linfocitos B específicos del autoantígeno en los linfocitos B, ordenando así a los linfocitos T a dirigirse y destruir de forma específica los linfocitos B autorreactivos en enfermedades autoinmunitarias mediadas por anticuerpos. Dichos CAR se pueden denominar receptores de autoanticuerpos quiméricos (CAAR), y la incorporación de uno o más dominios
50 coestimuladores descritos en el presente documento a dichos CAAR está abarcada por la presente divulgación.

Los dominios de señalización intracelular son dominios citoplásmicos que transmiten una señal de activación a la célula tras la unión del dominio extracelular. Un dominio de señalización intracelular puede ser cualquier dominio de señalización intracelular de interés que sea conocido en la técnica. Dichos dominios de señalización citoplásmica pueden incluir, sin limitación, ζ de CD3.

55 En algunas realizaciones, el dominio intracelular incluye también uno o más dominios coestimuladores intracelulares, tales como los descritos en el presente documento, que transmiten una señal coestimuladora que fomenta la

proliferación celular, la supervivencia celular y/o la secreción de citoquinas tras la unión al dominio extracelular. Dichos dominios coestimuladores intracelulares pueden incluir, sin limitación, cualquier dominio coestimulador desvelado en el presente documento o aquellos dominios conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, un dominio CD28, un dominio 4-1BB, un dominio OX-40, un dominio ICOS, o un dominio CD27. En algunas realizaciones, un receptor de antígeno quimérico incluye además elementos estructurales adicionales, incluyendo un dominio transmembrana que está unido al dominio de unión a ligando extracelular a través de una secuencia bisagra o de articulación.

Como se usa en el presente documento, una "construcción reguladora inducible" se refiere a una construcción transmembrana o intracelular expresada en una célula que proporciona una señal coestimuladora inducible para fomentar la proliferación celular, la supervivencia celular y/o la secreción de citoquinas. Dichas construcciones comprenden uno o más dominios coestimuladores, tales como los descritos en el presente documento y/u otros conocidos en la técnica, que proporcionan una señal coestimuladora tras la activación. En algunas realizaciones, se induce una señal coestimuladora, por ejemplo, mediante homodimerización de dos polipéptidos de construcciones reguladoras inducibles. Una construcción reguladora inducible comprende generalmente un dominio de unión que permite la homodimerización tras la unión de una molécula pequeña, un anticuerpo u otra molécula que permita la homodimerización de dos polipéptidos de la construcción.

Como se usa en el presente documento, un "dominio coestimulador" se refiere a una señal intracelular inducida por un dominio coestimulador que fomenta la proliferación celular, la expansión de una población celular *in vitro* y/o *in vivo*, fomenta la supervivencia celular, modula (por ejemplo, regula por exceso o por defecto) la secreción de citoquinas, y/o modula la producción y/o la secreción de otras moléculas inmunomoduladoras. En algunas realizaciones, se induce una señal coestimuladora tras la homodimerización de dos polipéptidos de dominios coestimuladores. En algunas realizaciones, se induce una señal coestimuladora tras la activación de una construcción que comprende el dominio coestimulador (por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico o una construcción reguladora inducible).

Como se usa en el presente documento, el término "activación" se refiere al estado de una célula (por ejemplo, un linfocito T) que se ha estimulado suficientemente para inducir una función efectora detectable. En algunas realizaciones, la activación se asocia con la producción de citoquinas inducidas y/o la proliferación y expansión celular inducida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad antitumoral" o "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que se puede manifestar mediante una disminución en el volumen tumoral, una disminución en el número de células tumorales, una disminución en el número de metástasis, un aumento de la esperanza de vida, o una mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados con la dolencia cancerosa. Se puede manifestar también un "efecto antitumoral" por la capacidad de las células genéticamente modificadas de la presente divulgación en la prevención de la aparición de un tumor en el primer lugar.

Como se usa en el presente documento, con respecto a una proteína, la expresión "diseñado mediante ingeniería genética" o "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, la expresión "diseñado mediante ingeniería genética" o "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, aunque no de forma limitativa, PCR y tecnologías de clonación de ADN; transfección, transformación y otras tecnologías de transferencia de genes; recombinación homóloga; mutagénesis dirigida a sitio; y fusión génica. De acuerdo con esta definición, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a una proteína de origen natural, pero producida por clonación y expresión en un hospedador heterólogo, no se considera recombinante.

Como se usa en el presente documento, el término "natural" se refiere a la secuencia de polinucleótido o polipéptido de origen natural más común responsable de un fenotipo dado. Mientras que un alelo o polipéptido de natural puede conferir un fenotipo normal en un organismo, un alelo o polipéptido mutante o variante puede, en algunos casos, conferir un fenotipo alterado.

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 natural o nativa).

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "unión final no homóloga" o "NHEJ" se refiere al procedimiento celular natural en el que se repara una rotura de ADN bicatenario mediante la unión directa de dos segmentos de ADN no homólogos (véase, por ejemplo, Cahill y col. (2006), *Front. Biosci.* 11:1958-1976).

Como se usa en el presente documento, el término "reducido" se refiere a cualquier reducción en los síntomas o la

gravedad de una enfermedad o cualquier reducción en la proliferación o el número de células cancerosas. En cualquier caso, dicha 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 una reducción parcial y una reducción completa de una patología.

5 Como se usa en el presente documento, el término "aumentado" se refiere a cualquier aumento en la activación, proliferación, o señalización de las citoquinas de una célula modificada genéticamente para comprender un dominio coestimulador desvelado en el presente documento, o un fragmento activo o una variante del mismo. Dicho aumento 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%, o más. Se puede usar cualquier procedimiento para medir un aumento en la activación, proliferación, o señalización de citoquinas de una célula. Por ejemplo, el aumento en la activación y/o expresión de las citoquinas puede abarcar un aumento de la expresión de uno cualquiera de IFN- γ , IL-2, TNF- α , o cualquier otra citoquina que pueda usarse para determinar un cambio en la activación y/o la proliferación celular. En algunas realizaciones, un aumento en la proliferación abarca un aumento en el número de células o en la división celular, e incluye la expansión de una población celular.

15 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 la 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 o nucleótidos alineados, y que es 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. 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 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. 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. 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.

35 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" en el aminoácido "A" en la primera proteína se corresponderá con la modificación del resto "Y" en 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.

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 moléculas de ácidos nucleicos lineales o circulares. Una construcción recombinante comprende una combinación artificial o no natural de moléculas de ácidos nucleicos, incluyendo, sin limitación, secuencias reguladoras y de codificación. Aunque la construcción recombinante como un completo no se produce en la naturaleza, porciones de la construcción se pueden encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una construcción de ADN recombinante puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que provienen de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias de codificación que provienen de la misma fuente y se disponen de manera diferente a la encontrada en la naturaleza. Dicha construcción se puede usar por sí misma o se puede usar junto con un vector.

55 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 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 plásmidos y vectores de VAA recombinantes, o cualquier otro vector conocido en esa técnica adecuado para administrar un gen que codifica un dominio coestimulador de la presente divulgación en una célula diana. El experto en la técnica es muy consciente de los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector para poder transformar, seleccionar y propagar con éxito las células hospedadoras que comprenden cualquiera de las secuencias de nucleótidos o ácidos nucleicos aislados de la presente divulgación.

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 (VAA).

5 Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "unido operativamente" signifique un enlace funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, un enlace operativo entre una secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa como se desvela en el presente documento y una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor) es un enlace funcional que permite la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa. Los elementos unidos operativamente pueden ser contiguos o no contiguos. Cuando se usa para referirse a la unión de dos regiones de codificación de proteínas, por unido operativamente se pretende que las regiones de codificación
10 estén en el mismo marco de lectura.

Como se usa en el presente documento, "transfectado" o "transformado" o "transducido" o "nucleofectado" se refiere a un procedimiento por el cual el ácido nucleico exógeno se transfiere o introduce en la célula hospedadora. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es una que se ha transfectado, transformado o transducido con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula sujeto primaria y su descendencia.

15 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.

20 Como se usa en el presente documento, una "linfocito citolítico natural humano" o "linfocito NK humano" o "linfocito citolítico natural" o "linfocito NK" se refiere a un tipo de linfocito citotóxico crítico para el sistema inmunitario innato. El papel que los linfocitos NK juegan es análogo al de linfocitos T citotóxicos en la respuesta inmunoadaptativa de los vertebrados. los linfocitos NK proporcionan respuestas rápidas a las células infectadas víricamente y responden a la formación del tumor, actuando en alrededor de 3 días después de la infección. Los linfocitos NK humanos, y las células
25 que provienen de los mismos, incluyen linfocitos NK aislados que no se han pasado en cultivo, los linfocitos NK que han sido pasados y mantenidos en condiciones de cultivo celular sin inmortalización, y los linfocitos NK que han sido inmortalizados y se pueden mantener en condiciones de cultivo celular indefinidamente.

Como se usa en el presente documento, un "control" o "célula del control" se refiere a una célula que proporciona un punto de referencia para medir cambios en el genotipo o fenotipo de una célula modificada genéticamente. Una célula del control puede comprender, por ejemplo: (a) una célula natural, es decir, del mismo genotipo que el material de partida para la alteración genética que dio como resultado la célula modificada genéticamente; (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 se expresan condiciones, estímulos, o modificaciones genéticas adicionales que inducirían la expresión del genotipo o fenotipo alterado.
30
35

La expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para efectuar resultados biológicos y/o clínicos beneficiosos o deseables. La cantidad variará terapéuticamente dependiendo de la (por ejemplo, célula modificada genéticamente, el linfocito T-CAR, el linfocito NK-CAR) formulación o composición, la enfermedad y su gravedad, y la edad, el peso, la dolencia física y la sensibilidad del sujeto que se va a tratar. En realizaciones específicas, una cantidad eficaz de una célula que comprende un dominio coestimulador desvelado en el presente documento o de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento reduce al menos un síntoma o la progresión de una enfermedad.
40

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" significa reducir la frecuencia o la gravedad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto.

45 Como se usa en el presente documento, debe entenderse que el término "cáncer" abarca cualquier enfermedad neoplásica (ya sea o no invasiva o metastásica) que se caracteriza por un crecimiento celular anómalo. El cáncer invasivo o metastásico tiene el potencial de diseminarse a otras partes del cuerpo. Los cánceres con división celular descontrolada pueden producir crecimientos o tumores malignos mientras que los cánceres con células que se dividen lentamente pueden producir crecimientos o tumores benignos.

50 Como se usa en el presente documento, el término "carcinoma" se refiere a un crecimiento maligno constituido por células epiteliales.

Como se usa en el presente documento, el término "leucemia" se refiere a neoplasias de los órganos/sistemas hematopoyéticos y está generalmente caracterizado por una proliferación y desarrollo anómalo de leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea.

55 Como se usa en el presente documento, El término "sarcoma" se refiere a un tumor que está constituido por una sustancia análoga al tejido conectivo embrionario y que generalmente está compuesto de células estrechamente empaquetadas incluidas en una sustancia fibrilar, heterogénea u homogénea.

Como se usa en el presente documento, el término "melanoma" se refiere a un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos.

Como se usa en el presente documento, el término "linfoma" se refiere a un grupo de tumores de células de la sangre que se desarrollan a partir de linfocitos.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "blastoma" se refiere a un tipo de cáncer que está producido por neoplasias en células precursoras o blastos (tejido inmaduro o embrionario).

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. En algunas realizaciones, la secuencia de reconocimiento para una meganucleasa de la presente divulgación es de 22 pares de bases. Una meganucleasa puede ser una endonucleasa que proviene de I-CreI, y puede referirse a una variante diseñada mediante ingeniería genética de I-CreI que se ha modificado en relación con la I-CreI 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. Se conocen en la técnica los procedimientos para producir dichas variantes modificadas de I-CreI (por ejemplo, el documento WO 2007/047859). Una meganucleasa como se usa en el presente documento se une a un ADN bicatenario como un heterodímero. Una meganucleasa puede ser también una "meganucleasa monocatenaria" en la que un par de dominios de unión al ADN se unen en un polipéptido único usando un enlazador peptídico. La expresión "endonucleasa de referencia" es sinónima del término "meganucleasa". Las meganucleasas de la presente divulgación 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.

Como se usa en el presente documento, la expresión "meganucleasa monocatenaria" se refiere a un polipéptido que comprende un par de subunidades de nucleasa unidas por un enlazador. Una meganucleasa monocatenaria tiene la organización: Subunidad extremo N - Enlazador - Subunidad extremo C. Las dos subunidades de meganucleasa generalmente serán 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 monocatenaria se puede denominar "heterodímero monocatenario" o "meganucleasa heterodimérica monocatenaria" aunque no es, de hecho, dimérica. En aras de la claridad, salvo que se indique lo contrario, la expresión "meganucleasa" se puede referir a una meganucleasa dimérica o monocatenaria.

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 único 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, cualquiera de los abarcados por las patentes de Estados Unidos números 8.445.251 y 9.434.931.

Como se usa en el presente documento, la expresión "nucleasa de dedo de zinc" o "ZFN" se refiere a proteínas quiméricas que comprenden un dominio de unión a ADN de dedo de zinc fusionado a un dominio de nucleasa procedente de una endonucleasa o exonucleasa, incluyendo, aunque no de forma limitativa, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de referencia, una nucleasa S1, una nucleasa de frijol mungo, una ADNasa I pancreática, una nucleasa micrococcica, y una endonucleasa HO de levadura. Los dominios de la nucleasa útiles para el diseño de la nucleasa dedo de zinc incluyen los de la endonucleasa de restricción de Tipo IIs, incluyendo, aunque no de forma limitativa FokI, FoM, la enzima de restricción StsI. las endonucleasas de restricción de Tipo IIs adicionales se describen en la Publicación n.º WO 2007/014275. La estructura de un dominio de dedo de zinc se estabiliza a través de la coordinación de un ion zinc. Las proteínas de unión a ADN que comprenden uno o más dominios de dedo y zinc se unen al ADN en una manera específica de secuencia. El dominio de dedo de zinc puede ser una secuencia nativa o 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. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.789.538, 5.925.523, 6.007.988, 6.013.453, 6.200.759, y las publicaciones internacionales números. WO 95/19431, WO 96/06166, WO 98/53057, WO 98/54311, WO 00/27878, WO 01/60970, WO 01/88197 y WO 02/099084. Al fusionar este dominio de proteína diseñada mediante ingeniería genética con un dominio de nucleasa, tal como la nucleasa FokI, es posible dirigir las roturas de ADN con especificidad en el genoma. La selección de los sitios diana, las proteínas dedo de zinc y los procedimientos para el diseño y la construcción de nucleasas dedo de zinc son conocidas por los expertos en la materia y se describen en detalle en las publicaciones de Estados Unidos números 20030232410, 20050208489, 2005064474, 20050026157, 20060188987 y la publicación internacional n.º WO 07/014275.

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 una pluralidad de repeticiones del dominio TAL fusionadas a un dominio de nucleasa o a una porción activa del mismo procedente de una endonucleasa o exonucleasa, incluyendo, aunque no de forma limitativa, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de referencia, una nucleasa S1, una nucleasa de frijol mungo, una ADNasa I pancreática, una nucleasa micrococcica, y una endonucleasa HO de levadura. Véase, por

ejemplo, Christian y col. (2010) *Genetics* 186:757-761. Los dominios de nucleasa útiles para el diseño de las TALEN incluyen los de la endonucleasa de restricción de Tipo IIs, incluyendo, aunque no de forma limitativa FokI, FoM, StsI, HhaI, HindIII, Nod, BbvCI, EcoRI, BglI, y AlwI. las endonucleasas de restricción de Tipo IIs adicionales se describen en la Publicación n.º WO 2007/014275. En algunas realizaciones, el dominio de la nucleasa de TALEN es un dominio de nucleasa FokI o una porción activa del mismo. Se pueden obtener repeticiones del dominio TAL a partir de la familia de proteínas TALE (efector de tipo activador de la transcripción) usada en el procedimiento de infección por patógenos vegetales del género *Xanthomonas*. Las repeticiones del dominio TAL son secuencias de 33-34 aminoácidos con los aminoácidos 12º y 13º divergentes. Estas dos posiciones, denominadas dipéptidos variables de repetición (RVD), son muy variables y muestran una fuerte correlación con el reconocimiento específico de nucleótidos. Cada par de bases en la secuencia del ADN diana se pone en contacto con una única repetición TAL, donde la especificidad es resultante del RVD. En algunas realizaciones, la TALEN comprende 16-22 repeticiones del dominio TAL. La escisión del ADN con una TALEN requiere dos regiones de reconocimiento del ADN que flanquean una región central no específica (es decir, el "espaciador"). El término "espaciador", en referencia a una TALEN, se refiere a la secuencia de ácido nucleico que separa las dos secuencias de ácidos nucleicos reconocidas y unidas a cada monómero que constituye una TALEN. Las repeticiones del dominio TAL pueden ser secuencias nativas procedentes de una proteína TALE de origen natural o se pueden diseñar mediante medios lógicos o experimentales para producir una proteína que se una a una secuencia de ADN predeterminada (véase, por ejemplo, Boch y col. (2009) *Science* 326(5959):1509-1512 y Moscou y Bogdanove (2009) *Science* 326(5959):1501). Véanse también, publicación de Estados Unidos n.º 20110145940 y publicación internacional n.º WO 2010/079430 para los procedimientos para diseñar mediante ingeniería genética una TALEN que reconoce una secuencia específica y los ejemplos de los RVD y sus nucleótidos diana correspondientes. En algunas realizaciones, cada monómero de nucleasa (por ejemplo, FokI) se puede fusionar con una secuencia efectora de TAL que reconoce una secuencia de ADN diferente, y solo cuando los dos sitios de reconocimiento están en estrecha proximidad se juntan los monómeros inactivos para crear una enzima funcional.

Como se usa en el presente documento, la expresión "TALEN compacta" se refiere a una endonucleasa que comprende un dominio de unión a ADN con una o más repeticiones del dominio TAL fusionadas en cualquier orientación con cualquier porción de la endonucleasa dirigida I-TevI o cualquiera de las endonucleasas relacionadas en la Tabla 2 de la solicitud de Estados Unidos n.º 20130117869, incluyendo, aunque no de forma limitativa Mmel, EndA, End1, I-BasI, I-TevII, I-TevIII, I-TwoI, Mspl, Mval, NucA, y NucM. Las TALEN compactas no requieren dimerización para la actividad de procesamiento del ADN, aliviando la necesidad de sitios diana dobles con espaciadores de ADN intervinientes. En algunas realizaciones, la TALEN compacta comprende 16-22 repeticiones del dominio TAL.

Como se usa en el presente documento, el término "CRISPR" se refiere a una endonucleasa basada en caspasa que comprende una caspasa, tal 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. El componente de caspasa de un CRISPR es una endonucleasa de ADN guiada por ARN. En determinadas realizaciones, la caspasa es una enzima Cas de clase II. En algunas de estas realizaciones, la caspasa es una enzima de tipo II de clase II, tal como Cas9. En otras realizaciones, la caspasa es una enzima de tipo V de clase II, tal como Cpf1. El ARN guía comprende una repetición directa y una secuencia guía (denominada a menudo como un espaciador en el contexto de un sistema CRISPR endógeno), que es complementario del sitio de reconocimiento de la diana. En determinadas realizaciones, el CRISPR comprende además un tracrRNA (un ARN de CRISPR transactivante) que es complementario (total o parcialmente) de una secuencia de repetición directa (denominada algunas veces secuencia tracrmat) presente en el ARN guía. En realizaciones particulares, la caspasa puede estar mutada con respecto a la correspondiente enzima natural de manera que la enzima carece de la capacidad de escindir una hebra de un polinucleótido diana, funcionando como una nickasa, escindiendo solo una hebra individual del ADN diana. Los ejemplos no limitantes de enzimas caspasa que funcionan como una nickasa incluyen enzimas Cas9 con una mutación D10A en el dominio catalítico RuvC I, o con una mutación H840A, N854A, o N863A.

Como se usa en el presente documento, el término "megaTAL" se refiere a una nucleasa monocatenaria que comprende un dominio de unión a ADN efector de tipo activador de la transcripción (TALE) con una endonucleasa de referencia específica de secuencia diseñada mediante ingeniería genética.

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 una pareja de "semisitios" de 9 pares de bases invertidas que están separados por cuatro pares de bases. En el caso de una meganucleasa monocatenaria, el dominio del extremo N de la proteína entra en contacto con un primer semisitio y el dominio del extremo C de la proteína entra en contacto con un segundo semisitio. La escisión con una meganucleasa produce cuatro "salientes" de pares de bases en 3'. Los "salientes" o "extremos pegajosos" son segmentos cortos de ADN monocatenario que se pueden producir mediante la escisión de la endonucleasa de una secuencia de ADN bicatenario. En el caso de meganucleasas y meganucleasas monocatenarias derivadas de I-CreI, el saliente comprende 10-13 bases de la secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases. En el caso de una TALEN compacta, la secuencia de reconocimiento puede comprender una primera secuencia CNNNGN que es reconocida por el dominio I-TevI, seguida de un espaciador no específico de 4-16 pares de bases de longitud, seguida de una segunda secuencia de 16-22 pb de longitud que es reconocida por el dominio efector TAL (esta secuencia típicamente tiene una base T en 5'). La escisión con una TALEN compacta 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 se une el ARN guía para dirigir la escisión de Cas9. No se requiere necesariamente la complementariedad total entre la secuencia guía y la secuencia de reconocimiento para efectuar la escisión. La escisión mediante una CRISPR puede producir extremos enromados (tal como mediante una caspasa de tipo II de clase II) o extremos en forma de salientes (tal como mediante una caspasa de tipo V de clase II), dependiendo de la caspasa. En aquellas realizaciones en las que se utiliza una caspasa CpfI, la escisión mediante el complejo CRISPR que comprende la misma dará como resultado salientes en 5' y, en determinadas realizaciones, salientes de 5 nucleótidos en 5'. Cada enzima caspasa requiere también el reconocimiento de una secuencia PAM (motivo adyacente al protoespaciador) que está próxima a la secuencia de reconocimiento complementaria del ARN guía. La secuencia precisa, los requisitos de longitud de la PAM y la distancia de la secuencia diana difieren dependiendo de la enzima caspasa, pero las PAM son normalmente secuencias de 2-5 pares de bases adyacentes a la secuencia de reconocimiento diana. Se conocen en la técnica secuencias PAM de enzimas caspasa concretas (véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 8.697.359 y la publicación de Estados Unidos n.º. 20160208243) y las secuencias PAM de enzimas caspasa novedosas o diseñadas mediante ingeniería genética se pueden identificar usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como el ensayo de agotamiento de PAM (véase, por ejemplo, Karvelis y col. (2017) Methods 121-122:3-8, que se incorpora en el presente documento en su totalidad).

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.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "gen alfa del receptor de linfocitos T" o "gen alfa TCR" se usan de manera indistinta y se refieren al locus de un linfocito T que codifica una subunidad alfa del receptor de linfocitos T. El receptor alfa de linfocitos T puede referirse al gen NCBI con el número ID 6955, antes o después de la redistribución. Tras la redistribución, el gen alfa del receptor de linfocitos T comprende un promotor endógeno, segmentos V y J redistribuidos, un sitio donante endógeno de corte y empalme, un intrón, un sitio aceptor endógeno de corte y empalme, y el locus de la región constante alfa del receptor de linfocitos T, que comprenden los exones que codifican la subunidad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen de la región constante alfa del receptor de linfocitos T" se refiere a la secuencia de codificación del gen alfa del receptor de linfocitos T. el gen de la región constante alfa del receptor de linfocitos T incluye la secuencia natural, y las variantes funcionales de la misma, identificadas mediante el NCBI Gen ID NO. 28755.

Como se usa en el presente documento, la enumeración de un intervalo numérico para una variable pretende transmitir que la presente divulgación se puede llevar a la 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 forma 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 con 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.

2.1 Principio de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación está basada, en parte, en el descubrimiento de que los dominios coestimuladores diseñados mediante ingeniería genética pueden demostrar actividad equivalente o superior en comparación con dominios coestimuladores convencionales. En ejemplos específicos, los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento tienen actividad coestimuladora equivalente o superior en términos de proliferación celular tras la activación inducida por antígenos y/o la secreción de citoquinas. En algunas realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica uno de los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, el dominio coestimulador se expresa en una célula modificada genéticamente como parte de una construcción tal como, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico o una construcción reguladora inducible. En consecuencia, se proporcionan células que comprenden los novedosos dominios coestimuladores desvelados en el presente documento, así como procedimientos para preparar células que comprenden los novedosos dominios coestimuladores. Se desvelan además en el presente documento células genéticamente modificadas que comprenden un dominio coestimulador desvelado en el presente documento para su uso en reducir los síntomas o la gravedad de una enfermedad. En algunas realizaciones, la administración de células genéticamente modificadas que comprenden los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento reduce los síntomas o la gravedad de las enfermedades, tales como cánceres, trastornos autoinmunitarios y otras dolencias que se pueden dirigir mediante células genéticamente modificadas de la presente divulgación. Se desvelan también en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden una célula modificada genéticamente desvelada en el presente documento y un transportador farmacéuticamente aceptable para su uso en los procedimientos de inmunoterapia para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita.

2.2 Moléculas de ácidos nucleicos que codifican dominios coestimuladores

Se proporcionan en el presente documento moléculas de ácidos nucleicos que codifican novedosos dominios coestimuladores y variantes de los mismos que tienen actividad coestimuladora (es decir, variantes activas). Se puede determinar la actividad coestimuladora de un dominio individual usando cualquier procedimiento conocido en la técnica que mida la activación, proliferación y secreción de citoquinas de células, tales como células inmunitarias. Un ejemplo de dicho procedimiento es el desvelado en Linsley y col., *Journal of Experimental Medicine* 176 (1992), 1595-604. Los ejemplos incluyen además aquellos procedimientos descritos en el presente documento para medir la proliferación celular y la secreción de citoquinas.

En consecuencia, se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican los dominios coestimuladores que se definen en las SEQ ID NOS: 5-8 y las variantes activas de las mismas. Específicamente, la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 1 codifica el dominio coestimulador de SEQ ID NO: 5, denominado en el presente documento dominio Novel1. la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 2 codifica el dominio coestimulador de SEQ ID NO: 6, denominado en el presente documento dominio Novel3. la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 3 codifica el dominio coestimulador de SEQ ID NO: 7, denominado en el presente documento dominio Novel5. la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 4 codifica el dominio coestimulador de SEQ ID NO: 8, denominado en el presente documento dominio Novel6.

Se proporcionan también en el presente documento variantes activas de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento, en el que las secuencias variantes de ácidos nucleicos codifican un dominio que tiene actividad coestimuladora. Se proporcionan además variantes de los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento que retienen la actividad coestimuladora. 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 y/o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos de la proteína natural y/o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios del polipéptido natural. De manera análoga, un polinucleótido "variante" es un polinucleótido que proviene del polinucleótido "natural" mediante delección y/o adición de uno o más ácidos nucleicos en uno o más sitios de la secuencia del nucleótido natural. 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 secuencias de ácidos nucleicos precursoras de los polinucleótidos variantes que codifican dominios coestimuladores pueden incluir las SEQ ID NOS: 1-4. De manera análoga, las secuencias de polipéptidos precursoras de los polipéptidos variantes que codifican los novedosos dominios coestimuladores pueden incluir las SEQ ID NOS: 5-8.

Las variantes de los polipéptidos abarcadas por la divulgación son biológicamente activas. Es decir, continúan poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína natural; es decir, la actividad coestimuladora. Dichas variantes pueden ser el resultado, por ejemplo, de la manipulación humana. Las variantes biológicamente activas de un dominio coestimulador natural de la divulgación (por ejemplo, las SEQ ID NOS: 5-8), o las variantes de las secuencias de ácidos nucleicos naturales (por ejemplo, las SEQ ID NOS: 1-4) que codifican los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento, tendrán al menos aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 55 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 65 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 91 %, aproximadamente un 92 %, aproximadamente un 93 %, aproximadamente un 94 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 99 %, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del polipéptido natural o la secuencia del ácido nucleico del polinucleótido 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 dominio coestimulador de la divulgación puede diferir de dicho dominio coestimulador en tan solo aproximadamente 1-20 restos de aminoácidos, tan solo como aproximadamente 1-10, tan solo como aproximadamente 1-5, tan solo como aproximadamente 4, tan solo como 3, 2 o incluso 1 resto de aminoácido.

Los polipéptidos de la divulgación pueden alterarse de diversas maneras incluyendo sustituciones, delecciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los procedimientos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos por mutaciones en el ADN. Los procedimientos para la mutagénesis y alteraciones de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véanse, 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 citadas en el mismo. Se pueden encontrar directrices sobre las sustituciones 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.

Dependiendo del contexto, "fragmento" se refiere a una porción de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o proteína, o un polipéptido que codifica una porción de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o proteína. Los fragmentos pueden retener la actividad de la proteína original y, por tanto, dichos fragmentos "activos" incluyen, por ejemplo, los fragmentos de un dominio coestimulador, tales como un fragmento de una cualquiera de la SEQ ID NO: 5-8 que retiene la actividad coestimuladora. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio

coestimulador, tal como un fragmento de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-4 puede codificar un fragmento de proteína que es biológicamente activo. Se puede preparar un fragmento de nucleótido biológicamente activo aislando una porción de la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador, expresando la porción codificada del dominio coestimulador, y evaluando la actividad de la porción codificada del dominio coestimulador. Los fragmentos de dominios coestimuladores incluyen fragmentos de las SEQ ID NOS: 5-8. Los fragmentos de los dominios coestimuladores comprenden al menos aproximadamente 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 o 42 aminoácidos.

Las variantes o fragmentos de los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento pueden comprender al menos un motivo de unión al Factor asociado a TNFR (TRAF), citados en el presente documento como motivos TRAF. Los ejemplos de motivos TRAF proporcionados en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, QMED (SEQ ID NO:9), QEED (SEQ ID NO:10), y EEEG (SEQ ID NO:11). Por ejemplo, las variantes o fragmentos activos de los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento pueden comprender la SEQ ID NO: 9 y 11 o la SEQ ID NO: 10 y 11.

Los dominios coestimuladores o las variantes o fragmentos de los mismos pueden comprender dos motivos TRAF separados por una región espaciadora. Como se usa en el presente documento, la expresión "región espaciadora" se refiere a la región entre dos motivos TRAF previstos de un dominio coestimulador. La región espaciadora puede comprender una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ASSCRCPQ (SEQ ID NO: 12), ASSCRFPE (SEQ ID NO: 13), ASSCRFPQ (SEQ ID NO: 14), y ASSCRAPS (SEQ ID NO: 15). En dominios coestimuladores de variante activa específica, la región espaciadora de la SEQ ID NO: 12 está localizada entre los motivos de unión TRAF de la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 11. En otros dominios coestimuladores de variante activa, la región espaciadora de la SEQ ID NO: 13 está localizada entre los motivos de unión TRAF de la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11. En algunos dominios coestimuladores de variante activa, la región espaciadora de la SEQ ID NO: 14 está localizada entre los motivos de unión TRAF de la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11. En otros dominios coestimuladores de variante activa, la región espaciadora de la SEQ ID NO: 15 está localizada entre los motivos de unión TRAF de la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11. Como alternativa, la región espaciadora podría ser cualquier secuencia que mantenga la actividad coestimuladora del dominio variante.

En determinadas realizaciones, se proporcionan casetes de expresión o construcciones de expresión para la expresión de al menos un dominio coestimulador desvelado en el presente documento, o una variante activa del mismo, en una célula. En algunas realizaciones, el casete incluye secuencias reguladoras en 5' y 3' unidas operativamente a una molécula de ácido nucleico proporcionada en el presente documento que codifica un novedoso dominio coestimulador, o una variante activa del mismo. Se pretende que "unido operativamente" signifique un enlace funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, un enlace operativo entre una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador como se desvela en el presente documento y una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor) es un enlace funcional que permite la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador. Los elementos unidos operativamente pueden ser contiguos o no contiguos. Cuando se usa para referirse a la unión de dos regiones de codificación de proteínas, por unido operativamente se pretende que las regiones de codificación estén en el mismo marco de lectura.

En algunas realizaciones, el casete comprende además al menos un gen adicional que se va a cotransformar en una célula. En realizaciones adicionales, el gen o los genes adicionales se proporcionan en múltiples casetes de expresión. En algunas realizaciones, dicho casete de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción y/o sitios de recombinación para la inserción de un polinucleótido recombinante que esté bajo el control de la transcripción de las regiones reguladoras. En algunas realizaciones, el casete de expresión contiene adicionalmente genes marcadores seleccionables.

En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye, en la dirección 5'-3' de la transcripción, una región de inicio de la transcripción y la traducción (es decir, un promotor), una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador, o una variante activa de la misma, como se desvela en el presente documento, y una región de terminación de la transcripción y la traducción (es decir, una región de terminación) funcional en las células genéticamente modificadas de la presente divulgación. Las regiones reguladoras (es decir, promotores, regiones reguladoras de la transcripción y regiones de terminación de la traducción) y/o una molécula de ácido nucleico proporcionada en el presente documento pueden ser naturales/análogas respecto de la célula hospedadora o entre sí. Como alternativa, las regiones reguladoras y/o una molécula de ácido nucleico proporcionada en el presente documento pueden ser heterólogas para la célula hospedadora o entre sí. Como se usa en el presente documento, "heteróloga" en referencia a una secuencia es una secuencia que se origina a partir de especies extrañas o, si se origina a partir de la misma especie, está sustancialmente modificada a partir de su forma natural en la composición y/o en el locus genómico mediante intervención humana deliberada. Por ejemplo, un promotor unido operativamente a una molécula de ácido nucleico heteróloga es de una especie diferente de la especie a partir de la cual se obtuvo la molécula de ácido nucleico o, si procede de la misma especie o de una especie análoga, una o ambas están modificadas sustancialmente a partir de su forma y/o locus genómico original, o bien el promotor no es el promotor natural de la molécula de ácido nucleico unida operativamente. Como alternativa, las regiones reguladoras y/o la molécula de ácido nucleico proporcionada en el presente documento pueden ser enteramente sintéticas.

La región de terminación puede ser natural con la región de inicio de la transcripción, puede ser natural con la molécula de ácido nucleico unida operativamente, puede ser natural con la célula hospedadora, o puede obtenerse a partir de

otra fuente (es decir, extraña o heteróloga) al promotor, la molécula de ácido nucleico, la célula hospedadora o cualquier combinación de los mismos. En la preparación del casete de expresión, se pueden manipular los diversos fragmentos de ADN, con el fin de proporcionar las secuencias de ADN en la orientación adecuada. Con este fin, se pueden emplear adápteros o enlazadores para unir los fragmentos de ADN o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, la eliminación de ADN superfluo, la eliminación de sitios de restricción, o similares. A tal fin, pueden estar implicadas la mutagénesis *in vitro*, la reparación de cebadores, la restricción, la hibridación, las resustituciones, por ejemplo, transiciones y transversiones.

En algunas realizaciones, se usan numerosos promotores en los casetes de expresión proporcionados en el presente documento. Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia promotora temprana inmediata del citomegalovirus (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora fuerte constitutiva capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia de polinucleótido unida operativamente a la anterior. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el Factor-1 α de crecimiento del alargamiento (EF-1 α). Sin embargo, se pueden usar también otras secuencias promotoras constitutivas, incluyendo, aunque no de forma limitativa el promotor temprano del virus 40 de simio (SV40), promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia humana, promotor de MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia de aves, el promotor temprano inmediato de un virus de Epstein-Barr, el promotor de un virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, aunque no de forma limitativa, el promotor de la actina, el promotor de la miosina, el promotor de la hemoglobina, y el promotor de la creatina quinasa. Además, la presente divulgación no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Se contemplan también promotores inducibles como parte de la presente divulgación. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia del polinucleótido que está unida operativamente cuando se desea dicha expresión, o desactivar la expresión cuando no se desea la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, aunque no de forma limitativa, un promotor de la metalotionina, un promotor glucocorticoide, un promotor de la progesterona, y un promotor de la tetraciclina. Se contemplan también promotores sintéticos como parte de la presente divulgación, por ejemplo, el promotor el promotor JeT (véase, el documento WO/2002/012514).

En algunas realizaciones, los promotores se seleccionan basándose en el resultado deseado. Se reconoce que se pueden potenciar las diferentes aplicaciones mediante el uso de diferentes promotores en los casetes de expresión para modular la temporización, la localización y/o el nivel de expresión de los polinucleótidos desvelados en el presente documento. Dichas construcciones de expresión pueden contener también, si se desea, una región reguladora del promotor (por ejemplo, una que confiera una expresión inducible, constitutiva, regulada ambientalmente o durante el desarrollo, o una expresión selectiva específica de célula o tejido), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión a ribosoma, una señal de procesamiento del ARN, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadenilación.

A fin de evaluar la expresión de un dominio coestimulador o polipéptido CAR que comprende un dominio coestimulador, el casete de expresión puede contener también cualquier gen marcador seleccionable o un gen indicador, o ambos, para facilitar la identificación y selección de células que expresan de entre la población de células que se desea transfectar o infectar a través de vectores víricos. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede transportarse en una pieza de ADN separada y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras adecuadas para permitir la expresión en las células hospedadoras. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos y genes marcadores fluorescentes.

Se proporcionan casetes de expresión que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican los CAR, incluyendo al menos un dominio coestimulador o una variante activa del mismo, desvelados en el presente documento. Como se usa en el presente documento, un "casete de expresión de CAR" se refiere a un casete de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR. Un casete de expresión de CAR puede codificar un CAR sin un dominio coestimulador. Un casete de expresión de CAR puede codificar también un CAR que comprende un dominio coestimulador, como se desvela en el presente documento o puede codificar un CAR que comprende un dominio coestimulador que no se desvela en el presente documento. Por ejemplo, un casete de expresión puede comprender una o más secuencias que codifican un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio estimulador intracelular que comprende un dominio coestimulador, o una variante activa del mismo, como se desvela en el presente documento. El dominio de unión a ligando extracelular puede ser específico para un antígeno de una célula cancerosa, tal como, por ejemplo, un antígeno específico de un linfoma de linfocitos B.

El casete de expresión puede codificar un CAR que comprende un scFv anti-CD 19, El dominio coestimulador Novell (SEQ ID NO: 5), o una variante activa del mismo, y un dominio de señalización CD3 ζ . El casete de expresión puede codificar un CAR que comprende un scFv anti-CD 19, el dominio coestimulador Novel3 (SEQ ID NO: 6), o una variante activa del mismo, y un dominio de señalización CD3 ζ . El casete de expresión puede codificar un CAR que comprende un scFv anti-CD 19, el dominio coestimulador Novel5 (SEQ ID NO: 7), o una variante activa del mismo, y un dominio de señalización CD3 ζ . El casete de expresión puede codificar un CAR que comprende un scFv anti-CD 19, el dominio coestimulador Novel6 (SEQ ID NO: 8), o una variante activa del mismo, y un dominio de señalización CD3 ζ . Se contempla que estos casetes de expresión puedan diseñarse mediante ingeniería genética para tener especificidad para cualquier antígeno o molécula específica de enfermedad adecuada.

Se proporcionan también casetes de expresión que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican una construcción inducible incluyendo al menos un dominio coestimulador desvelado en el presente documento, o una variante activa del mismo. Como se usa en el presente documento, un "casete de expresión reguladora" se refiere a un casete de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una construcción reguladora inducible. Un casete de expresión puede ser un casete de expresión de CAR y un casete de expresión reguladora. Un casete de expresión único puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR que no comprende un dominio coestimulador de una cualquiera de las SEQ ID NOS: 5-8, o fragmentos activos o variantes de los mismos, y una secuencia de nucleótidos que codifica una construcción reguladora inducible como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, los casetes de expresión comprenden secuencias que codifican un dominio de unión y al menos un dominio coestimulador, o una variante activa del mismo, como se desvela en el presente documento, en el que una molécula pequeña, anticuerpo, u otra molécula se une al dominio de unión para inducir la dimerización de dos construcciones reguladoras inducibles. En algunas realizaciones, dicha dimerización inicia la señal coestimuladora a la célula para fomentar la proliferación, la supervivencia y/o la secreción de citoquinas. En algunas realizaciones, en las que el dominio de unión puede unirse a una molécula pequeña, el dominio de unión comprende un análogo de FKBP12 (por ejemplo, que comprende una sustitución F36V) y la molécula pequeña es rimiducid (es decir, AP1903). Se contemplan en la presente divulgación cualesquiera dominios de unión conocidos en la técnica que sean útiles en dichas construcciones reguladoras inducibles, tales como los interruptores de seguridad de las células CART y similares.

El casete de expresión puede codificar una construcción reguladora inducible que comprende un dominio de unión y el dominio coestimulador Novell (SEQ ID NO: 5), o una variante activa del mismo. El casete de expresión puede codificar una construcción reguladora inducible que comprende un dominio de unión y el dominio coestimulador Novell3 (SEQ ID NO: 6), o una variante activa del mismo. El casete de expresión puede codificar una construcción reguladora inducible que comprende un dominio de unión y el dominio coestimulador Novel5 (SEQ ID NO: 7), o una variante activa del mismo. El casete de expresión puede codificar una construcción reguladora inducible que comprende un dominio de unión y el dominio coestimulador Novel6 (SEQ ID NO: 8), o una variante activa del mismo.

Se proporcionan también en el presente documento vectores que comprenden moléculas de ácidos nucleicos que codifican los novedosos dominios coestimuladores de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los vectores comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica los novedosos dominios coestimuladores o un casete de expresión como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento se clonan en numerosos tipos de vectores. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ácido nucleico se clona en un vector que incluye, aunque no se limita a un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

En realizaciones específicas, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican un dominio coestimulador se proporcionan en vectores víricos, tales como vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, vectores adenovíricos, y vectores de virus adenoasociados (VAA). La tecnología de vectores víricos es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en otra virología y manuales de biología molecular. Los virus, que son útiles como vectores incluyen, aunque no de forma limitativa, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del hesses, y lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de la endonucleasa de restricción convenientes, y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, documentos WO 01/96584; documentos WO 01/29058; y patente de Estados Unidos n.º 6,326,193).

2.3 Receptores de antígenos quiméricos (CAR) y construcciones reguladoras inducibles

Se proporcionan en el presente documento células genéticamente modificadas que expresan un receptor de antígeno quimérico de la superficie celular (CAR). En general, un CAR de la presente divulgación comprenderá al menos un dominio extracelular y un dominio intracelular. En algunas realizaciones, el dominio extracelular comprende un elemento de unión específica a diana denominado por otra parte como dominio o resto de unión a ligando. En algunas realizaciones, el dominio intracelular, o dominio citoplásmico, comprende al menos un dominio coestimulador, o una variante activa del mismo, como se desvela en el presente documento y uno o más dominios de señalización tales como, por ejemplo, ζ de CD3. Por ejemplo, los CAR desvelados en el presente documento pueden comprender un dominio intracelular que comprende al menos un dominio coestimulador, tales como los proporcionados en las SEQ ID NOS: 5-8, o una variante activa de los mismos. Los CAR desvelados en el presente documento pueden comprender al menos dos dominios coestimuladores, en los que al menos uno de los dominios coestimuladores es como se muestra en las SEQ ID NOS: 5-8, o un fragmento activo o variante desvelada en el presente documento.

En algunas realizaciones, un CAR de la presente divulgación comprende un elemento extracelular de unión específica a diana denominado por otra parte como dominio o resto de unión a ligando. La elección del dominio de unión a ligando depende del tipo y el número de ligandos que definen la superficie de una célula diana. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando se puede seleccionar para reconocer un ligando que actúa como marcador superficial celular sobre las células diana asociadas con una patología concreta. Por lo tanto, los ejemplos de marcadores superficiales

celulares que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión a ligando en el CAR de la presente divulgación pueden incluir los asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunitarias, y células cancerosas. En algunas realizaciones, el CAR de la presente divulgación se diseña mediante ingeniería genética para dirigirse a un antígeno tumoral de interés por genomodificación de un resto de unión a ligando deseado que se une específicamente a un antígeno en una célula tumoral. En el contexto de la presente divulgación, "antígeno tumoral" se refiere a antígenos que son comunes a trastornos hiperproliferativos específicos tales como cáncer.

En algunas realizaciones, el dominio de unión a ligando extracelular del CAR es específico para cualquier tumor antígeno o epítipo de interés. Como ejemplos no limitantes, en algunas realizaciones, el antígeno de la diana es un antígeno superficial asociado a tumor, tal como ErbB2 (HER2/neu), antígeno carcinoembrionario (CEA), molécula de adhesión a células epiteliales (Ep-CAM), receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante III de EGFR (EGFRvIII), CD19, CD20, CD30, CD40, disialogangliósido GD2, mucina del conducto epitelial, gp36, TAG-72, glicosfingolípidos, antígeno asociado a glioma, gonadotropina coriónica humana B, alfafetoproteína (AFP), AFP reactiva a lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa inversa de la telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxil esterasa intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, próstata, antígeno específico de próstata (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGA-la, p53, prosteína, PSMA, supervivencia y telomerasa, antígeno tumoral-1 de carcinoma de próstata (PCTA-1), MAGE, ELF2M, neutrófilo elastasa, efrina B2, CD22, factor de crecimiento de la insulina (IGF1)-1, IGF-II, receptor de IGF1, mesotelina, una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) que presenta un epítipo peptídico específico de tumor, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, antígenos de tumores estromales, el dominio A extra (EDA) y el dominio B extra (EDB) de la fibronectina y el dominio AI de la tenascina-C (TnC AI) y la proteína asociada a fibroblastos (fap); un antígeno específico de linaje o específico de tejido tal como CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD34, CD133, CD138, CTLA-4, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), endoglina, una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor (CMH), BCMA (CD269, TNFRSF 17), CS1, o un antígeno superficial específico de virus tal como un antígeno específico del VIH (tal como VIH gp120); un antígeno específico del VEB, un antígeno específico del CMV, un antígeno específico del VPH tal como las oncoproteínas E6 o E7, un antígeno específico del virus de Lasse, un antígeno específico del virus de la gripe, así como cualquier derivado o variante de estos marcadores superficiales. En una realización particular de la presente divulgación, el dominio de unión a ligando es específico para CD19.

En algunas realizaciones, el dominio extracelular de un receptor de antígeno quimérico comprende además un autoantígeno (véase, Payne y col. (2016) Science, Vol. 353 (6295): 179-184), que puede ser reconocido por los receptores de linfocitos B específicos de autoantígeno en linfocitos B, ordenando así a los linfocitos T a dirigirse y destruir de forma específica los linfocitos B autorreactivos en enfermedades autoinmunitarias mediadas por anticuerpos. Dichos CAR se pueden denominar receptores de autoanticuerpos quiméricos (CAAR), y la incorporación de uno o más dominios coestimuladores descritos en el presente documento a dichos CAAR está abarcada por la presente divulgación.

En algunas realizaciones, un CAR desvelado en el presente documento comprende además un dominio transmembrana que se une al dominio de unión a ligando extracelular o autoantígeno con la señalización intracelular y los dominios coestimuladores. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es un polipéptido transmembrana CD8 α .

El dominio de señalización intracelular de un CAR de la presente divulgación es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula en las que se ha introducido el CAR y/o la activación de las rutas proliferativas y de supervivencia celular. La expresión "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o actividad auxiliar incluyendo la secreción de citoquinas. Un dominio de señalización intracelular, tal como ζ de CD3, puede proporcionar una señal de activación para la célula en respuesta a la unión del dominio extracelular. Como se ha analizado, la señal de activación puede inducir una función efectora de la célula tal como, por ejemplo, la actividad citolítica o la secreción de citoquinas.

En algunas realizaciones, el dominio intracelular incluye uno o más dominios coestimuladores intracelulares, tales como los descritos en el presente documento, que transmiten una señal coestimuladora que fomenta la proliferación celular, la supervivencia celular y/o la secreción de citoquinas tras la unión al dominio extracelular. En algunas realizaciones, Dichos dominios coestimuladores intracelulares incluyen, sin limitación, cualquier dominio coestimulador desvelado en el presente documento o aquellos dominios conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, un dominio CD28, un dominio 4-1BB, un dominio OX-40, un dominio ICOS, o un dominio CD27.

Se proporcionan también en el presente documento células genéticamente modificadas que expresan una construcción reguladora inducible. En algunas realizaciones, una construcción reguladora inducible es una construcción transmembrana o intracelular que se expresa en una célula que proporciona una señal coestimuladora inducible para fomentar la proliferación celular, la supervivencia celular y/o la secreción de citoquinas. En algunas realizaciones, las construcciones reguladoras inducibles comprenden uno o más dominios coestimuladores, tales como los descritos en el presente documento y/u otros conocidos en la técnica, que proporcionan una señal coestimuladora tras la activación. En general, una señal coestimuladora puede ser inducida, por ejemplo, mediante homodimerización de dos polipéptidos de construcciones reguladoras inducibles. Una construcción reguladora inducible comprende habitualmente un dominio de unión que permite la homodimerización tras la unión de una molécula pequeña, un anticuerpo u otra molécula que permita la homodimerización de dos polipéptidos de la

construcción. La dimerización puede iniciar la señal coestimuladora a la célula para fomentar la proliferación, la supervivencia y/o la secreción de citoquinas. En algunas realizaciones, en las que el dominio de unión se une a una molécula pequeña, el dominio de unión comprende un análogo de FKBP12 (por ejemplo, que comprende una sustitución F36V) y la molécula pequeña es rimiducid (es decir, AP1903). Cualesquiera dominios de unión conocidos en la técnica útiles en dichas construcciones reguladoras inducibles, tales como los interruptores de seguridad de linfocitos T-CAR y similares, se contemplan en la presente divulgación.

El dominio de señalización intracelular de un CAR de la presente divulgación puede comprender un dominio de señalización derivado de ζ de CD3 y al menos un novedoso dominio coestimulador, tales como las SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa de las mismas.

Las construcciones reguladoras inducibles desveladas en el presente documento pueden comprender un dominio de unión, que permite la dimerización de dos construcciones, y al menos un novedoso dominio coestimulador, tales como las SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa de las mismas.

2.4 Procedimientos para producir vectores de víricos recombinantes

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona vectores de VAA recombinantes para su uso en los procedimientos de la presente divulgación. Los vectores de VAA 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 VAA 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 a empaquetar en el virus. Las partículas víricas que comprenden un genoma (las ITR y genes intervinientes de interés) encerradas en una cápsida se aíslan después 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. En consecuencia, se proporcionan en el presente documento procedimientos para producir vectores de VAA recombinantes que comprenden al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador descrito en el presente documento, tal como las SEQ ID NOS: 5-8, o las variantes activas de las mismas. De manera análoga, se proporcionan en el presente documento procedimientos para producir vectores de VAA recombinantes que codifican los CAR o las construcciones reguladoras inducibles que incluyen al menos un dominio coestimulador descrito en el presente documento, tal como las SEQ ID NOS: 5-8, o las variantes activas de las mismas.

En algunas realizaciones, la transferencia genética se lleva a cabo mediante vectores lentivíricos. Los lentivirus, a diferencia de otros retrovirus, se pueden usar en algunos contextos para transducir determinadas células que no están en división. Los ejemplos no limitantes de vectores lentivíricos incluyen aquellos derivados de un lentivirus, tales como el virus 1 de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), VIH-2, un virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), virus 1 linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV-1), HTLV-2 o el virus de la anemia infecciosa equina (E1AV). Por ejemplo, se han generado vectores lentivíricos atenuando de forma múltiple los genes de la virulencia del VIH, por ejemplo, los genes *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* se eliminan, haciendo que el vector sea más seguro para fines terapéuticos. Se conocen en la técnica vectores lentivíricos, véanse Naldini y col., (1996 y 1998); Zufferey y col., (1997); Dull y col., 1998, patentes de Estados Unidos números 6.013.516; y 5.994.136). En algunas realizaciones, estos vectores víricos están basados en plásmidos o basados en virus, y se configuran para transportar las secuencias esenciales para incorporar ácido nucleico extraño, para la selección, y para la transferencia del ácido nucleico a una célula hospedadora. Se pueden obtener fácilmente lentivirus conocidos a partir de depósitos o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), o aislarse de fuentes conocidas usando las técnicas comúnmente disponibles.

En realizaciones específicas, los vectores lentivíricos se preparan usando un plásmido que codifica los genes *gag*, *pol*, *tat*, y *env* clonados a partir del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y un segundo plásmido que codifica la proteína de la envoltura procedente del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) usado para pseudotipar partículas víricas. Se puede usar un vector de transferencia, tal como el vector pCDH-EF1-MCS, con un promotor adecuado tal como el promotor JeT o el promotor EF1. Los dominios de señalización de CAR, tales como los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento, y las variantes activas de los mismos, se pueden insertar a continuación en la dirección 3' del promotor, seguido por un IRES y GFP. Los tres plásmidos se pueden transfectar a continuación a células lentivíricas, tales como las células Lenti-X-293T, y el lentivirus se puede recoger, concentrar y cribar tras un tiempo de incubación adecuado. En consecuencia, se proporcionan en el presente documento procedimientos para producir vectores lentivíricos recombinantes que comprenden al menos una secuencia de ácido nucleico de un dominio coestimulador descrito en el presente documento, tal como las SEQ ID NOS: 5-8, o las variantes activas de las mismas. De manera análoga, se proporcionan en el presente documento procedimientos para producir vectores lentivíricos recombinantes que codifican un CAR o una construcción reguladora inducible que

incluyen al menos un dominio coestimulador descrito en el presente documento, tal como las SEQ ID NOS: 5-8, o las variantes activas de las mismas.

2.5 Células genéticamente modificadas y poblaciones de las mismas que comprenden novedosos dominios coestimuladores

5 Se proporcionan en el presente documento células genéticamente modificadas para contener al menos un novedoso dominio coestimulador, tales como las SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa de las mismas, como se desvela en el presente documento. La célula modificada genéticamente puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR o una construcción reguladora inducible que incorpora al menos un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento, tales como las SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa de las mismas. En diferentes variaciones de la presente divulgación, una molécula de ácido nucleico o casete de expresión que codifica un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento está presente en el genoma de la célula modificada genéticamente o, como alternativa, no está integrado en el genoma de la célula. En algunas realizaciones en las que la molécula de ácido nucleico o casete de expresión no está integrada en el genoma, la molécula de ácido nucleico o casete de expresión está presente en la célula modificada genéticamente en una construcción de ADN recombinante, en un ARNm, en un genoma vírico, u otro ácido nucleico que no está integrado en el genoma de la célula. En realizaciones particulares, la célula modificada genéticamente puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador descrito en el presente documento y que comprende además al menos un casete de expresión desvelado en el presente documento que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR que no comprende un dominio coestimulador desvelado en el presente documento y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una construcción reguladora inducible.

En algunas células genéticamente modificadas incluidas en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica un CAR o una construcción reguladora inducible incorpora al menos un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento, se sitúa con el gen del receptor alfa de linfocitos T endógenos de la célula. En algunas de estas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se sitúa en el gen alfa de la región constante del receptor de linfocitos T endógenos, tal como en el exón 1 del gen alfa de la región constante del receptor de linfocitos T.

Las células que comprenden los novedosos dominios coestimuladores, o las variantes activas de los mismos, pueden ser células eucariotas. Las células que comprenden los novedosos dominios coestimuladores, o las variantes activas de los mismos, pueden ser linfocitos T o linfocitos NK, particularmente linfocitos T o linfocitos NK. Las células pueden ser linfocitos T primarios o linfocitos NK primarios.

30 Los linfocitos T y los linfocitos NK se pueden obtener de numerosas fuentes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, cordón umbilical, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo, y tumores. Se puede usar cualquier número de linfocitos T y linfocitos NK disponibles en la materia. Los linfocitos T y los linfocitos NK se pueden obtener de una unidad de sangre recogida de un sujeto mediante cualquier número de técnicas conocidas para el técnico experto. Las células de la sangre en circulación de un individuo pueden obtenerse mediante aféresis.

las células genéticamente modificadas que comprenden los novedosos dominios coestimuladores desvelados en el presente documento o las variantes activas de los mismos, pueden presentar una proliferación aumentada cuando se comparan con las células del control adecuadas sin el novedoso dominio coestimulador o la variante activa del mismo. Las células que comprenden los dominios coestimuladores desvelados en el presente documento, o las variantes activas de los mismos, puede presentar además un aumento en la activación y proliferación *in vitro* o *in vivo* tras la estimulación con un antígeno adecuado. Por ejemplo, células, tales como linfocitos T CAR y linfocitos NK CAR, pueden presentar aumento en la activación, proliferación y/o aumento en la secreción de citoquinas en comparación con una célula del control sin los novedosos dominios coestimuladores desvelados en el presente documento, o variantes activas de los mismos. El aumento en la secreción de citoquinas puede incluir aumento en la secreción de IFN- γ , IL-2, TNF- α , entre otros. Los procedimientos para medir la activación celular y la producción de citoquinas son bien conocidos en la técnica, y se proporcionan algunos procedimientos adecuados en los ejemplos del presente documento.

La presente divulgación proporciona además una población de células genéticamente modificadas que comprende una pluralidad de células genéticamente modificadas descritas en el presente documento, que comprende en su genoma una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR o una construcción reguladora inducible que incorpora al menos un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento, tales como las SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa de las mismas. Por lo tanto, en diversas realizaciones de la invención, se proporciona una población de células genéticamente modificadas en la que al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o hasta el 100 %, de células de la población son una célula modificada genéticamente que comprende un novedoso dominio coestimulador desvelado en el presente documento. En determinadas realizaciones, se proporciona una población de células genéticamente modificadas en la que al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al

5 menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o hasta el 100 %, de células en la población expresan un CAR que comprende un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento. En otras realizaciones, se proporciona una población de células genéticamente modificadas en la que al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o hasta el 100 %, de células en la población expresan una construcción reguladora inducible que comprende un novedoso dominio coestimulador desvelado en el presente documento y un CAR que no comprende un dominio coestimulador descrito en el presente documento.

2.6 Procedimientos para producir células genéticamente modificadas

15 La presente divulgación proporciona procedimientos para producir células genéticamente modificadas que comprenden los novedosos dominios coestimuladores desvelados en el presente documento o las variantes activas de los mismos. Se proporcionan procedimientos para modificar las células para comprender una molécula de una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR que incorpora al menos un novedoso dominio coestimulador, tal como las SEQ ID NOS: 5-8, o una variante activa de los mismos. Se proporcionan también procedimientos para modificar las células para comprender una molécula de ácido nucleico que codifica una construcción reguladora inducible que incorpora al menos un novedoso dominio coestimulador, tal como las SEQ ID NOS: 5-8, o una variante activa de los mismos. En diferentes aspectos de la presente divulgación, una molécula de ácido nucleico o casete de expresión que codifica un dominio coestimulador desvelado en el presente documento, o una variante activa del mismo, está integrado en el genoma de la célula o, como alternativa, no está integrado en el genoma de la célula.

25 En algunas realizaciones, el ADN o el ARN que codifica los novedosos dominios coestimuladores (o los CAR o las construcciones reguladoras inducibles) desvelados en el presente documento se introducen en una célula usando cualquier tecnología conocida en la materia. En realizaciones específicas, los vectores o casetes de expresión que comprenden los ácidos nucleicos que codifican los novedosos dominios coestimuladores (o los CAR o las construcciones reguladoras inducibles) desvelados en el presente documento 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 (VAA) (revisados en Vannucci, y col. (2013) *New Microbiol.* 36:1-22). Los vectores de VAA recombinantes útiles en la presente divulgación pueden tener cualquier serotipo que permita la transducción del virus en la célula y la inserción del gen de la nucleasa en la célula y, en realizaciones particulares, en el genoma celular. En realizaciones particulares, los vectores de VAA recombinantes tienen un serotipo de VAA2 o VAA6. Los vectores de VAA recombinantes también pueden ser autocomplementarios de modo que no requieren síntesis de ADN bicatenario en la célula hospedadora (McCarty, y col. (2001) *Gene Ther.* 8:1248-54).

35 En algunas realizaciones, las moléculas o los casetes de expresión de ácidos nucleicos desvelados en el presente documento se administran a una célula en forma de ADN (por ejemplo, un ADN de un plásmido circular o linealizado o productos de la PCR) o ARN. En algunas realizaciones en la que se administran genes de la nucleasa diseñados mediante ingeniería genética en forma de ADN (por ejemplo, un plásmido) y/o mediante un vector vírico (por ejemplo, un VAA, o un vector lentivírico), estos se unen operativamente mediante un promotor o se encuentran en un casete de expresión desvelado en el presente documento. En algunas realizaciones, el promotor es 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 otras realizaciones, el promotor es un promotor sintético, tal como el promotor JeT. En determinadas realizaciones, los genes que codifican los novedosos dominios coestimuladores de los CAR desvelados en el presente documento se unen operativamente a un promotor que impulsa la expresión del gen preferentemente en la célula diana (por ejemplo, un linfocito T humano).

45 En algunas realizaciones, las moléculas o los casetes de expresión de ácidos nucleicos que codifican dominios coestimuladores (o los CAR o las construcciones reguladoras inducibles) desvelados en el presente documento, se acoplan de forma covalente o no covalente a una nanopartícula o se encapsulan en dicha nanopartícula usando 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 $<1 \mu\text{m}$, preferentemente $<100 \text{ nm}$. 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 molécula o casetes de expresión de ácidos nucleicos con el núcleo de la nanopartícula. Esto aumenta el número de copias del ADN que se administra a cada célula y, por tanto, aumenta la expresión intracelular de cada nucleasa diseñada mediante ingeniería genética para maximizar la probabilidad de que se expresen los dominios coestimuladores (o los CAR o las construcciones reguladoras inducibles). 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 tipo núcleo-envoltura cuya superficie confiere funcionalidades adicionales para mejorar la administración 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.

En algunas realizaciones, las moléculas o los casetes de expresión de ácidos nucleicos que codifican dominios coestimuladores (o los CAR o las construcciones reguladoras inducibles) desvelados en el presente documento, están encapsulados dentro de los liposomas o forman complejos con lípidos catiónicos (véanse, 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.

En algunas realizaciones, las moléculas o los casetes de expresión de ácidos nucleicos que codifican dominios coestimuladores (o los CAR o las construcciones reguladoras inducibles) desvelados en el presente documento, 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). En algunas realizaciones, las moléculas o los casetes de expresión de ácidos nucleicos que codifican dominios coestimuladores (o los CAR o las construcciones reguladoras inducibles) desvelados en el presente documento, se combinan con moléculas anfifílicas 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.

En algunas realizaciones, las moléculas o los casetes de expresión de ácidos nucleicos que codifican dominios coestimuladores (o los CAR o las construcciones reguladoras inducibles) desvelados en el presente documento, se formulan como emulsiones para su administración a la célula. El término "emulsión" se refiere a, sin limitación, cualesquiera dispersiones o gotículas de aceite en agua, agua en aceite, agua en aceite en agua, o aceite en agua en aceite, incluyendo estructuras lipídicas que pueden formarse como resultado de fuerzas hidrófobas que impulsan restos apolares (por ejemplo, cadenas largas de hidrocarburos) lejos del agua y grupos de cabeza polar hacia el agua, cuando una fase inmiscible en agua se mezcla con una fase acuosa. Estas otras estructuras lipídicas incluyen, aunque no de forma limitativa, vesículas lipídicas unilamelares, paucilamelares, y multilamelares, micelas y fases lamelares. Las emulsiones se componen de una fase acuosa y una fase lipófila (que normalmente contiene un aceite y un disolvente orgánico). Las emulsiones también contienen frecuentemente uno o más tensioactivos. Las formulaciones de nanoemulsiones son bien conocidas, por ejemplo, tal como se describe en las solicitudes de patente de Estados Unidos números 2002/0045667 y 2004/0043041, y las patentes de Estados Unidos números 6.015.832, 6.506.803, 6.635.676 y 6.559.189.

En algunas realizaciones, las moléculas o los casetes de expresión de ácidos nucleicos que codifican dominios coestimuladores (o los CAR o las construcciones reguladoras inducibles) desvelados en el presente documento, están unidos covalentemente o asociados no covalentemente con, 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 superficiales se puede aprovechar para mejorar la estabilidad y reducir las interacciones inespecíficas.

Se conocen en la técnica procedimientos para introducir y expresar genes en una célula. En el contexto de un vector de expresión, el vector puede introducirse fácilmente en una célula hospedadora, por ejemplo, una célula de mamífero, bacteriana, de levadura o de insecto mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión puede transferirse a una célula hospedadora por medios físicos, químicos, o biológicos. Los procedimientos físicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, y similares. Los procedimientos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Sambrook y col. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Un procedimiento preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedadora es la transfección con fosfato de calcio. Los procedimientos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedadora incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores víricos, y especialmente los vectores retrovíricos, se han convertido en el procedimiento más ampliamente utilizado para insertar genes en un mamífero, por ejemplo, células humanas. Se pueden derivar otros vectores víricos de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados, y similares. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.350.674 y 5.585.362. Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen sistemas de dispersión coloidal, tales como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas. Un sistema coloidal ilustrativo para su uso como un vehículo de administración *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

En algunas realizaciones, la invención proporciona además la introducción de las moléculas o casetes de expresión de ácidos nucleicos desvelados en el presente documento en el gen alfa del receptor de linfocitos T. En determinadas realizaciones, la molécula o los casetes de expresión de ácidos nucleicos se introducen en una secuencia de reconocimiento presente en el gen alfa de la región constante del receptor de linfocitos T, que comprende las secuencias de codificación de la subunidad alfa del receptor de linfocitos T. Como tal, la introducción de las moléculas o los casetes de expresión de ácidos nucleicos altera la expresión de la subunidad alfa del receptor de linfocitos T. En realizaciones particulares, dichas secuencias de reconocimiento pueden estar presente en el exón 1 del gen alfa de

la región constante del receptor de los linfocitos T.

En realizaciones particulares, introducir una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador desvelado en el presente documento en una célula, tal como un linfocito T o linfocito NK, puede aumentar la activación, proliferación, y/o secreción de citoquinas de la célula cuando se compara con una célula del control sin el dominio coestimulador desvelado en el presente documento. En algunas realizaciones, la activación, la proliferación y/o la secreción de citoquinas puede aumentarse *in vitro* o *in vivo* introduciendo una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador desvelado en el presente documento.

En algunas realizaciones, la introducción de al menos un novedoso dominio coestimulador, o un fragmento o variante activa del mismo, en una célula, tal como un linfocito T o linfocito NK, prolonga el periodo de proliferación celular y/o la expansión de la población celular, y/o el retraso del agotamiento celular, cuando se compara con las células del control sin el novedoso dominio coestimulador desvelado en el presente documento. Se conocen en la técnica los procedimientos para medir la expansión y el agotamiento celular (tal como la expansión y el agotamiento de los linfocitos T o los linfocitos NK) y se desvelan en otra parte en el presente documento.

2.7 Composiciones farmacéuticas

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula modificada genéticamente, o una población de células genéticamente modificadas, de la presente divulgación y un transportador farmacéuticamente aceptable. 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 presente divulgación, las células se premezclan típicamente con un transportador farmacéuticamente aceptable y la composición resultante se administra a un sujeto. El transportador 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 presente divulgación comprenden además uno o más agentes adicionales útiles en el tratamiento de una enfermedad en el sujeto. En realizaciones adicionales, cuando la célula modificada genéticamente es un linfocito T o un linfocito NK humano genéticamente modificado (o una célula que se obtiene del mismo), las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen además moléculas biológicas, tales como citoquinas (por ejemplo, IL-2, IL-7, IL-15 y/o IL-21), que fomentan la proliferación celular y el injerto *in vivo*. Las composiciones farmacéuticas que comprenden células genéticamente modificadas de la presente divulgación se pueden administrar en la misma composición que un agente adicional o molécula biológica o, como alternativa, se pueden coadministrar en composiciones separadas.

La presente divulgación proporciona también células genéticamente modificadas, o poblaciones de las mismas, descritas en el presente documento para su uso como medicamento. La presente divulgación proporciona además el uso de células genéticamente modificadas o poblaciones de las mismas descritas en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en un sujeto que lo necesita. En uno de dichos aspectos, el medicamento es útil para la inmunoterapia contra el cáncer en sujetos que lo necesitan.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente divulgación son útiles para tratar cualquier patología que pueda abordarse con inmunoterapia adoptiva de los linfocitos T. En una realización particular, las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente divulgación son útiles como inmunoterapia en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos no limitantes de cánceres que se pueden tratar con las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente divulgación son carcinomas, linfomas, sarcomas, melanomas, blastomas, leucemias, y tumores de células germinales, incluyendo, aunque no de forma limitativa cánceres originados en linfocitos B, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, rhabdomyosarcoma, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer renal, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, linfoma no de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer escamocelular, cánceres inducidos ambientalmente que incluyen aquellos inducidos por asbesto, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin, linfoma mielóide agudo, leucemia mielógena crónica, leucemia linfóide crónica, linfoma inmunoblástico de células grandes, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, y linfoma de linfocitos T, y cualquier combinación de dichos cánceres. En determinadas realizaciones, los cánceres de origen en linfocitos B incluyen, sin limitación, leucemia linfoblástica aguda de linaje B, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos B grandes difusos, pre-LLA B (indicación pediátrica), linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma de zona marginal, linfoma de Burkitt, y linfoma no de Hodgkin de linfocitos B.

2.8 Procedimientos para administrar células genéticamente modificadas

Otro aspecto desvelado en el presente documento es la administración de células genéticamente modificadas de la presente divulgación a un sujeto que lo necesita. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto que lo necesita. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una población de células que comprende un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento, o una variante activa del mismo, se puede administrar a un sujeto que tiene una enfermedad. La enfermedad puede ser un cáncer, tal como un cáncer de origen en linfocitos B. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona también un procedimiento para proporcionar una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T contra una población de células o tejido diana en un mamífero, que comprende la etapa de administrar al mamífero un linfocito T-CAR, en el que el CAR comprende un dominio de unión a ligando extracelular que interactúa específicamente con una diana predeterminada, tal como un antígeno tumoral, y un dominio intracelular que comprende al menos un dominio de señalización, tal como Cd3 ζ , y al menos un novedoso dominio de señalización coestimulador descrito en el presente documento, o una variante activa del mismo. El CAR puede no comprender un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento, pero la célula puede comprender además una construcción reguladora inducible que comprende al menos un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento, en el que la dimerización de la construcción reguladora inducible inicia una señal coestimuladora en la célula. El procedimiento comprende además la administración de una molécula pequeña, el anticuerpo, u otra molécula que induce la dimerización de la construcción reguladora inducible para inducir una señal proliferativa y/o de supervivencia en el linfocito T-CAR para fomentar la proliferación celular y la expansión de la población de linfocitos T-CAR *in vivo*. Los linfocitos T-CAR administrados pueden reducir la proliferación, reducen el número, o destruyen las células diana del receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células genéticamente modificadas de acuerdo con la presente divulgación pueden replicarse y expandirse *in vivo*, dando como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir al control sostenido de una enfermedad.

Los ejemplos de posibles rutas de administración incluyen la administración parental, (por ejemplo, intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC), o mediante infusión). Además, la administración puede ser mediante infusión continua o mediante bolos individuales o múltiples. Uno o ambos agentes pueden infundirse durante un periodo de menos de aproximadamente 12 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, o 1 hora. La infusión puede producirse lentamente en primer lugar y a continuación se aumenta en el tiempo.

Una célula modificada genéticamente de la presente divulgación puede dirigirse a un antígeno tumoral para fines de tratamiento del cáncer. Dichos cánceres pueden incluir, sin limitación, carcinomas, adenocarcinomas, linfomas, sarcomas, melanomas, blastomas, leucemias, y tumores de células germinales, incluyendo, aunque no de forma limitativa cánceres originados en linfocitos B, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, rabdomiosarcoma, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer renal, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, linfoma no de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma del tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer escamocelular, cánceres inducidos ambientalmente que incluyen aquellos inducidos por asbesto, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfomas no de Hodgkin, linfoma mielóide agudo, leucemia mielógena crónica, leucemia linfóide crónica, linfoma inmunoblástico de células grandes, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, y linfoma de linfocitos T, y cualquier combinación de dichos cánceres. Los cánceres de origen en linfocitos B incluyen, sin limitación, leucemia linfoblástica aguda de linaje B, leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos B grandes difusos, pre-LLA B (indicación pediátrica), linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma de zona marginal, linfoma de Burkitt, y linfoma no de Hodgkin de linfocitos B.

Cuando el cáncer se trata con las células genéticamente modificadas actualmente desveladas, el sujeto que ha recibido las células genéticamente modificadas recibe además una terapéutica adicional, tal como radiación, cirugía o un agente quimioterapéutico.

Cuando está indicada una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéutica", un médico puede determinar la cantidad precisa de las composiciones de la presente divulgación que se va a administrar, teniendo en cuenta las diferencias individuales en la edad, el peso, el tamaño del tumor (si está presente), la extensión de la infección o metástasis, y la dolencia del paciente (sujeto). Se puede administrar una composición farmacéutica que comprende las células genéticamente modificadas descritas en el presente documento a una dosificación de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de estos intervalos. La dosificación puede ser de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de estos intervalos. Se pueden administrar composiciones de células múltiples veces a estas dosificaciones. Se pueden administrar las células usando técnicas de infusión que son comúnmente conocidas en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg y col., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988). La dosificación óptima y el régimen de tratamiento de un paciente concretos pueden determinarse fácilmente por una persona experta en la materia médica vigilando los signos de enfermedad del paciente y ajustando el tratamiento de acuerdo con ello.

La administración de células genéticamente modificadas de la presente divulgación puede reducir al menos un síntoma de una enfermedad o dolencia diana. Por ejemplo, la administración de células genéticamente modificadas de la presente divulgación puede reducir al menos un síntoma de un cáncer, tal como cáncer de origen en linfocitos B. Los síntomas de los cánceres, tales como cánceres de origen en linfocitos B, son bien conocidos en la técnica y se pueden determinar mediante técnicas conocidas.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Esta divulgación se ilustra además con los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes. Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de discernir, utilizando solamente experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a las sustancias y procedimientos específicos descritos en el presente documento. Los ejemplos no comprendidos dentro del ámbito de las reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos.

EJEMPLO 1

Producción de vectores lentivíricos para la expresión de los CAR con novedosos dominios coestimuladores

El fin de este estudio era evaluar y caracterizar novedosos dominios coestimuladores que se desarrollaron para fomentar la expansión de los linfocitos T-CAR y la secreción de citoquinas tras la estimulación con antígeno.

Como se muestra en la Figura 1, se diseñaron mediante ingeniería genética cuatro novedosos dominios coestimuladores que comprendían dos motivos de unión a TRAF. Estos dominios se denominan Novel1 (N1; SEQ ID NO: 5), Novel3 (N3; SEQ ID NO: 6), Novel5 (N5; SEQ ID NO: 7), y Novel6 (N6; SEQ ID NO: 8). A fin de evaluar cada novedoso dominio coestimulador, se usaron vectores lentivíricos para preparar linfocitos T-CAR anti-CD 19. Cada CAR comprendía, de 5' a 3', un péptido de señalización (SEQ ID NO: 16), un scFv anti-CD 19 (SEQ ID NO: 17) que tiene las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo FMC63 unidas mediante un enlazador polipeptídico (G₄S)₃, una región bisagra CD8 y un dominio transmembrana (SEQ ID NO: 18), y una región intracelular que comprende dos dominios de señalización intracelular. Se colocó una secuencia de poliadenilación (poliA) de SV40 (SEQ ID NO: 22) en la dirección 3' de la secuencia CAR. Algunos vectores lentivíricos codificaron un CAR anti-CD19 cuya región intracelular comprendía: (i) un novedoso dominio coestimulador, y (ii), un dominio de señalización Cd3-ζ (SEQ ID NO: 19). Se preparó un vector del control negativo que codificaba un CAR que carecía de un dominio coestimulador (Null), y se prepararon vectores adicionales que codificaban los CAR que tenían los dominios coestimuladores CD28 (SEQ ID NO: 20) o 4-1BB (SEQ ID NO: 21) y un dominio de señalización CD3-ζ. Los vectores lentivíricos preparados para este estudio se resumen en la Tabla 1. Cada CAR se ilustra en la Figura 2 y sus respectivas secuencias se muestran en las SEQ ID NOS: 22-28.

Tabla 1.

| Vector lentivírico | Dominio coestimulador | Dominio de activación | CAR SEQ ID NO: |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|
| 1 | - | CD3ζ | 22 |
| 2 | CD28ζ | CD3ζ | 23 |
| 3 | 4-1BB | CD3ζ | 24 |
| 4 | Novel1 | CD3ζ | 25 |
| 5 | Novel3 | CD3ζ | 26 |
| 6 | Novel5 | CD3ζ | 27 |
| 7 | Novel6 | CD3ζ | 28 |

Se prepararon vectores lentivíricos con una estrategia de 2ª generación, usando un plásmido que codificaba gag, pol, tat, y rev clonados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se usó un segundo plásmido, que codificaba la proteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) para pseudotipar partículas víricas. El vector de transferencia pCDH-EF1-MCS (adquirido de System Biosciences) se modificó para contener el promotor JeT (SEQ ID NO: 32) sustituyendo al promotor EF1, y las variantes de señalización de CAR se clonaron en la dirección 3' del promotor, seguido por IRES y GFP. Los tres plásmidos se transformaron en células Lenti-X-293T (adquiridas de ClonTech/Takara), y el lentivirus se recogió de los sobrenadantes 3 d después. Se concentraron las partículas víricas usando un concentrador Lenti-X (ClonTech/Takara), y se cuantificaron, usando el kit Lenti-X qRT-PCR Titration (ClonTech/Takeda) para determinar el número de genomas víricos/ml, así como la titulación en células 293T (ATCC) para determinar las unidades transducible/ml.

EJEMPLO 2

Expresión de receptores de antígenos quiméricos que comprenden novedosos dominios coestimuladores en linfocitos T humanos y caracterización en un ensayo de estrés inducido por antígenos

1. Preparación de linfocitos T-CAR y ensayo de estrés inducido por antígenos

El fin de este estudio era evaluar los novedosos dominios coestimuladores en un estrés inducido por antígenos. En resumen, se prepararon vectores lentivíricos como se describe en el Ejemplo 1. para preparar linfocitos T humanos de donante para la transducción lentivírica, los linfocitos T se estimularon en múltimeros ImmunoCult anti-CD2/CD3/CD28 (StemCell Technologies) y 20 ng/ml de IL-2 durante 4 días. A continuación, las células se recogieron y se depositaron

en pocillos separados para su transducción con vectores lentivíricos individuales. Se añadieron a los cultivos 5 Unidades Transducibles por linfocito T. Se llevó a cabo la transducción en medio X-VIVO 15 (Lonza) suplementado solo con IL-2 (20 ng/ml) y 8 µg/ml de polibreno (Sigma). Se llevó a cabo la coincubación del vector y los linfocitos T durante la noche antes de la sustitución del medio (X-Vivo 15 + 20ng/ml IL-2 + suero humano normal al 5 %).

- 5 Comenzando 4 días después de la transducción lentivírica, se confirmó la expresión de CAR mediante el análisis GFP (Figura 3). Se obtuvo una muestra de cada cultivo de linfocitos T transducido con lentivirus y se midió la señal de GFP en un citómetro de flujo Becton-Dickinson LSR:Fortessa. Se identificó la población de linfocitos TGFP⁺ en cada cultivo por la región titulada CAR-GFP⁺ en la Figura 3, y la frecuencia de los eventos de GFP⁺ se relaciona en cada gráfico de puntos.
- 10 Posteriormente, se cultivaron 5x10⁴ linfocitos T-CAR con un número equivalente de células Raji. En los tiempos indicados en la Figura 4 (d3, 6, 10, 14, 17, y 20), se midieron el número de células y la viabilidad mediante recuento celular automatizado y la exclusión del azul tripán. Los linfocitos T-CAR se identificaron como CD4⁺ o CD8⁺ usando anticuerpos contra CD4 y CD8 humanos, así como la señal GFP usando la citometría de flujo. Se calcularon las cantidades de T-CAR y 1x10⁵ linfocitos T-CAR se volvieron a cultivar con 5x10⁴ células Raji adicionales (relación efector:diana 2:1). CD4⁺, CD8⁺, y las cantidades totales de linfocitos T-CAR se rastrearon y representaron gráficamente respecto al tiempo. En cada punto temporal, se recogieron 50 µl de sobrenadantes del cultivo y se almacenaron a -20 °C para un ensayo de secreción de citoquinas por triplicado. Se midieron los niveles de citoquinas en los sobrenadantes usando IL-2 humana Ultrasensitive, TNFα, y kits de perlas magnéticas IFNγ (Life Technologies) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se adquirieron los datos usando un instrumento Luminex MagPix.
- 20 En un segundo estudio, se construyeron linfocitos T-CAR que contenían los novedosos dominios coestimuladores como se ha descrito anteriormente y 1x10⁵ linfocitos T-CAR se cultivaron con 1x10⁵ células tumorales Raji. En los tiempos indicados en los ejes de la X de la Figura 6, se midieron el número de células y la viabilidad mediante recuento de células automatizado y exclusión del azul tripán. Se identificaron los linfocitos T-CAR usando anticuerpos contra CD4 y CD8 humanos, así como la señal GFP usando citometría de flujo. Se calcularon las cantidades de T-CAR y 1x10⁵ linfocitos T-CAR se volvieron a cultivar con 1x10⁵ células Raji adicionales. Señalar que en la Figura 6, las relaciones diana:efector se ajustaron a 1:1 y se añadieron células Raji al cultivo con más frecuencia, en d3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24, 26, 28, y 31. CD4⁺, CD8⁺, y las cantidades totales de linfocitos T-CAR se rastrearon y representaron gráficamente respecto al tiempo.
- 25 4 días después de la transducción, pero antes del cocultivo con células Raji, se evaluaron los cultivos de linfocitos T para determinar la expresión de CAR-GFP mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. Se transdujeron los linfocitos T a una MOI de 5 unidades transducibles por célula y se observaron eficacias similares para todas las muestras lentivíricas.
- 30

2. Resultados del experimento n.º 1

- 35 Se midieron las cantidades de linfocitos T-CAR respecto al tiempo y se representaron gráficamente en la Figura 4. Las diferencias en los números de T-CAR fueron evidentes desde el d10 en adelante. Los linfocitos T-CAR con dominios de señalización 41Bbz presentaron más proliferación sostenida que aquellos con dominios CD28z. El control BB null presentó los niveles más bajos de expansión de T-CAR en este experimento. Los novedosos dominios N5 y N6 presentaron altos niveles de proliferación sostenida. No se observó preferencia para la expansión de linfocitos T CD4 (Figura 4B) o CD8 (Figura 4C), ya que cada subconjunto proliferó a tasas similares. En orden de rendimiento decreciente en este ensayo de proliferación, los resultados son los siguientes:
- 40 N6>N5>41BBz>N1>>BBnull=CD28z>N3

- Las secreciones de IFNγ, TNFα e IL-2 se midieron mediante el ensayo multiplete con Luminex y aparecen en la Figura 5A, 5B, y 5C, respectivamente. En general, los niveles de secreción de todas las citoquinas disminuyeron con el tiempo. La clasificación de los dominios en términos de secreción de IFNγ en d3 es la siguiente: 41 BBz=CD28z>N1>N5>BBnull=N3>N6. Los niveles de IFNγ disminuyeron en un 50 % o más en todos los grupos experimentales en el punto temporal d7 y continuaron disminuyendo durante el resto del experimento. La clasificación de los dominios en términos de secreción de TNFα produce la siguiente lista: CD28z>N5=41BBz.BBnull>N1=N6>N3. Entre d3 y 7 del cultivo, el nivel de producción de TNFα disminuye en aproximadamente el 50 % de los cultivos CD28z, BBnull, N3, y N5 mientras que los cultivos 41BBz, N1, y N6 mantienen los niveles de producción de TNFα más allá de
- 50 d7. La producción de IL-2, por otro lado, fue baja en todos los cocultivos de dominios novedosos, cuando se comparan con 41BBz y CD28z. Las mediciones de IL-2 pueden estar alteradas por las altas tasas de consumo de IL-2 de los linfocitos T en rápida proliferación presentes en algunos cultivos (Véase la Figura 4).

3. Resultados del experimento n.º 2

- 55 En el segundo experimento (Figura 6), usando un encuentro más frecuente con el antígeno y una relación diana:efector más alta, los resultados son los siguientes, en orden de rendimiento decreciente: N3>N5>CD28z>N1>N6>41BBz>BB null. En este experimento, los linfocitos T-CAR se expandieron de forma continua en la totalidad del periodo de cultivo. Los linfocitos T-CAR CD4 dejaron de expandirse después de aproximadamente 12 días en el cocultivo de Raji (Figura 6B), mientras que los linfocitos T-CAR CD8 continuaron expandiéndose (Figura 6C).

4. Conclusiones

Algunos dominios de señalización novedosos se comportan tan bien o mejor que 41BBz y/o CD28z en condiciones relativamente inferiores (Figura 4) o superiores (Figura 6) de carga del antígeno. Los CAR que transportaban el dominio de señalización N5 superaron ampliamente a 41BBz y Cd28z en ambas condiciones. N5 parece comportarse igual que 41Bbz en el compartimento CD4 en ambos experimentos mientras que N5 superó ampliamente a 41Bbz en el compartimento CD8 en ambos experimentos.

EJEMPLO 3

Ensayo de estrés usando VAA para la inserción dirigida de CAR con los dominios coestimuladores 41BB, N1, o N6

1. Preparación de linfocitos T-CAR y ensayo de estrés inducido por antígenos

A fin de evaluar los novedosos dominios de señalización intracelular, se produjeron linfocitos T-CAR y se midieron sus respuestas al encuentro de antígenos. Para producir linfocitos T-CAR, se aislaron linfocitos T a partir de una muestra de aféresis recogida de donantes humanos sanos usando el kit de selección CD3 positiva de Stem Cell Technologies. Se usaron dos donantes diferentes en este ensayo, designados K799 y z4100. Los linfocitos T se activaron y se expandieron durante 3 días usando Immunocult anti-CD2/3/28 (StemCell Tech) antes de la nucleofección (nucleofector Lonza 4D) con TRC1-2x87EE. Inmediatamente después de la nucleofección, las células se transdujeron con vectores VAA6 que codificaban los CAR anti-CD 19 que caracterizaban diferentes dominios de señalización intracelulares. Las variantes CAR incluidas en este experimento comprendían los dominios coestimuladores 4-1BB, N1 o N6. En todos los vectores, la expresión de CAR fue impulsada por el promotor JeT. Cada molde de donante de CAR estaba flanqueado por brazos de homología en 5' y 3', que tienen homología con las regiones en la dirección 5' y 3' de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2x.87EE. Los moldes de donantes de CAR estaban flanqueados adicionalmente por repeticiones terminales invertidas en 5' y 3'. Los moldes de donantes de cada CAR se ilustran en la Figura 7 y las secuencias de los vectores usados para generar los VAA que codifican CD19-4-1BB CAR, CD19-N1 CAR, y CD19-N6 CAR, se proporcionan en las SEQ ID NOS: 29-31, respectivamente.

La multiplicidad de la infección era de 50.000. 5 días después de la nucleofección/transducción, se retiraron los linfocitos CD3⁺ no editados mediante agotamiento magnético (kit de selección CD3 positiva). A continuación, se evaluaron las células para determinar la pureza de la fracción CD3, y para determinar la expresión de CAR mediante citometría de flujo, usando anti-CD3-BrilliantViolet-711 (Biolegend), y CD19-Fc-biotina (Acro) seguido por estreptavidina-PE (BioLegend). Al día siguiente, se montaron los cocultivos que contenían linfocitos T y K562 diseñados mediante ingeniería genética para expresar CD19 (células "K19"). Las frecuencias de CD19-Fc+ determinadas en el ensayo de citometría de flujo anterior se usaron para calcular el número de entradas de linfocitos T-CAR y establecer una relación efector:diana (E:T) de 2:1. En los días 3, 6, 8, y 10 del cocultivo, se adquirieron las muestras para la evaluación citométrica de flujo de las células tumorales y las cantidades de linfocitos T-CAR en el cocultivo. En la Figura 8 se representan gráficamente las cantidades de linfocitos T-CAR en cada momento como demostración de la expansión de T-CAR tras el encuentro con los antígenos. Usando la cantidad calculada de linfocitos T-CAR así como las células tumorales restantes detectadas en cada punto temporal, se volvió a añadir el número necesario de células K19 recientes al cocultivo para reestablecer la E:T de 2:1. Además, se preparó una placa de cocultivo en paralelo con relaciones E:T variables (2:1, 1:1, y 1:2). Se tomaron muestras de estos cocultivos a las 24 h y 72 h y se determinó el número de células CD19+ mediante citometría de flujo. Los resultados aparecen en la Figura 9. El número de células CD19+ supervivientes del cocultivo con linfocitos T-CAR sirve como indicador de destrucción de células diana.

2. Resultados del ensayo de estrés inducido por antígenos

Se normalizó la entrada de poblaciones de linfocitos T a la frecuencia de las células CAR+ y cantidades equivalentes de linfocitos T-CAR se estimularon con dianas K19 en una E:T de 2. Se evaluó la proliferación de linfocitos T-CAR para los linfocitos T producidos a partir del donante K799 (Figura 8A) y el donante z4100 (Figura 8B). Las células que contenían ediciones de TRAC, pero no células de la inserción de CAR (TRC KO) no proliferan en respuesta al encuentro de antígenos. Por el contrario, los linfocitos T-CAR producidos usando un dominio de señalización 4-1BB proliferaron sólidamente durante la primera semana del cocultivo antes de contraerse en el d12. Los linfocitos T-CAR producidos con las variantes N1 o N6 presentaron tasas de proliferación que no resultaron sustancialmente diferentes de la tasa soportada por 4-1BB. Se evaluó también la destrucción de las células CD19⁺ diana a diversas relaciones E:T a las 24 y 72 h del cocultivo, momento en el cual se analizaron las muestras del cultivo para determinar la cantidad de células CD19+ restantes y se representaron gráficamente los resultados contra un pocillo del control que contenía el mismo número de células K19, pero no de linfocitos T-CAR. Las cantidades de K19 menores que las del control sin linfocitos T se interpretaron como destrucción de células. Los linfocitos T-CAR producidos usando material del donante k799 presentaron poco potencial citolítico en el punto temporal de 24 h, demostrando una notable destrucción solo en la relación E:T menos estricta de 2:1 (Figura 9, Panel A). En 72 h, sin embargo, se observó una extensa destrucción en todas las relaciones E:T. N1 y N6 fueron comparables o superiores a 4-1BB. N1 pareció ser superior en la actividad citolítica en comparación con 4-1BB. Se observó una extensa destrucción en los puntos temporales de 24 h y 72 h en los cocultivos que contenían linfocitos T-CAR producidos a partir del donante z4100 (Figura 9B). Como en el caso anterior, N1 y N6 fueron comparables o superiores en términos de actividad citolítica cuando se compararon con 4-

1BB. En general, se observó una destrucción más extensa a partir de linfocitos T-CAR producidos a partir del donante z4100. Es importante señalar que la relación CD4:CD8 en el donante K799 está próxima a 3:1, mientras que la relación en z4100 es 1:1. Una muestra que contenía un número fijo de linfocitos T-CAR totales (como es el caso en estos experimentos) diferirá por tanto en sus respectivas cantidades de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, conteniendo z4100 casi dos veces la cantidad de linfocitos T CD8⁺, lo que proporciona una explicación de la actividad de destrucción potenciada observada en células derivadas de este donante.

3. Conclusiones

Se descubrió que los novedosos dominios de señalización coestimuladores soportan niveles de proliferación y destrucción células diana que son iguales o mejores que los niveles soportados por la señalización de 4-1BB. De manera importante, los inventores demuestran esta característica de N1 y N6 aquí en los linfocitos T-CAR producidos con la estrategia de inserción dirigida de los inventores, además de otros datos en los que se administró CAR mediante vectores lentivíricos insertados aleatoriamente. Este procedimiento reduce la probabilidad de que las diferencias en las respuestas de T-CAR a un antígeno puedan atribuirse a diferencias en el número de copias integradas entre diferentes preparaciones de T-CAR. De manera importante, las estrategias de inserción tanto aleatoria como dirigida indicaron que N6, especialmente, es una alternativa viable al soporte coestimulador proporcionado por 4-1BB natural.

EJEMPLO 4

Ensayo de proliferación en linfocitos T-CAR que tienen 41BB, N1 o N6 como el dominio coestimulador.

1. Preparación de linfocitos T-CAR con dominios coestimuladores y ensayo de proliferación

Se clonaron elementos CAR que caracterizaban novedosos dominios coestimuladores a partir de vectores de transferencia lentivíricos y se ligaron en el vector pDI. La expresión del elemento CAR está controlada por el promotor JeT y el elemento está flanqueado por los brazos de homología TRAC para permitir la inserción dirigida del gen. Este molde del donante está flanqueado por secuencias de repeticiones terminales invertidas que permiten el envase en partículas de VAA6. Estos plásmidos se linealizaron en primer lugar mediante digestión con la endonucleasa de restricción y precipitación con etanol. Los linfocitos T cebados se nucleofectaron con TRC1-2x87EE, un plásmido CAR linealizado, y un ARNip STING para reducir la toxicidad mediada por sensores de ácido nucleico intracelulares. La administración del ácido nucleico se llevó a cabo usando un nucleofector Lonza 4D. Los linfocitos T editados se hicieron crecer en medio XVIVO-15 (Lonza) suplementado con un combinado al 5 % de suero humano y 30 ng/ml de IL-2 (Gibco). Se llevaron a cabo los cultivos durante 7 días antes del agotamiento magnético de las células CD3⁺ no editadas usando un kit de selección CD3 positiva (StemCell Technologies). Las células reposaron durante la noche en 2 ng/ml de IL-2 antes del marcado con CellTrace Violet 2 μM (Life Technologies) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. CellTrace Violet (CTV) es un sustrato para esterasas intracelulares y funciona de forma muy parecida al éster de succinimidil carboxifluorosceína (CFSE). CTV se difunde a través de membranas hacia el citoplasma, cuando se escinde por enzimas esterasas, que son abundantes en el citoplasma de las células vivas. El producto de escisión no se difunde a través de las membranas celulares, reacciona muy fuertemente con grupos amino libres que se encuentran en las proteínas citoplásmicas, y es fluorescente. Cuando las células marcadas se dividen, las proteínas citoplásmicas fluorescentes se dividen de forma uniforme entre las células hijas, dando como resultado dos células con un brillo individual que es la mitad del que tiene la generación precursora. Comparando la fluorescencia CTV con los controles temporales (tales como el control a día 0) o los controles biológicos (por ejemplo, células no estimuladas), las tasas de proliferación de diversas poblaciones se pueden medir usando citometría de flujo comparando frecuencias de eventos CTV tenues. Las fracciones CD3 marcadas con CTV de linfocitos T que no expresan ningún CAR, CAR-4-1BB, CAR-N1, o CAR-N6 se estimularon a continuación con células tumorales que soportan antígenos. Para este ensayo, se usaron células K562 que expresaban de forma estable CD19 a dos relaciones de efector a diana (E:T) diferentes, 2:1 y 1:1. De manera importante, se determinó la frecuencia de CAR⁺ para cada cocultivo usando CD19-Fc biotinilada y estreptavidina-PE. Las cantidades de entrada de los linfocitos T se normalizaron basándose en sus frecuencias CAR⁺. Se llevaron a cabo cocultivos de linfocitos T y CD19⁺ K562s durante 5 días antes del análisis citométrico de flujo. Se usaron anticuerpos contra CD4-PE y CD8-APC (BioLegend) para identificar positivamente los linfocitos T. Se adquirieron los datos y se analizaron usando el software FlowJo (TreeStar) y se evaluó la proliferación mediante la dilución del colorante.

2. Resultados del ensayo de proliferación

Los resultados del ensayo de proliferación se muestran en la Figura 10. Los histogramas superpuestos de la Figura 10A representan la proliferación de linfocitos T-CAR CAR-4-1BB, y una falta de proliferación en los linfocitos T TRC KO del control negativo a dos relaciones E:T diferentes. Algo más de la mitad de los linfocitos T CAR-4-1BB proliferaron en respuesta a las células diana CD19⁺ mientras que el 13 % se dividió en las muestras del control. Los histogramas superpuestos de la Figura 10B muestran las tasas de proliferación de las células CAR-4-1BB frente a las células CAR-N1. Aparecen en cada cultivo frecuencias aproximadamente iguales de células divididas. Los histogramas superpuestos de la Figura 10C muestran las tasas de proliferación de los linfocitos T CAR-4-1BB en comparación con los linfocitos T CAR-N6. N6 soporta la proliferación en un 77 % de células mientras que 4-1BB soporta la proliferación en un 56 % de células. Se muestra a continuación una tabla de frecuencias de las células divididas en cada cultivo.

Tabla 2. Frecuencia de linfocitos T-CAR en división en el cocultivo con células tumorales que soportan antígenos.

| Variante de señalización | % dividido |
|--------------------------|------------|
| 4-1BB | 56,2 |
| N1 | 55,1 |
| N6 | 77,4 |
| TRC-(CAR-) | 13,3 |

3. Conclusiones

Los cribados lentivíricos identificaron N6 como candidato principal en un esfuerzo por identificar alternativa y/o dominios de señalización superiores para incorporar en la construcción CAR. Este experimento demostró la capacidad de los novedosos dominios de señalización en un escenario de una inserción dirigida a copia única en lugar de un escenario de inserción aleatoria/número de copias variable típico de la administración lentivírica. Estos datos apoyan la demostración de que se pueden diseñar y administrar variantes de señalización funcionales. De manera importante, se descubrió que N6 se comportaba mejor que 4-1BB como transductor de la señal coestimuladora junto con Cd3z tras el encuentro con antígenos.

EJEMPLO 5

Eficacia de los linfocitos T CAR que soportan los dominios coestimuladores 4-1BB y N6 en un modelo de xenoinjerto en murino de linfoma de linfocitos B diseminados.

1. Preparación de los linfocitos T-CAR e inyección en ratones que soportan el tumor

El fin de este estudio era evaluar la eficacia de los linfocitos T CAR diseñados mediante ingeniería genética de expresar construcciones CAR anti-CD 19 que contenían el dominio coestimulador N6 y comparar estas células de los linfocitos T CAR con el dominio coestimulador 4-1BB acumulado en el CAR.

Las secuencias CAR anti-CD19 que caracterizan los dominios coestimuladores 4-1BB o N6 se clonaron en el plásmido pDI y se usaron para producir vectores víricos VAA6. La expresión del elemento CAR fue controlada por el promotor JeT y el transgén estaba flanqueado por los brazos de homología TRAC para permitir la inserción dirigida del gen en el locus TRAC cuando se administró este molde del donante junto con la endonucleasa específica de sitio TRC1-2x.87EE. Este molde donante del transgén CAR estaba flanqueado por secuencias de repeticiones terminales invertidas que permiten el empaquetamiento en partículas de VAA6.

Para el dominio coestimulador N6, se produjeron dos transgenes diferentes de CAR y se empaquetaron en diferentes vectores de VAA para su ensayo. Estos dos elementos CAR que contienen N6 contenían diferentes secuencias de poliadenilación (PoliA) utilizadas en el extremo 3' del transgén CAR para evaluar si estas secuencias PoliA alteraban la función de los linfocitos T CAR. La secuencia poliA utilizada en las construcciones 7241 (4-1BB) y 7205 (N6) era una secuencia poliA de SV40 que comprendía la SEQ ID NO: 33. La secuencia poliA utilizada en la construcción 7206 (N6) es un secuencia bi-poliA de SV40 que tiene una primera secuencia que comprende la SEQ ID NO: 34 y una segunda secuencia que comprende la SEQ ID NO: 35. La Tabla 3 reseña las características de las construcciones CAR usadas en este estudio, que se ilustran en la Figura 11. Las secuencias de los vectores usados para generar los VAA que codifican la construcción 7241 (4-1BB), la construcción 7205 (N6), y la construcción 7206 (N6), se proporcionan en las SEQ ID NOS: 36-38, respectivamente.

Tabla 3. Vectores VAA

| Nombre del vector VAA | Promotor | scFv | Dominio coestimulador | Dominio de activación | Secuencia PoliA |
|-----------------------|----------|-------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| 7205 | JeT | FMC63 | Novel6 (N6) | CD3ζ | PoliA de SV40 |
| 7206 | JeT | FMC63 | Novel6 (N6) | CD3ζ | Bi-PoliA de SV40 |
| 7241 | JeT | FMC63 | 4-1BB | CD3ζ | PoliA de SV40 |

Los linfocitos T cebados se electroporaron con el ARNm de TRC1-2x87EE. La administración del ácido nucleico se llevó a cabo usando un nucleofector Lonza 4D. Después de la electroporación, las células se transdujeron de forma simulada, o se transdujeron con vectores VAA6 que soportaban los moldes de los donantes con transgenes CAR anti-CD 19 que incluían los dominios coestimuladores tanto 4-1BB como N6.

Los linfocitos T editados se hicieron crecer en medio XVIVO-15 (Lonza) suplementado con un combinado al 5 % de suero humano y 30 ng/ml de IL-2 (Gibco). Las células se cultivaron durante 5 días antes del agotamiento magnético de las células CD3+ no editadas usando un kit de selección CD3 positiva (StemCell Technologies). Se cultivaron las células durante 3 días más.

Se inyectaron ratones NSG (n=5 por grupo) con 2e5 células Raji que expresaban la luciferasa de la luciérnaga (Raji-ffluc). Tres días después, cada uno de los ratones se inyectaron con 1e6 células TCR KO del control, o 1e6 linfocitos T CAR producidos usando los vectores 7205 (N6), 7206 (N6) o 7241 (4-1BB). En los días indicados, los ratones vivos recibieron por vía i.p. sustrato de Luciferina (150 mg/kg en solución salina), se anestesiaron, y se midió la actividad de luciferasa después de 7 min usando IVIS Spectrum (Perkin Elmer, Waltham, MA). Los datos se analizaron y se

exportaron con el programa informático Living Image 4.5.2 (Perkin Elmer, Waltham, MA). La intensidad de la señal de luminiscencia en las imágenes está representada por la radiancia en p/s/cm²/sr. Se calculó también el flujo total usando el programa informático Living Image 4.5.2 (Perkin Elmer, Waltham, MA) utilizando el animal completo como la región de interés. Los ratones se vigilaron según la progresión de los síntomas de la enfermedad y se sometieron a eutanasia cuando fue necesario de acuerdo con criterios predefinidos.

2. Resultados del modelo de xenoinjerto de murino

En las Figuras 12-14 se presentan los resultados del modelo de xenoinjerto de murino del linfoma de linfocitos B diseminados que evalúa la eficacia de las construcciones CAR descritas en la Tabla 3.

El injerto y el crecimiento de células Raji-ffluc en ratones del control que recibían células TCR KO fue visible mediante la obtención de imágenes ventrales y dorsales de ratones en el día 7 después de la inyección de Raji-ffluc, y se observó un rápido recrecimiento de células Raji en estos ratones como indica el aumento de la señal de luminiscencia el Día 10 y el Día 16 (Figura 12, Figura 13A y Figura 13C). Por el contrario, el tratamiento de los ratones con linfocitos T CAR que soportan las construcciones 7205 (N6), 7206 (N6) y 7241 (4-1BB) dio como resultado un crecimiento retardado del tumor (Figura 12 y Figura 13). Se detectó el recrecimiento de células Raji comenzando aproximadamente el Día 20 en un subconjunto de ratones en los grupos T CAR 7205 (N6) y 7241 (4-1BB), como se puso de manifiesto con la obtención de imágenes dorsales y ventrales de los animales. Sin embargo, en el grupo de tratamiento T CAR 7206 (N6), no se observó un crecimiento tumoral apreciable durante los 40 días del estudio.

Como se muestra en la Figura 14, los 5 ratones en el grupo TRC KO del control se sometieron a eutanasia en el día 19 debido al rápido inicio de los síntomas relacionados con la enfermedad que incluían parálisis completa de las extremidades posteriores. Sin embargo, el tratamiento con linfocitos T CAR producido usando los vectores 7205 (N6) y 7206 (N6) potenció la supervivencia de los ratones, permaneciendo vivos todos los ratones en estos grupos en el día 40 (se retiró un ratón del grupo 7206 del estudio debido a muerte no relacionada con crecimiento tumoral o infusión de T CAR). Los ratones tratados con la construcción CAR que contenía 7241 4-1BB aumentaron también este tiempo de supervivencia de los ratones en este grupo de tratamiento, requiriendo un ratón la eutanización el día 38 y permaneciendo vivos los otros cuatro ratones a lo largo del estudio de 40 días.

3. Conclusiones

El tratamiento de ratones a los que se habían injertado células Raji-ffluc CD19+ con linfocitos T CAR anti-CD19 que expresaban una segunda generación de los CAR que tenían el dominio coestimulador N6 (en las dos configuraciones 7205 y 7206) dio como resultado una prolongada supervivencia de los ratones y una drástica reducción de la carga tumoral en comparación con los ratones que recibieron células TCR KO. De manera importante, hasta el día 40 del estudio, la construcción 7205 (N6) pareció comportarse de forma comparable con el CAR que contenía 7241 4-1BB y la construcción 7206 (N6) pareció superar las configuraciones 7205 (N6) y 7241 (4-1BB) en términos de una supresión duradera del recrecimiento de células Raji. Generalmente, estos datos confirman los hallazgos *in vitro* de que el dominio coestimulador N6 es funcional como dominio coestimulador y respaldan la capacidad de los linfocitos T CAR de destruir las dianas CD19+ *in vivo*, de acuerdo con los experimentos que evaluaban la actividad *in vitro* de las construcciones. Asimismo, las construcciones que llevaban el dominio coestimulador N6 coincidieron o superaron la actividad de la construcción T CAR con el dominio coestimulador 4-1BB.

EJEMPLO 6

Caracterización de un CAR de tercera generación que comprende múltiples dominios coestimuladores

1. Producción de linfocitos T-CAR que expresan un CAR de tercera generación

Se prepararon construcciones adicionales para evaluar los novedosos dominios coestimuladores abarcados por la invención como parte de un CAR de tercera generación, en el que los dominios de señalización intracelulares incluyen dos dominios coestimuladores y un dominio de señalización CD3- ζ .

En algunos ejemplos, se preparó un CAR de tercera generación anti-CD 19 que comprendía, de 5' a 3', la secuencia de señalización (SEQ ID NO: 16), scFv específico de CD19 basado en FMC63 (SEQ ID NO: 17), y la bisagra y los dominios transmembrana de CD8 (SEQ ID NO: 18) descritos anteriormente, seguido por un dominio coestimulador MyD88 (SEQ ID NO: 39; secuencia obtenida del documento WO 2016/036746), un dominio coestimulador N6 (SEQ ID NO: 8), y un dominio de señalización CD3- ζ (SEQ ID NO: 19). La secuencia de señalización bi-políA de SV40 que comprendía SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35 se situó en dirección 3' de la secuencia CAR. Como se ha descrito en ejemplos anteriores, la secuencia que codificaba esta construcción se clonó en el plásmido pDI, y la expresión del CAR se controló con el promotor JeT. Además, el transgén estaba flanqueado por los brazos de homología TRAC para permitir la inserción dirigida del gen en el locus TRAC cuando se administró este molde del donante junto con la endonucleasa específica de sitio TRC1-2x.87EE. Este molde del donante del transgén CAR estaba flanqueado además por secuencias de repeticiones terminales invertidas. Se ilustra un molde del donante CAR MyD88/N6 en la Figura 15 y la secuencia de un vector que comprende el molde del donante se proporciona como SEQ ID NO: 40.

En algunos experimentos, el molde del donante de CAR se administrará como ADN linealizado tras la linealización del

plásmido pDI. En otros casos, el molde del donante se empaquetará en partículas de VAA6 para la administración vírica.

2. Evaluación de linfocitos T CAR MyD88/N6 para la destrucción celular, la proliferación, y la secreción de citoquinas

5 En algunos experimentos, los linfocitos T CAR MyD88/N6 se produjeron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4 mediante nucleofección de linfocitos T cebados con un plásmido del molde de CAR linealizado, la meganucleasa TRC 1-2x.87EE, y un ARNip STING para reducir la toxicidad mediada por sensores de ácido nucleico intracelulares. Los linfocitos T CAR MyD88/N6 se hicieron crecer adicionalmente y se expandieron como se ha descrito.

10 Los linfocitos T CAR MyD88/N6 se caracterizaron según su competencia en la destrucción celular, la proliferación, y la secreción de citoquinas. Para evaluar la competencia en la destrucción celular y la proliferación, los linfocitos T CAR MyD88/N6 se sometieron a un ensayo de estrés inducido por antígenos como se ha descrito en el Ejemplo 3 anterior, en el que los linfocitos T CAR MyD88/N6 se cocultivaron con células K562 diseñadas mediante ingeniería genética para expresar CD19 (células "K19") a diversas relaciones efector:diana. Se evaluó también la proliferación como se ha descrito en el Ejemplo 4 marcando las células con CellTrace Violet y cocultivándolas con células K19 que llevaban los antígenos a diversas relaciones efector:diana. La secreción de citoquinas (por ejemplo, IL-2 humana, TNF α e IFN γ) se determinó como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior después del cocultivo con células K19 a diversas relaciones efector:diana.

20 Se llevaron a cabo experimentos similares que examinaban la destrucción celular, la proliferación, y la secreción de citoquinas usando la transducción de partículas de VAA recombinantes para la administración del molde del donante de CAR a los linfocitos T cebados, que se nucleofectaron adicionalmente con ARNm que codificaba la meganucleasa TRC 1-2x.87EE.

3. Proliferación de linfocitos T CAR MyD88/N6

25 Para comparar las funciones de los dominios coestimuladores N6 y MyD88/N6 en los linfocitos T CAR, el ADN plásmido linealizado que expresaba el dominio coestimulador N6 de la novedosa tercera generación de CAR que contenía el dominio coestimulador MyD88/N6 se nucleofectó en linfocitos T humanos junto con la endonucleasa específica de sitio TRC1-2x.87EE y el ARNip de STING. En la Figura 15 se ilustra la construcción que codificaba el CAR MyD88/N6. La construcción que codificaba el CAR N6 se denominó 7206 y se proporcionó como SEQ ID NO: 38. La construcción que codificaba el CAR MyD88/N6 se denominó 7240 y se proporcionó como SEQ ID NO: 40.

30 Tras la nucleofección, las células se hicieron crecer en medio X-Vivo (Lonza) suplementado con FBS al 5 % y 30 ng/ml de IL-2 (Gibco) durante 5 días. En el día 5, los linfocitos T CD3⁺ restantes se marcaron usando el kit II de selección CD3 positiva humana (StemCell Technologies) y se retiraron magnéticamente según las recomendaciones del fabricante. Las fracciones agotadas de los CD3 restantes se resuspendieron en medio X-Vivo suplementado con 10 ng/ml de IL-15 y 3 ng/ml de IL-21 (Gibco) y se hicieron crecer durante 2 días más. Para preparar muestras para el ensayo, 2e⁶ linfocitos T de las condiciones N6 y MyD88/N6, así como TRC1-2x.87EE tratados solo con los linfocitos T del control, se marcaron *in vitro* con una solución 2 μ M de la solución cell trace violet (CTV). Después de la incubación, se evaluaron la consistencia del marcado con CTV y las frecuencias de los linfocitos T CAR en el citómetro de flujo Becton-Dickinson LSR:Fortessa tras teñir con CD19-Biotina Fc (Acro Biosystems) y Estreptavidina PE (BD). Para el ensayo de proliferación, las frecuencias de los linfocitos T CAR se normalizaron hasta el 1 % del total de la población de linfocitos T añadida, añadiendo 2e⁵ linfocitos T totales (2e³ linfocitos T CAR) a pocillos duplicados de una placa de 96 pocillos de fondo redondo en medio X-Vivo sin suplemento de citoquinas. Para evaluar la proliferación de linfocitos T CAR específicos de antígenos, se añadieron 4e³ células K19 a un pocillo con 4e³ células K562 añadidas al segundo para calcular la proliferación de fondo no específica. Las células se mezclaron e incubaron durante un total de 6 días.

45 En el día 6 después del cocultivo, las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS. Para analizar la proliferación de subconjuntos de linfocitos T individuales, las muestras se teñieron con anticuerpos CD4 BV711 y CD8 BV785 (Biolegend), así como el colorante fantasma BV510 (TONBO biosciences) para excluir células muertas. Después de la tinción, se analizaron las muestras y se recogieron los datos en un citómetro de flujo Becton-Dickinson LSR:Fortessa.

4. Resultados de los estudios de proliferación

50 En la Figura 16 se muestran los resultados del ensayo de proliferación comparando los dominios coestimuladores N6 y MyD88/N6. Para calibrar la proliferación de fondo de las poblaciones negativas para CAR, la dilución CTV en linfocitos T derivados de la muestra del control nucleofectada solo con TRC se comparó en pocillos cocultivados con cualquiera de las células K19 o K562. De manera importante, ambos subconjuntos de linfocitos T mostraron niveles similares de proliferación no específica en presencia de células K19 (sombreado claro) y K562 (sombreado oscuro), sugiriendo que cualquier proliferación era independiente de CD19 (Figura 16A y 16B). Por comparación, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ nucleofectados con ADN plásmido linealizado que expresaba el dominio coestimulador N6 mostraron una mayor dilución de CTV en presencia de células K19 en comparación con los controles de K562, lo que indica una proliferación sustancial específica de antígenos (Figura 16C y 16D). De forma notable, la misma evaluación llevada a cabo en linfocitos T que expresaban el dominio coestimulador MyD88/N6 mostró también una mayor proliferación de

linfocitos T CAR en respuesta a células K19 (Figura 16E y 16F). La dilución total de CTV era menor en linfocitos T que expresaban MyD88/N6 en comparación con linfocitos T CAR que expresaban solo el dominio coestimulador N6; sin embargo, la expresión de cualquier dominio coestimulador dio como resultado una dilución mayor de CTV en comparación con los linfocitos T del control solo con TRC.

5 5. Conclusiones

La nucleofección de linfocitos T cebados con ADN de plásmido linealizado que expresaba tanto N6 como el dominio coestimulador MyD88/N6 de tercera generación dio como resultado linfocitos T CAR capaces de proliferar, como se ha indicado por la dilución de CTV, de una manera específica de antígeno. Asimismo, la proliferación se produjo en ambos subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y por encima del fondo observado en células del control que no expresan CAR. En su conjunto, este estudio demostró que N6 y MyD88/N6 pueden funcionar como dominios coestimuladores en los linfocitos T CAR.

EJEMPLO 7

Caracterización de novedosos dominios coestimuladores en una construcción inducible

15 1. Producción de linfocitos T CAR que expresan un CAR de primera generación y una construcción inducible que comprende un novedoso dominio coestimulador

Se prepararon construcciones adicionales para evaluar los novedosos dominios coestimuladores abarcados por la invención como parte de una construcción coestimuladora inducible, que se coexpresa con un CAR de primera generación anti-CD19 que comprende un dominio de señalización CD3- ζ .

En algunos ejemplos, se preparó una construcción que comprendía, de 5' a 3', un casete de expresión para una construcción coestimuladora inducible, un elemento T2A, y un casete de expresión de CAR que codificaba un CAR de primera generación anti-CD 19.

El CAR de primera generación anti-CD 19 codificado por el casete de expresión de CAR incluía, de 5' a 3', la secuencia de señalización (SEQ ID NO: 16), el scFv específico de CD19 basado en FMC63 (SEQ ID NO: 17), y la bisagra de CD8 y los dominios transmembrana (SEQ ID NO: 18) descritos anteriormente, con una región intracelular que comprendía un dominio de señalización de CD3- ζ (SEQ ID NO: 19). La secuencia de señalización bi-poliA de SV40 que comprendía SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 34 se situó en dirección 3' de la secuencia CAR.

La construcción coestimuladora inducible incluía, de 5' a 3', bien un dominio coestimulador N6 en solitario (SEQ ID NO: 8), o bien un dominio MyD88 (SEQ ID NO: 39) y un dominio N6 (SEQ ID NO: 8) en tándem, seguido por un dominio Fv que comprendía dos dominios FKBP12v36 de unión a ligando en tándem (SEQ ID NO: 41; secuencias obtenidas del documento WO 2015/123527), que se unen a la molécula pequeña rimiducid para inducir la dimerización de la construcción y la activación de la señalización coestimuladora.

Como se ha descrito en ejemplos anteriores, estas construcciones se clonaron en el plásmido pDI y las expresiones de la construcción coestimuladora inducible y el CAR anti-CD19 se controlaron con el promotor JeT. Además, estas construcciones estaban flanqueadas por los brazos de homología TRAC para permitir la inserción dirigida del gen en el locus TRAC cuando se administraba junto con la endonucleasa específica de sitio TRC1-2x.87EE. Estas construcciones estaban flanqueadas adicionalmente por secuencias de repeticiones terminales invertidas.

En algunos experimentos, el molde del donante se administrará como ADN linealizado tras la linealización del plásmido pDI. En otros casos, el molde del donante se empaquetará en partículas de VAA6 para la administración vírica.

Las células que expresaban el CAR anti-CD19 junto con una construcción coestimuladora inducible que tenía solo el dominio coestimulador N6 se denominaron linfocitos T CAR iN6. Las células que expresaban el CAR anti-CD19 junto con una construcción coestimuladora inducible que tenía los dominios coestimuladores MyD88 y N6 se denominaron linfocitos T CAR iMyD88/N6.

2. Evaluación de linfocitos T CAR con construcciones inducibles para la destrucción celular, la proliferación, y la secreción de citoquinas

En algunos experimentos, se produjeron linfocitos T CAR iN6 o T CAR iMyD88/N6 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4 mediante nucleofección de los linfocitos T cebados con un plásmido del molde de linealizado, la meganucleasa TRC 1-2x.87EE, y el ARNip de STING para reducir la toxicidad mediada por los sensores de ácidos nucleicos intracelulares. Los linfocitos T CAR iN6 o los linfocitos T CAR iMyD88/N6 se hicieron crecer adicionalmente y se expandieron como se ha descrito.

Los linfocitos T CAR iN6 y los linfocitos T CAR iMyD88/N6 se caracterizaron para la competencia en la destrucción celular, la proliferación y la secreción de citoquinas en presencia y ausencia de la molécula pequeña rimiducid, que induce la dimerización de la construcción inducible e inicia la señalización coestimuladora en la célula. Para evaluar la competencia en la destrucción celular y la proliferación, los linfocitos T CAR se sometieron a un ensayo de estrés inducido por antígenos como se ha descrito en el Ejemplo 3 anterior, en el que los linfocitos T CAR La se cocultivaron

con células K562 diseñadas mediante ingeniería genética para expresar CD19 (células "K19") a diversas relaciones efector:diana. Se evaluó también la proliferación como se ha descrito en el Ejemplo 4 marcando las células con CellTrace Violet y cocultivándolas con células K19 que llevaban los antígenos a diversas relaciones efector:diana. La secreción de citoquinas (por ejemplo, IL-2 humana, TNF α e IFN γ) se determinó como se ha descrito en el Ejemplo 2 anterior después del cocultivo con células K19 a diversas relaciones efector:diana.

Se llevaron a cabo experimentos similares que examinaban la destrucción celular, la proliferación, y la secreción de citoquinas usando la transducción de partículas de VAA recombinantes para la administración del molde del donante a los linfocitos T cebados, que se nucleofectaron adicionalmente con ARNm que codificaba la meganucleasa TRC 1-2x.87EE.

10 3. Proliferación de linfocitos T CAR iMyD88/N6

Para caracterizar la funcionalidad de los novedosos dominios coestimuladores en una construcción inducible, Los linfocitos T cebados se nucleofectaron con ADN de plásmido linealizado que expresaba una construcción inducible coestimuladora iMyD88/N6 o, como control, el dominio coestimulador N6 expresado como parte del CAR. Las células se nucleofectaron adicionalmente con la endonucleasa específica de sitio TRC1-2x.87EE y el ARNip de STING como se ha descrito anteriormente. Como control negativo, se nucleofectó una muestra separada con la endonucleasa específica de sitio TRC1-2x.87EE y el ARNip de STING solo. En la Figura 17 se ilustra la construcción del molde del donante de CAR. Como se ha descrito anteriormente, la construcción que codificaba el CAR N6 se denominó 7206 y se proporcionó como SEQ ID NO: 38. La construcción que codificaba el dominio coestimulador iMyD88/N6 se denominó 7235 y se proporcionó como SEQ ID NO: 42.

Después de la nucleofección, las muestras de linfocitos T reposaron durante 6 horas en medio X-Vivo (Lonza) suplementado con FBS al 5 % y 30 ng/ml de IL-2 (Gibco). A continuación, las muestras se dividieron por la mitad en pocillos separados, recibiendo un pocillo rimiducid a una concentración final de 5 nanomolar y el otro pocillo se dejó sin tratar. Las células se incubaron posteriormente durante 5 días. En el día 5, los linfocitos T CD3⁺ restantes se marcaron usando el kit II de selección CD3 positiva humana (StemCell Technologies) y se retiraron magnéticamente según las recomendaciones del fabricante. Las fracciones agotadas de los CD3 restantes se resuspendieron en medio X-Vivo suplementado con 10 ng/ml de IL-15 y 3 ng/ml de IL-21 (Gibco). Las muestras que habían recibido rimiducid en el día 0 después de la nucleofección se enriquecieron con rimiducid nuevo a una concentración final de 5 nanomolar, mientras que las muestras sin tratar se resuspendieron en citoquina suplementada con X-Vivo solamente. A continuación, se incubaron las células durante 2 días más.

Para preparar muestras para el ensayo, 2e⁶ linfocitos T procedentes de las formas iMyD88/N6 y N6 que habían recibido o no rimiducid, así como TRC1-2x.87EE tratado solo con los linfocitos T del control, se marcaron *in vitro* con una solución 2 μ M de la solución cell trace violet (CTV). Después de la incubación, se evaluaron la consistencia del marcado con CTV y las frecuencias de los linfocitos T CAR en el citómetro de flujo Becton-Dickinson LSR:Fortessa tras teñir con CD19-Biotina Fc (Acro Biosystems) y Estreptavidina PE (BD). Las frecuencias de los linfocitos T CAR se normalizaron hasta el 1 % del total de la población de linfocitos T añadida, añadiendo 2e⁵ linfocitos T totales (2e³ linfocitos T CAR) a dos pocillos separados de una placa de 96 pocillos de fondo redondo en medio X-Vivo sin suplemento de citoquinas. A continuación, un pocillo recibió 4e³ células K19 diana, mientras que el otro recibió 4e³ K562 células como un control. A continuación, se añadió rimiducid a las muestras que habían recibido rimiducid en el día 0 y el día 5 después de la nucleofección, respectivamente. Las células se mezclaron e incubaron durante un total de 6 días.

En el día 6 después del cocultivo, las muestras se teñieron para el análisis por citometría de flujo. Para cuantificar la proliferación de subconjuntos de linfocitos T individuales, las muestras se teñieron con anticuerpos CD4 BV711 y CD8 BV785 (Biolegend), con la exclusión de células muertas durante el análisis que se produce mediante la adición de colorante fantasma BV510 (TONBO biosciences) al cóctel de tinción. Después de la tinción, se analizaron las muestras y se recogieron los datos en un citómetro de flujo Becton-Dickinson LSR:Fortessa.

4. Resultados de los estudios de proliferación

Los resultados del ensayo de proliferación comparando la novedosa construcción coestimuladora inducible iMyD88/N6 con el CAR N6 se muestran en las Figuras 18-20. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ procedentes de células nucleofectadas que expresan TRC y que no expresan CAR mostraron niveles similares de proliferación no específica cuando se cocultivaron con cualquiera de las células K19 (sombreado claro) o K562 (sombreado oscuro) (Figura 18A y 18B).

Al contrario, la proliferación de linfocitos T-CAR que expresan un CAR N6 fue dependiente de antígeno, ya que la dilución de CTV fue mayor cuando se cultivó con células K19 (sombreado claro) en oposición a K562 (sombreado oscuro) (Figura 19A y 19C). Además, los linfocitos T CAR que expresaban el CAR N6 no inducible mostraron una proliferación sustancial de ambos subconjuntos de linfocitos T en presencia (sombreado oscuro) o ausencia (sombreado claro) de rimiducid y células K19 (Figura 19B y 19D), mostrando que rimiducid no tiene ninguna función en ausencia de un dominio coestimulador dependiente de interruptor.

Para la construcción coestimulador inducible, la proliferación de linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ que expresaban iMyD88/N6 fue mayor cuando se cocultivaron con células K19 (sombreado claro) en comparación con las células K562

del control (sombreado oscuro) (Figura 20A y 20C). De manera importante, la mayor dilución de CTV era dependiente de rimiducid (sombreado oscuro) en comparación con las muestras no tratadas con rimiducid (sombreado claro) cuando se cultivaron con células K19 de ambos subconjuntos de linfocitos T analizados, lo que respalda la función inducible del interruptor iMyD88/N6 (Figura 20B y 20D).

5 5. Conclusiones

La expresión de la novedosa construcción coestimuladora inducible iMyD88/N6 en los linfocitos T CAR dio como resultado la proliferación de linfocitos T tanto Cd4+como+como CD8+ que era dependiente de antígeno. Asombrosamente, la dilución de CTV en los linfocitos T cultivados fue mayor en presencia de rimiducid, lo que muestra la naturaleza inducible de las construcciones del dominio coestimuladoras cuando se expresan en los linfocitos T CAR. Como rimiducid no tuvo efecto sobre la proliferación de linfocitos T CAR cuando el dominio coestimulador se expresa como parte del CAR, estos datos respaldan la funcionalidad de los novedosos dominios coestimuladores sobre la función de los linfocitos T CAR.

LISTADO DE SECUENCIAS

| | | |
|----|---|-----|
| | <110> Precision Biosciences, Inc. | |
| 15 | <120> DOMINIOS COESTIMULADORES PARA SU USO EN CÉLULAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS | |
| | <130> P1090.70017WO00 | |
| | <160> 42 | |
| | <170> PatentIn versión 3.5 | |
| 20 | <210> 1 | |
| | <211> 126 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Sintetizado | |
| 25 | <400> 1 | |
| | aaacatagcc gcaaaaaatt tgtgcatctg ctgaaacgcc cgtttattaa aaccaccggc | 60 |
| | gcggcgcaga tggaagatgc gagcagctgc cgctgcccgc aggaagaaga aggcgaatgc | 120 |
| | gatctg | 126 |
| | <210> 2 | |
| | <211> 126 | |
| | <212> ADN | |
| 30 | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Sintetizado | |
| | <400> 2 | |
| | aaatggggcc gcaaaaaact gctgtatctg tttaaacgcc cgtttgcgca gccgattcgc | 60 |
| | accgcgcagg aagaagatgc gagcagctgc cgctttccgg aagaagaaga aggcaactgc | 120 |
| | gaactg | 126 |
| 35 | <210> 3 | |
| | <211> 126 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Secuencia artificial | |
| | <220> | |
| 40 | <223> Sintetizado | |
| | <400> 3 | |

ES 2 811 500 T3

```

aaacatagcc gcaaaaaaat tatttttctg tataaaaacc cgtttatgaa accgaccaac      60
agcgcgcgagg aagaagatgc gagcagctgc cgctttccgc aggaagaaga aggcgattgc      120
gatctg                                             126

<210> 4
<211> 126
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado

<400> 4
aaagcgagcc gcaaaaaagc ggcggcggcg gcgaaaagcc cgtttgcgag cccggcgagc      60
agcgcgcgagg aagaagatgc gagcagctgc cgcgcgccga gcgaagaaga aggcagctgc      120
gaactg                                             126

10 <210> 5
    <211> 42
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

15 <220>
    <223> Sintetizado

    <400> 5
        Lys His Ser Arg Lys Lys Phe Val His Leu Leu Lys Arg Pro Phe Ile
        1           5           10           15

        Lys Thr Thr Gly Ala Ala Gln Met Glu Asp Ala Ser Ser Cys Arg Cys
           20           25           30

        Pro Gln Glu Glu Glu Gly Glu Cys Asp Leu
           35           40

20 <210> 6
    <211> 42
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Sintetizado

    <400> 6
        Lys Trp Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Leu Phe Lys Arg Pro Phe Ala
        1           5           10           15

        Gln Pro Ile Arg Thr Ala Gln Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Arg Phe
           20           25           30

25 <400> 7
        Pro Glu Glu Glu Glu Gly Asn Cys Glu Leu
           35           40

<210> 7
<211> 42
<212> PRT

```

ES 2 811 500 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 7

Lys His Ser Arg Lys Lys Ile Ile Phe Leu Tyr Lys Asn Pro Phe Met
1 5 10 15

Lys Pro Thr Asn Ser Ala Gln Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Gln Glu Glu Glu Gly Asp Cys Asp Leu
35 40

5

<210> 8

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Sintetizado

<400> 8

Lys Ala Ser Arg Lys Lys Ala Ala Ala Ala Lys Ser Pro Phe Ala
1 5 10 15

Ser Pro Ala Ser Ser Ala Gln Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Arg Ala
20 25 30

Pro Ser Glu Glu Glu Gly Ser Cys Glu Leu
35 40

15

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

20

<400> 9

Gln Met Glu Asp
1

25

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 10

Gln Glu Glu Asp

ES 2 811 500 T3

<210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintetizado

<400> 11

Glu Glu Glu Gly
1

10 <210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado

15 <400> 12

Ala Ser Ser Cys Arg Cys Pro Gln
1 5

20 <210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado

<400> 13

Ala Ser Ser Cys Arg Phe Pro Glu
1 5

25 <210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintetizado

<400> 14

Ala Ser Ser Cys Arg Phe Pro Gln
1 5

35 <210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado

<400> 15

Ala Ser Ser Cys Arg Ala Pro Ser
1 5

40

ES 2 811 500 T3

<210> 16
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 16

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

10 <210> 17
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

15 <400> 17

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

ES 2 811 500 T3

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
130 135 140

Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg
145 150 155 160

Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser
165 170 175

Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile
180 185 190

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln
195 200 205

Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
210 215 220

Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
225 230 235 240

Ser Ser

<210> 18

<211> 69

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 18

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 Ile Tyr Ile
35 40 45

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
50 55 60

Ile Thr Leu Tyr Cys
65

ES 2 811 500 T3

<210> 19
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 19
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

10 <210> 20
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

15 <400> 20

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

20 <210> 21
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 500 T3

<220>

<223> Sintetizado

<400> 21

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

5

<210> 22

<211> 444

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Sintetizado

<400> 22

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

ES 2 811 500 T3

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
 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 Arg Val Lys Phe
 325 330 335

Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 340 345 350

Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 355 360 365

ES 2 811 500 T3

Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 370 375 380

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 385 390 395 400

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 405 410 415

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 420 425 430

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 435 440

<210> 23
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 23

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

ES 2 811 500 T3

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
 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 Arg Ser Lys Arg
 325 330 335
 Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
 340 345 350
 Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
 355 360 365
 Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
 370 375 380

ES 2 811 500 T3

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
385 390 395 400

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
405 410 415

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
420 425 430

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
435 440 445

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
450 455 460

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
465 470 475 480

Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 24

<211> 486

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 24

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

ES 2 811 500 T3

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
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

ES 2 811 500 T3

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

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> 25

<211> 486

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 25

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

ES 2 811 500 T3

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
 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

ES 2 811 500 T3

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys His Ser Arg
 325 330 335

Lys Lys Phe Val His Leu Leu Lys Arg Pro Phe Ile Lys Thr Thr Gly
 340 345 350

Ala Ala Gln Met Glu Asp Ala Ser Ser Cys Arg Cys Pro Gln Glu Glu
 355 360 365

Glu Gly Glu Cys Asp 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

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> 26

<211> 486

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 26

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

ES 2 811 500 T3

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
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

ES 2 811 500 T3

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 Trp Gly Arg
 325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Leu Phe Lys Arg Pro Phe Ala Gln Pro Ile Arg
 340 345 350

Thr Ala Gln Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 355 360 365

Glu Gly Asn 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

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> 27
 <211> 486
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 27

ES 2 811 500 T3

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
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

ES 2 811 500 T3

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 His Ser Arg
 325 330 335

Lys Lys Ile Ile Phe Leu Tyr Lys Asn Pro Phe Met Lys Pro Thr Asn
 340 345 350

Ser Ala Gln Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Arg Phe Pro Gln Glu Glu
 355 360 365

Glu Gly Asp Cys Asp 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

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> 28
 <211> 486
 <212> PRT

ES 2 811 500 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 28

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
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

ES 2 811 500 T3

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

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Ala Ser Arg
 325 330 335

Lys Lys Ala Ala Ala Ala Lys Ser Pro Phe Ala Ser Pro Ala Ser
 340 345 350

Ser Ala Gln Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Arg Ala Pro Ser Glu Glu
 355 360 365

Glu Gly Ser 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

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

ES 2 811 500 T3

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

5 <210> 29
<211> 7464
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizado

<400> 29

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| 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 | tgcgatgatg | 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 | acccccaaaa | acttgattag | ggtgatgggt | cacgtagtgg | 660 |
| gcatcgcgcc | tgatagacgg | tttttcgccc | tttgacgttg | gagtccacgt | tctttaatag | 720 |
| tggactcttg | ttccaaactg | gaacaacact | caaccctatc | tcggtctatt | cttttgattt | 780 |
| ataagggatt | ttgccgattt | cggcctattg | gttaaaaaat | gagctgattt | aacaaaaatt | 840 |
| taacgcgaat | tttaacaaaa | tattaacggt | tacaatttaa | atatttgctt | atacaatctt | 900 |
| cctgtttttg | gggcttttct | gattatcaac | cggggtacat | atgattgaca | tgctagtttt | 960 |
| acggcgcgcc | gggttgcca | ctccctctct | gcgcgctcgc | tcgctcactg | aggccgggcg | 1020 |
| accaaaggtc | gcccgacgcc | cgggctttgc | ccgggcggcc | tcagtgagcg | agcgagcgcg | 1080 |
| cagagagggg | gtggccaact | ccatcactag | gggttcctac | gcgtagatct | catattctgg | 1140 |
| cagggtcagt | ggctccaact | aacatttggt | tggtacttta | cagtttatta | aatagatggt | 1200 |
| tatatggaga | agctctcatt | tctttctcag | aagagcctgg | ctaggaaggt | ggatgaggca | 1260 |
| ccatattcat | tttgacgggtg | aaattcctga | gatgtaagga | gctgctgtga | cttgctcaag | 1320 |
| gccttatatc | gagtaaacgg | tagcgcctggg | gcttagacgc | aggtgttctg | atztatagtt | 1380 |
| caaacctct | atcaatgaga | gagcaatctc | ctggtaatgt | gatagatttc | ccaacttaat | 1440 |

ES 2 811 500 T3

gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgccccagc ctaagttggg gagaccactc 1500
 cagattccaa gatgtacagt ttgctttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct 1560
 gccagagtta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaaga 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 tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg 2100
 ctgtggcctg gagcaactag tgggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgcgccgttc 2160
 cgaaagtgc cttttatggc tgggcggaga atgggcgggtg aacgccgatg attatataag 2220
 gacgcgccgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc gcggttcttg 2280
 tttgttccgg aaagccacca tggcgctccc agtgacagcc ttacttttac ctctggcggt 2340
 attattgcac gcggctcgtc ctgacataca gatgactcag actacctctt ccctatctgc 2400
 ttcttttaggc gaccgagtaa caatatcttg ccgggccagc caggacatct caaaatactt 2460
 aaactggtat cagcagaagc cggacggaac agttaagttg ctcatthacc acacgtcgag 2520
 attacactca ggcgttcceta gccgatthtc gggttccggt tccggtacgg actacagcct 2580
 gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cgccacctac ttctgtcagc agggcaacac 2640
 gctcccgtac acattcgggtg ggggaactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagcgg 2700
 tggcggcggc agcgggggtg gcggctcggg ggtcaagtta caggagagcg gaccgggctt 2760
 ggtcgcacct agccagagcc tctcagtcac gtgcactgtg tctggagtca gtctcccaga 2820
 ctacggggta tcatggatac gacagccgcc tagaaagggc ttagagtggc tgggggttat 2880
 ctggggaagt gaaaccacat actacaactc agctctcaag agccgcctca ccatcattaa 2940
 ggacaacagt aagtcgcagg ttttcttaa gatgaactct ctccagactg acgacaccgc 3000
 tatttactac tgcgcgaagc actactacta cggcgggagt tacgcaatgg actactgggg 3060
 tcagggcact tctgtgaccg tatccagcac tactacccca gccccacgtc cccccacgcc 3120
 agctccaacg atagcaagtc agcccttate tcttcgccct gaggcttgca ggcccgcggc 3180
 gggcggcggc gttcacacgc gaggactaga cttcgcctgc gacatctaca tctgggcacc 3240
 actagccggg acttgccggag tgttgttgtt gagcttggtataaacgctct actgcaagcg 3300
 tgggagaaaag aagctcttgt acatthtcaa gcagccattc atgcgtcccg ttcagacgac 3360

ES 2 811 500 T3

| | |
|--|------|
| tcaggaggag gacggctgct cgtgccgatt cccggaggag gaggagggcg gttgcgaact | 3420 |
| cagagtgaag ttctctcgct ccgcggaagc acccgcttac cagcagggtc agaaccagct | 3480 |
| atacaacgag ttaaacctgg ggcgcccggg ggagtagcac gtgtagaca agcgtagagg | 3540 |
| tagggacccg gagatgggag gcaagcctcg gagaaagaac ccccaggagg gcctgtacaa | 3600 |
| cgaactccag aaggacaaga tggctgaggg gtactcggag attggtatga agggcgagag | 3660 |
| acgtcgcgga aagggacacg acggcttata ccaggggctt tccaccgca ccaaggacac | 3720 |
| atacgacgcg ctgcacatgc aagccttacc acctcgatga ggtaccagcg gccgcttca | 3780 |
| gcagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa | 3840 |
| aatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacat tataagctgc | 3900 |
| aataaacaag ttaacaacaa caattcgaat ttaaatacga tccgcaacaa atctgacttt | 3960 |
| gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt ccccagccca | 4020 |
| ggtaagggca gctttggtgc ctctgcaggg tgtttccttg cttcaggaat ggccaggttc | 4080 |
| tgcccagagc tctggtcaat gatgtctaaa actcctctga ttggtggtct cggccttctc | 4140 |
| cattgccacc aaaaccctct ttttactaag aaacagttag ccttggtctg gcagtccaga | 4200 |
| gaatgacacg ggaaaaaagc agatgaagag aagggtggcag gagagggcac gtggcccagc | 4260 |
| ctcagtctct ccaactgagt tcttgcctgc ctgcctttgc tcagactggt tgcctcttac | 4320 |
| tgctcttcta ggcctcattc taagcccctt ctccaagttg cctctcctta tttctccctg | 4380 |
| tctgccaaaa aatctttccc agctcaactaa gtcagtctca cgcagtcact cattaaccca | 4440 |
| ccaatcactg attgtgcccg cacatgaatg caccaggtgt tgaagtggag gaattaaaaa | 4500 |
| gtcagatgag ggggtgtgccc agaggaagca ccattctagt tgggggagcc catctgtcag | 4560 |
| ctgggaaaag tccaaataac ttcagattgg aatgtgtttt aactcagggg tgagaaaaca | 4620 |
| gccaccttca ggacaaaagt caggggaaggg ctctctgaag aatgctact tgaagatacc | 4680 |
| agccctacca agggcagggg gaggaaccaat tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg | 4740 |
| ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggag tcgggagacc tttggtcgcc | 4800 |
| cggcctcagt gagcgagcga ggcgcagag agggagtggc caacggcgcg cctgcaggtc | 4860 |
| tcaaaaatag ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt | 4920 |
| gatggtgatt tgactgtctc cggcctttct caccggttg aatctttacc tacacattac | 4980 |
| tcaggcattg catttaaaat atatgagggg tctaaaaatt tttatccttg cgttgaaata | 5040 |
| aaggcttctc ccgcaaaagt attacagggg cataatgttt ttggtacaac cgatttagct | 5100 |
| ttatgctctg aggctttatt gcttaatfff gctaattctt tgccttgccct gtatgattta | 5160 |
| ttggatggtg gaattcctga tgcggatatt tctccttacg catctgtgag gtatttcaca | 5220 |

ES 2 811 500 T3

ccgcataatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg 5280
 acaccgcgca acaccgctg acgcgcctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta 5340
 cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc 5400
 gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatct ttataggta atgtcatgat 5460
 aataatgggt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat 5520
 ttgtttatct ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 5580
 aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcct 5640
 tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa 5700
 agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 5760
 cagcggtaag atccttgaga gttttcggcc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt 5820
 taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg 5880
 tcgcccata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 5940
 tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtgataa 6000
 cactgcggcc aacttactc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt 6060
 gcacaacatg ggggatcatg taactcgctt tgatcgttgg gaaccgggagc tgaatgaagc 6120
 catacacaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa 6180
 actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 6240
 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt ccggctggct ggtttattgc 6300
 tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 6360
 tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 6420
 acgaaataga cagatcgtg agatagggtc ctactgatt aagcattggg aactgtcaga 6480
 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 6540
 ctaggtgaag atcctttttg ataactctcat gaccaaaac ccttaacgtg agttttcgtt 6600
 ccaactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct 6660
 gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc 6720
 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 6780
 aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 6840
 gcctacatac ctcgctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 6900
 gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 6960
 aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 7020
 cctacagcgt gagctatgag aaagcggccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta 7080
 tccggtaagc ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 7140

ES 2 811 500 T3

```

ctggtatcct tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg      7200
atgctcgtca gggggggcga gcctatggaa aaacgccagc aacggggcct ttttacggtt      7260
cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt      7320
ggataaccgt attacgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga      7380
gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc      7440
cgcgcgttgg ccgattcatt aatg                                             7464

```

<210> 30
 <211> 7464
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

```

<400> 30
cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag      60
cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaa atgtaggtat ttccatgagc      120
gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat      180
agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca      240
acggttaatt tgcgtgatgg acagactcct 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 tagcgcgccg tcctttcgct 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 tcgggtctatt cttttgattt      780
ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt acaaaaaatt      840
taacgcgaat ttttaacaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt      900
cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cgggttacat atgattgaca tgctagtttt      960
acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg      1020
accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg      1080
cagagagggg gtggccaact ccatcactag gggttcctac gcgtagatct catattctgg      1140
cagggtcagt ggctccaact aacatttggt tggactttaa cagtttatta aatagatggt      1200

```

ES 2 811 500 T3

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| tatatggaga | agctctcatt | tctttctcag | aagagcctgg | ctaggaaggt | ggatgaggca | 1260 |
| ccatattcoat | tttgcaggtg | aaattcctga | gatgtaagga | gctgctgtga | cttgctcaag | 1320 |
| gccttatatc | gagtaaacgg | tagcgctggg | gcttagacgc | aggtgttctg | atztatagtt | 1380 |
| caaaacctct | atcaatgaga | gagcaatctc | ctggtaatgt | gatagatttc | ccaacttaat | 1440 |
| gccaacatac | cataaacctc | ccattctgct | aatgccacgc | ctaagttggg | gagaccactc | 1500 |
| cagattccaa | gatgtacagt | ttgctttgct | gggccttttt | cccatgcctg | cctttactct | 1560 |
| gccagagtta | tattgctggg | gttttgaaga | agatcctatt | aaataaaaga | ataagcagta | 1620 |
| ttattaagta | gccctgcatt | tcaggtttcc | ttgagtggca | ggccaggcct | ggccgtgaac | 1680 |
| gttcaactgaa | atcatggcct | cttggccaag | attgatagct | tgtgcctgtc | cctgagtcct | 1740 |
| agtccatcac | gagcagctgg | tttctaagat | gctatttccc | gtataaagca | tgagaccgtg | 1800 |
| acttgccagc | cccacagagc | cccgcccttg | tccatcactg | gcatctggac | 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 | tgaggtctat | ggacttcaag | agcaacagtg | 2100 |
| ctgtggcctg | gagcaactag | tgggcggagt | tagggcggag | ccaatcagcg | tgcgcccgtc | 2160 |
| cgaaagttgc | cttttatggc | tgggcggaga | atgggcgggt | aacgccgatg | attatataag | 2220 |
| gacgcgccgg | gtgtggcaca | gctagttccg | tgcagccggg | gatttgggtc | gcggttcttg | 2280 |
| tttgttccgg | aaagccacca | tggcgtccc | agtgacagcc | ttacttttac | ctctggcggt | 2340 |
| attattgcac | gcggtctgtc | ctgacataca | gatgactcag | actacctctt | ccctatctgc | 2400 |
| ttcttttaggc | gaccgagtaa | caatatcttg | ccgggccagc | caggacatct | caaaataactt | 2460 |
| aaactggtat | cagcagaagc | cggacggaac | agttaagttg | ctcatttacc | acacgtcgag | 2520 |
| attacactca | ggcgttcceta | gccgattttc | gggttccggg | tccggtacgg | actacagcct | 2580 |
| gacaatcagt | aaccttgagc | aggaggacat | cgccacctac | ttctgtcagc | agggcaacac | 2640 |
| gctcccgtac | acattcggtg | ggggaactaa | gctggagatt | accggaggcg | gtggcagcgg | 2700 |
| tggcggcggc | agcgggggtg | gcggctcggg | ggtcaagtta | caggagagcg | gaccgggctt | 2760 |
| ggtcgcacct | agccagagcc | tctcagtcac | gtgcactgtg | tctggagtca | gtctcccaga | 2820 |
| ctacggggta | tcatggatac | gacagccgcc | tagaaagggc | ttagagtggc | tgggggttat | 2880 |
| ctgggggaagt | gaaaccacat | actacaactc | agctctcaag | agccgcctca | ccatcattaa | 2940 |
| ggacaacagt | aagtcgcagg | ttttcttaa | gatgaactct | ctccagactg | acgacaccgc | 3000 |
| tatttactac | tgcgcgaagc | actactacta | cggcgggagt | tacgcaatgg | actactgggg | 3060 |
| tcagggcact | tctgtgaccg | tatccagcac | tactacccca | gccccacgtc | ccccacgcc | 3120 |

ES 2 811 500 T3

agctccaacg atagcaagtc agcccttata tcttcgacct gaggtttgca ggcccgcggc 3180
 gggcggcgcc gttcacacgc gaggactaga cttcgcctgc gacatctaca tctgggcacc 3240
 actagccggg acttgccggag tgttggtggt gagcttggtata ataacgctct actgcaaaca 3300
 tagccgcaaa aaatttgtgc atctgctgaa acgcccgttt attaaaacca ccggcgcggc 3360
 gcagatggaa gatgacgagca gctgccgctg cccgcaggaa gaagaaggcg aatgcatct 3420
 gagagtgaag ttctctcgtc ccgcccgcgc acccgttac cagcagggtc agaaccagct 3480
 atacaacgag ttaaacctgg ggcgccggga ggagtacgac gtgttagaca agcgttagagg 3540
 tagggacccg gagatgggag gcaagcctcg gagaaagaac ccccaggagg gcctgtacaa 3600
 cgaactccag aaggacaaga tggctgaggc gtactcggag attggtatga agggcgagag 3660
 acgtcgcgga aaggacacgc acggcttata ccaggggctt tccaccgcga ccaaggacac 3720
 atacgacgcg ctgcacatgc aagccttacc acctogatga ggtaccagcg gccgcttcga 3780
 gcagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa 3840
 aatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc 3900
 aataaacaag ttaacaacaa caattcgaat ttaaatcggga 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 aagggtggcag gagagggcac gtggcccagc 4260
 ctcagtctct ccaactgagt tcctgcctgc ctgcctttgc tcagactggt tgccccttac 4320
 tgctcttcta ggcctcattc taagcccctt ctccaagttg cctctcctta tttctccctg 4380
 tctgcaaaa aatctttccc agctcactaa gtcagttctca cgcagtcact cattaacca 4440
 ccaatcactg attgtgccgg cacatgaatg caccagggtg tgaagtggag gaattaaaaa 4500
 gtcagatgag ggggtgtgcc agaggaagca ccattctagt tgggggagcc catctgtcag 4560
 ctgggaaaag tccaaataac ttcagattgg aatgtgtttt aactcagggt tgagaaaaca 4620
 gccaccttca ggacaaaagt cagggaaggg ctctctgaag aaatgctact tgaagatacc 4680
 agccctacca agggcaggga gaggaccaat tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg 4740
 ctgctcgtc cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcggggcagc tttggtcgcc 4800
 cggcctcagt gagcagcga gcgcgcagag agggagtggc caacggcgcg cctgcaggtc 4860
 tcaaaaatag ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt 4920
 gatggtgatt tgactgtctc cggcctttct caccogtttg aatctttacc tacacattac 4980

ES 2 811 500 T3

tcaggcattg catttaaaat atatgagggt tctaaaaatt tttatccttg cgttgaaata 5040
aaggcttctc cgcgaaaagt attacagggt cataatgttt ttggtacaac cgatttagct 5100
ttatgctctg aggctttatt gcttaatfff gctaattctt tgccttgcct gtatgattta 5160
ttggatgttg gaattcctga tgcggtatff tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca 5220
ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg 5280
acacccgcca acacccgctg acgcgcccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta 5340
cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc 5400
gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatff ttataggtta atgtcatgat 5460
aataatggtt tcttagacgt cagggtggac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat 5520
ttgtttatff ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 5580
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcct 5640
tattccctff tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa 5700
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 5760
cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcactff 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 ccgctttfff 6060
gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 6120
cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaaca cgttgcgcaa 6180
actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 6240
ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggccctt ccggctggct ggtttattgc 6300
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 6360
tggtaaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 6420
acgaaataga cagatcgcctg agatagggtc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 6480
ccaagtffac tcatatatac tttagattga tttaaaaact catttttaat ttaaaaggat 6540
ctaggatgag atcctffffg ataatctcat gaccaaatac ccttaacgtg agttttcgtt 6600
ccactgagcg tcagaccccc tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct 6660
gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc 6720
ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 6780
aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 6840
gcctacatac ctgcctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 6900

ES 2 811 500 T3

gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 6960
aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 7020
cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta 7080
tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 7140
ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg 7200
atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 7260
cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 7320
ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 7380
gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcggga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc 7440
cgcgcgttgg ccgattcatt aatg 7464

<210> 31
<211> 7464
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Sintetizado

<400> 31
cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgag 60
cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaa atgtaggtat ttccatgagc 120
gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
acggttaatt tgctgatgg 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 tagcgcccgc tcctttcgtt ttcttccctt cctttctcgc 540
cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccccttag ggttccgatt 600
tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc ttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 720
tggaactctg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt acaaaaatt 840
taacgcgaat ttttaaaaaa tattaacggt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960

ES 2 811 500 T3

acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggcg 1020
 accaaaggtc 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 tttgcaggtg aaatcctga gatgtaagga gctgctgtga cttgctcaag 1320
 gccttatatc gagtaaacgg tagcgtggg gcttagacgc aggtgttctg atttatagtt 1380
 caaaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagatttc ccaacttaat 1440
 gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgccacgc ctaagttggg gagaccactc 1500
 cagattccaa gatgtacagt ttgctttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct 1560
 gccagagtta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga 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 gcatctggac 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 tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg 2100
 ctgtggcctg gagcaactag tgggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgcgcggttc 2160
 cgaaagttgc cttttatggc tgggcggaga atgggcgggtg aacgccgatg attatataag 2220
 gacgcgcggg gtgtggcaca gctagtccg tcgcagccgg gatttgggtc gcggttcttg 2280
 tttgttccgg aaagccacca tggcgtccc agtgacagcc ttacttttac ctctggcggt 2340
 attattgcac gcggctcgtc ctgacataca gatgactcag actacctctt ccctatctgc 2400
 ttctttaggc gaccgagtaa caatatcttg ccgggccagc caggacatct caaaatactt 2460
 aaactggtat cagcagaagc cggacggaac agttaagttg ctcatctacc acacgtcgag 2520
 attacactca ggcgttcccta gccgattttc gggttccggt tccggtacgg actacagcct 2580
 gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cgccacctac ttctgtcagc agggcaacac 2640
 gctcccgtac acattcggtg ggggaactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagcgg 2700
 tggcggcggc agcgggggtg gcggctcgga ggtcaagtta caggagagcg gaccgggctt 2760
 ggtcgcacct agccagagcc tctcagtcac gtgcactgtg tctggagtca gtctcccaga 2820
 ctacggggta tcatggatac gacagccgcc tagaaagggc ttagagtggc tgggggttat 2880

ES 2 811 500 T3

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 cccccacgcc 3120
 agtccaacg atagcaagtc agcccttata tcttcgccct gaggcttgca ggcccgcggc 3180
 gggcggcgcc gttcacacgc gaggactaga ctctgcctgc gacatctaca tctgggcacc 3240
 actagccggg acttgccggag tgttggtgtt gagcttggtataaacgctct actgcaaagc 3300
 gagccgcaaa aaagcggcgg cggcggcgaa aagcccgttt gcgagcccgg cgagcagcgc 3360
 gcaggaagaa gatgcgagca gctgccgcgc gccgagcgaa gaagaaggca gctgcgaact 3420
 gagagtgaag ttctctcgct ccgccggacgc acccgcttac cagcagggtc agaaccagct 3480
 atacaacgag ttaaacctgg ggcgcgggga ggagtacgac gtgtagaca agcgtagagg 3540
 tagggaccog gagatgggag gcaagcctcg gagaaagaac cccagggagg gcctgtacia 3600
 cgaactccag aaggacaaga tggctgaggc gtactcggag attggtatga agggcgagag 3660
 acgtcgcgga aaggacacg acggcttata ccaggggctt tccaccgca ccaaggacac 3720
 atacgacgag ctgcacatgc aagccttacc acctcgatga ggtaccagcg gccgcttcga 3780
 gcagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa 3840
 aatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacat tataagctgc 3900
 aataaacaag ttaacaacaa caattcgaat ttaaatcgga tccgcaacaa atctgacttt 3960
 gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt cccagccca 4020
 ggtaagggca gctttggtgc ctctgcaggc 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
 tgctottota ggctcattc taagcccctt ctccaagttg cctctcctta tttctccctg 4380
 tctgcaaaa aatctttccc agctcactaa gtcagtctca cgcagtcact cattaacca 4440
 ccaatcactg attgtgccgg cacatgaatg caccagggtg tgaagtggag gaattaaaaa 4500
 gtcagatgag ggggtgtgcc agaggaagca ccattctagt tgggggagcc catctgtcag 4560
 ctgggaaaag tccaataaac ttcagattgg aatgtgtttt aactcagggg tgagaaaaca 4620
 gccaccttca ggacaaaagt caggggaagg ctctctgaag aatgctact tgaagatacc 4680
 agccctacca agggcagggg gaggaccaat tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg 4740

ES 2 811 500 T3

ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc 4800
cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caacggcgcg cctgcaggtc 4860
tcaaaaaatag ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt 4920
gatggtgatt tgactgtctc cggcctttct caccogtttg aatctttacc tacacattac 4980
tcaggcattg catttaaaat atatgagggt tctaaaaatt tttatccttg cgttgaata 5040
aaggcttctc cgcgaaaagt attacagggt cataatgttt ttggtacaac cgatttagct 5100
ttatgctctg aggcctttatt gcttaatttt gctaattctt tgccttgccct gtatgattta 5160
ttggatgttg gaattcctga tgcggtatth tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca 5220
ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg 5280
acacccgcca acacccgctg acgcgcccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta 5340
cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc 5400
gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatth ttataggtha atgtcatgat 5460
aataatggtt tottagacgt cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat 5520
ttgthtattt ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 5580
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct 5640
tattccctth tttgcggcat tttgccttcc tgtthttgct caccagaaa cgctggtgaa 5700
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 5760
cagcggtaag atccttgaga gthttcgccc cgaagaacgt thtccaatga tgagcactth 5820
taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg 5880
tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 5940
tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa 6000
cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctthttt 6060
gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgthtg gaaccggagc tgaatgaagc 6120
cataccaaac gacgagcgtg acaccagat gcctgtagca atggcaaca cgttgcgcaa 6180
actattaact ggcgaaactac ttactctagc thcccggcaa caattaatag actggatgga 6240
ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtthattgc 6300
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 6360
tggtaaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 6420
acgaaataga cagatcgtg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 6480
ccaagthtac tcatatatac thtagattga thtaaaactt cattthtaat thaaaaggat 6540
ctaggtgaag atcctthttg ataatctcat gaccaaatac cthtaacgtg agthttcgth 6600
ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cthththtct 6660

ES 2 811 500 T3

gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtgg tttgtttgcc 6720
 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 6780
 aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 6840
 gcctacatac ctcgctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 6900
 gtgtccttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 6960
 aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 7020
 cctacagcgt gagctatgag aaagcggccac gcttcccga aaggagaaagg cggacaggta 7080
 tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 7140
 ctggtatctt tatagtcttg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttttgtg 7200
 atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 7260
 cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 7320
 ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagacc gaacgaccga 7380
 gcgcagcagc tcagtgagcg aggaagcggga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc 7440
 cgcgcgttgg ccgattcatt aatg 7464

5 <210> 32
 <211> 164
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 32
 gggcggagtt agggcggagc caatcagcgt gcgccgttcc gaaagttgcc ttttatggct 60
 gggcggagaa tgggcgggtga acgccgatga ttatataagg acgcgccggg tgtggcacag 120
 ctagttccgt cgcagccggg atttgggtcg cggttcttgt ttgt 164

10 <210> 33
 <211> 122
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 33
 taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta 60
 tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacat tataagctgc aataacaag 120
 tt 122

20 <210> 34
 <211> 135
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 500 T3

| | | | |
|----|---|-----|--|
| | <220> | | |
| | <223> Sintetizado | | |
| | <400> 34 | | |
| | gatccagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga | 60 | |
| | aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttghtaac cattataagc | 120 | |
| | tgcaataaac aagtt | 135 | |
| 5 | <210> 35 | | |
| | <211> 181 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| 10 | <220> | | |
| | <223> Sintetizado | | |
| | <400> 35 | | |
| | tgagtttggg caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa tgctttattt gtgaaatttg | 60 | |
| | tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat aaacaagtta acaacaacaa | 120 | |
| | ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg gaggtttttt aaagcaagta | 180 | |
| | a | 181 | |
| 15 | <210> 36 | | |
| | <211> 7521 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> Secuencia artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> Sintetizado | | |
| | <400> 36 | | |
| | cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgag | 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 accgttctctg tctaaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt | 360 | |
| | agctcccgct ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata | 420 | |
| | gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac | 480 | |
| | cgctacactt gccagcgcct tagcgcctcgc tcctttcgtc ttcttccctt cctttctcgc | 540 | |
| | cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt | 600 | |
| 20 | tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg | 660 | |

ES 2 811 500 T3

gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 720
 tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
 ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
 taacgcgaat ttttaacaaaa tattaacgct tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
 cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
 acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg 1020
 accaaaggtc 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 ggccgtgaac 1680
 gttcactgaa atcatggcct cttggccaag attgatagct tgtgcctgtc cctgagtcct 1740
 agtccatcac gagcagctgg tttctaagat gctatttccc gtataaagca tgagaccgtg 1800
 acttgccagc cccacagagc cccgcccttg tccatcactg gcatctggac 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 tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg 2100
 ctgtggcctg gagcaactag tgggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgcgccgttc 2160
 cgaaagttgc cttttatggc tgggcggaga atgggcggtg aacgccgatg attatataag 2220
 gacgcgccgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc gcggttcttg 2280
 tttgttccgg aaagccacat ggcgctccca gtgacagcct tacttttacc tctggcgta 2340
 ttattgcacg cggctcgtcc tgacatacag atgactcaga ctacctctc cctatctgct 2400
 tctttaggcg accgagtaac aatatcttgc cgggccagcc aggacatctc aaaatactta 2460
 aactggtatc agcagaagcc ggacggaaca gttaagttgc tcatttacca cacgtcgaga 2520

ES 2 811 500 T3

ttacactcag gcgttcctag ccgattttcg ggttccgggt ccggtacgga ctacagcctg 2580
 acaatcagta accttgagca ggaggacatc gccacctact tctgtcagca gggcaacacg 2640
 ctcccgtaca cattcgggtg gggaactaag ctggagatta ccggaggcgg tggcagcggg 2700
 ggcggcggca gcgggggtgg cggctcggag gtcaagttac aggagagcgg accgggcttg 2760
 gtcgcaccta gccagagcct ctcagtcaag tgcactgtgt ctggagtcag tctcccagac 2820
 tacggggat catggatacg acagccgcct agaaagggt tagagtggct gggggttatc 2880
 tggggaagt aaaccacata ctacaactca gctctcaaga gccgcctcac catcattaag 2940
 gacaacagta agtcgcagg tttcttaaag atgaactctc tccagactga cgacaccgct 3000
 atttactact gcgcgaagca ctactactac ggcgggagtt acgcaatgga ctactgggg 3060
 cagggcactt ctgtgaccgt atccagcact actaccacg cccacgtcc cccacgcca 3120
 gctccaacga tagcaagtca gcccttatct cttcgcctg aggcttgca gcccgcggcg 3180
 ggcggcggcg ttcacacgag aggactagac ttcgcctgag acatctacat ctgggcacca 3240
 ctagccggga cttgcggagt gttgttgttg agcttggtaa taacgctcta ctgcaagcgt 3300
 gggagaaaga agctcttgta cattttcaag cagccattca tgcgtcccgt tcagacgact 3360
 caggaggagg acggctgctc gtgccgattc ccggaggagg aggagggcgg ttgcgaactc 3420
 agagtgaagt tctctcgtc cgcggacgca cccgcttacc agcagggca gaaccagcta 3480
 tacaacgagt taaacctggg gcgccgggag gactacgacg tgtagacaa gcgtagaggt 3540
 agggaaccgg agatgggagg caagcctcgg agaaagaacc cccaggaggg cctgtacaac 3600
 gaactccaga aggacaagat ggctgaggcg tactcggaga ttggtatgaa gggcgagaga 3660
 cgtcgcggaa agggacacga cggcttatac caggggcttt ccaccgcgac caaggacaca 3720
 tacgacgcgc tgcacatgca agcctacca cctcgatgag gtaccagcgg ccgcatcca 3780
 gacatgataa gatacattga tgagtttgg caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa 3840
 tgctttattt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat 3900
 aaacaagtta acaacaaca ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggagggtgtg 3960
 gaggtttttt aaagcaagta aactggtact agtacggatc cgcaacaaat ctgactttgc 4020
 atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac accttcttcc ccagcccagg 4080
 taagggcagc tttggtgcct tcgcaggctg tttccttgct tcaggaatgg ccaggttctg 4140
 cccagagctc tggatcaatga tgtctaaaac tcctctgatt ggtggtctcg gccttatcca 4200
 ttgccaccaa aaccctctt ttactaagaa acagtgagcc ttgttctggc agtccagaga 4260
 atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct 4320
 cagtctctcc aactgagttc ctgcctgcct gcctttgctc agactgtttg ccccttactg 4380
 ctcttctagg cctcattcta agccccttct ccaagttgcc tctccttatt tctccctgtc 4440

ES 2 811 500 T3

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| tgccaaaaaa | tctttcccag | ctcactaagt | cagtctcacg | cagtcactca | ttaaccacc | 4500 |
| aatcactgat | tgtgccggca | catgaatgca | ccaggtggtg | aagtggagga | attaanaagt | 4560 |
| cagatgaggg | gtgtgccag | aggaagcacc | attctagttg | ggggagccca | tctgtcagct | 4620 |
| gggaaaagtc | caaataactt | cagattggaa | tgtgttttaa | ctcaggggtg | agaaaacagc | 4680 |
| caccttcagg | acaaaagtca | gggaagggct | ctctgaagaa | atgctacttg | aagataccag | 4740 |
| ccctaccaag | ggcagggaga | ggaccaattg | atggagttgg | ccactccctc | tctgcgcgct | 4800 |
| cgctcgctca | ctgaggccgc | ccgggcaaag | cccgggcgtc | gggcgacctt | tggtcgcccg | 4860 |
| gcctcagtga | gcgagcgagc | gcgcagagag | ggagtggcca | acggcgcgcc | tgcaggttca | 4920 |
| aaaatagcta | ccctctccgg | catgaattta | tcagctagaa | cggttgaata | tcatattgat | 4980 |
| ggtgatttga | ctgtctccgg | cctttctcac | ccgtttgaat | ctttacctac | acattactca | 5040 |
| ggcattgcat | ttaanaatata | tgagggttct | aaaaatttt | atccttgcg | tgaanaaag | 5100 |
| gcttctcccg | caaaagtatt | acagggctcat | aatgtttttg | gtacaaccga | tttagcttta | 5160 |
| tgctctgagg | ctttattgct | taattttgct | aattctttgc | cttgccctgta | tgatttattg | 5220 |
| gatgttgaa | ttcctgatgc | ggtattttct | ccttacgcat | ctgtgcggtta | tttcacaccg | 5280 |
| catatggtgc | actctcagta | caatctgctc | tgatgccgca | tagttaagcc | agccccgaca | 5340 |
| ccgcacaaca | cccgctgacg | cgccctgacg | ggcttgtctg | ctcccggcat | ccgcttacag | 5400 |
| acaagctgtg | accgtctccg | ggagctgcat | gtgtcagagg | ttttcacctg | catcacggaa | 5460 |
| acgcgcgaga | cgaaagggcc | tcgtgatagc | cctattttta | taggttaatg | tcatgataat | 5520 |
| aatggtttct | tagacgtcag | gtggcacttt | tcggggaaat | gtgcgcggaa | cccctatttg | 5580 |
| tttatttttc | tanaatacatt | caaatatgta | tccgctcatg | agacaataac | cctgataaat | 5640 |
| gcttcaataa | tattgaaaaa | ggaagagtat | gagtattcaa | catttccgtg | tcgcccttat | 5700 |
| tccttttttt | gcggcatttt | gccttccctgt | ttttgctcac | ccagaaacgc | tggtgaaagt | 5760 |
| aaaagatgct | gaagatcagt | tgggtgcacg | agtgggttac | atcgaactgg | atctcaacag | 5820 |
| cggtaagatc | cttgagagtt | ttcgccccga | agaacgtttt | ccaatgatga | gcacttttaa | 5880 |
| agttctgcta | tgtggcgcg | tattatcccg | tattgacgcc | gggcaagagc | aactcggctg | 5940 |
| ccgcatacac | tattctcaga | atgacttgg | tgagtactca | ccagtcacag | aaaagcatct | 6000 |
| tacggatggc | atgacagtaa | gagaattatg | cagtgtctgcc | ataacctga | gtgataacac | 6060 |
| tgcggccaac | ttacttctga | caacgatcgg | aggaccgaag | gagctaaccg | cttttttgca | 6120 |
| caacatgggg | gatcatgtaa | ctcgccttga | tcgttgggaa | ccggagctga | atgaagccat | 6180 |
| accaaacgac | gagcgtgaca | ccacgatgcc | tgtagcaatg | gcaacaacgt | tcgcgaaact | 6240 |
| attaactggc | gaactactta | ctctagcttc | ccggcaacaa | ttaatagact | ggatggaggc | 6300 |

ES 2 811 500 T3

ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggccttccg gctggctggt ttattgctga 6360
 taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg 6420
 taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg 6480
 aatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca 6540
 agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta 6600
 ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca 6660
 ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg 6720
 cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga 6780
 tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa 6840
 tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 6900
 tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 6960
 tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac 7020
 ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 7080
 acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggatacc 7140
 ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg cagcagggag cttccagggg gaaacgcctg 7200
 gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 7260
 ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 7320
 ggctttttgc tggccttttg ctcacatggt ctttctgog ttatcccctg attctgtgga 7380
 taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg 7440
 cagcagatca gtgagcaggg aagcgggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc 7500
 gcgttggccg attcattaat g 7521

<210> 37
 <211> 7464
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 37

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc cttcccaac agttgcgcag 60
 cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120
 gtttttctcg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
 agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
 acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcgggtg gcctcactga ttataaaac 300
 acttctcagg attctggcgt accgttctcg tctaaaatcc ctttaatcgg cctcctgttt 360

ES 2 811 500 T3

agctcccgct ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
 gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tcccttgcgt ttcttccctt cctttctcgc 540
 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt 600
 tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
 gccatcgcgc tgatagacgg tttttcgcgc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 720
 tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
 ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaaatt 840
 taacgcgaat tttaacaaaa tattaacggt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
 cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
 acggcgcgccc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccggggc 1020
 accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 1080
 cagagagggga gtggccaact ccatcactag gggttcctac gcgtagatct catattctgg 1140
 cagggtcagt ggctccaact aacatttggt tggctactta cagtttatta aatagatggt 1200
 tatatggaga agctctcatt tctttctcag aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca 1260
 ccatattcat tttgcaggtg aaattcctga gatgtaagga gctgctgtga cttgctcaag 1320
 gccttatatc gagtaaacgg tagcgcctggg gcttagacgc aggtgttctg atttatagtt 1380
 caaaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagatttc ccaacttaat 1440
 gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgcccagc ctaagttggg gagaccactc 1500
 cagattccaa gatgtacagt ttgctttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct 1560
 gccagagtta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataagcagta 1620
 ttattaagta gccctgcatt tcaggtttcc ttgagtggca ggccaggcct ggccgtgaac 1680
 gttcactgaa atcatggcct cttggccaag attgatagct tgtgcctgtc cctgagtcct 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 tgagggtctat ggacttcaag agcaacagtg 2100
 ctgtggcctg gagcaactag tgggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgcgccgttc 2160
 cgaaagtgc cttttatggc tgggcggaga atgggcgggtg aacgccgatg attatataag 2220

ES 2 811 500 T3

gacgcgcggg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc gcggttcttg 2280
tttgttccgg aaagccacca tggcgtccc agtgacagcc ttacttttac ctctggcggt 2340
attattgcac ggggctcgtc ctgacataca gatgactcag actacctctt ccctatctgc 2400
ttcttttaggc gaccgagtaa caatatcttg cggggccagc caggacatct caaaatactt 2460
aaactggtat cagcagaagc cggacggaac agttaagttg ctcatthacc acacgtcgag 2520
attacactca ggcgttccta gccgattttc gggttccggt tccggtacgg actacagcct 2580
gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cgccacctac ttctgtcagc agggcaacac 2640
gctcccgtac acattcggtg ggggaactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagcgg 2700
tggcggcggc agcgggggtg gcggtcggg ggtcaagtta caggagagcg gaccgggctt 2760
ggtcgcacct agccagagcc tctcagtcac gtgcaactgt tctggagtca gtctcccaga 2820
ctacggggta tcatggatac gacagccgcc tagaaagggc ttagagtggc tgggggttat 2880
ctggggaagt gaaaccacat actacaactc agctctcaag agccgcctca ccatcattaa 2940
ggacaacagt aagtcgcagg ttttcttaa gatgaactct ctccagactg acgacaccgc 3000
tatttactac tgcgcgaagc actactacta cggcgggagt tacgcaatgg actactgggg 3060
tcagggcact tctgtgaccg tatccagcac tactacccca gccccacgtc cccccacgcc 3120
agctccaacg atagcaagtc agcccttacc tcttcgccct gaggcttgca ggcccgcggc 3180
ggcggcgcc gttcacacgc gaggactaga cttcgcctgc gacatctaca tctgggcacc 3240
actagccggg acttgccggag tgttgttgtt gagcttggtataaacgctct actgcaaagc 3300
gagccgcaaa aaagcggcgg cggcggcga aagcccgttt gcgagcccgg cgagcagcgc 3360
gcaggaagaa gatgcgagca gctgccgcgc gccgagcgaa gaagaaggca gctgcgaact 3420
gagagtgaag ttctctcgtc ccgcgacgc acccgcttac cagcagggtc agaaccagct 3480
atacaacgag ttaaactgg ggcgccggga ggagtacgac gtgttagaca agcgtagagg 3540
tagggaccog gagatgggag gcaagcctcg gagaagaac cccagaggg gcctgtacaa 3600
cgaactccag aaggacaaga tggctgaggc gtactcggag attggtatga agggcgagag 3660
acgtcgcgga aaggacacg acggcttata ccaggggctt tccaccgca ccaaggacac 3720
atacgcgog ctgcacatgc aagccttacc acctcgatga ggtaccagcg gccgcttoga 3780
gcagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa 3840
aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaacct tataagctgc 3900
aataaacaag ttaacaaca caattcgaat ttaaatcgga tccgcaaca atctgacttt 3960
gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt cccagccca 4020
ggtaagggca gctttgggtc cttcgcagc tgtttccttg cttcaggaat ggccaggttc 4080
tgcccagagc tctggtcaat gatgtctaaa actcctctga ttggtggtct cggccttacc 4140

ES 2 811 500 T3

cattgccacc aaaaccctct ttttactaag aaacagtgag ccttgttctg gcagtcacaga 4200
gaatgacacg ggaaaaaagc agatgaagag aaggtggcag gagagggcac gtggcccagc 4260
ctcagtctct ccaactgagt tcctgcctgc ctgcctttgc tcagactggt tgccccttac 4320
tgctcttcta ggcctcattc taagcccctt ctccaagttg cctctcetta tttctccctg 4380
tctgccaaaa aatctttccc agctcactaa gtcagtctca cgcagtcact cattaaccca 4440
ccaatcactg attgtgccgg cacatgaatg caccaggtgt tgaagtggag gaattaaaaa 4500
gtcagatgag ggggtgtgcc agaggaagca ccattctagt tgggggagcc catctgtcag 4560
ctgggaaaag tccaaataac ttcagattgg aatgtgtttt aactcagggg tgagaaaaca 4620
gccaccttca ggacaaaagt cagggaaggg ctctctgaag aatgctact tgaagatacc 4680
agccctacca agggcagggg gaggaccaat tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg 4740
ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg tcgggcgacc tttggtcgcc 4800
cggcctcagt gagcgcgca gcgcgcagag agggagtggc caacggcgcg cctgcaggtc 4860
tcaaaaatag ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt 4920
gatggtgatt tgactgtctc cggcctttct caccggtttg aatctttacc tacacattac 4980
tcaggcattg catttaaaat atatgagggg tctaaaaatt tttatccttg cgttgaaata 5040
aaggcttctc ccgcaaaagt attacagggg cataatgttt ttggtacaac cgatttagct 5100
ttatgctctg aggccttatt gcttaatfff gctaattctt tgcoctgcct gtatgattta 5160
ttggatgttg gaattcctga tgcggtatft tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca 5220
ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg 5280
acaccgcca acaccgctg acgcgcctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta 5340
cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc 5400
gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatft ttataggfta atgtcatgat 5460
aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat 5520
ttgtttatft ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 5580
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct 5640
tattccctft tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctgggtgaa 5700
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatogaac tggatctcaa 5760
cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcactft 5820
taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg 5880
tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 5940
tcttacggat ggcattgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa 6000

ES 2 811 500 T3

cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt 6060
 gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 6120
 cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cggtgcgcaa 6180
 actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 6240
 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt ccggctggct ggtttattgc 6300
 tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 6360
 tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 6420
 acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 6480
 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 6540
 ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gacccaaatc ccttaacgtg agttttcgtt 6600
 ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 6660
 gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgc 6720
 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 6780
 aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 6840
 gcctacatac ctgctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 6900
 gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 6960
 aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 7020
 cctacagcgt gagctatgag aaagcggccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta 7080
 tccggtaaagc ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 7140
 ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg 7200
 atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 7260
 cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 7320
 ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cggcgcagcc gaacgaccga 7380
 gcgcagcagag tcagtgagcg aggaagcggga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc 7440
 cgcgcggttg ccgattcatt aatg 7464

<210> 38
 <211> 7523
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 38

cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ctttcccaac agttgocgag 60
 cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgtaggtat ttccatgagc 120

ES 2 811 500 T3

gtttttcctg ttgcaatggc tggcggtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180
 agtttgagtt cttctactca ggcaagtgat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240
 acggttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcgggtg gcctcactga ttataaaaac 300
 acttctcagg attctggcgt accgttctctg tctaaaaatcc ctttaaatcgg cctcctgttt 360
 agctcccgct ctgattctaa cgaggaaagc acgttatatcg tgctcgtcaa agcaaccata 420
 gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcggcg tcctttcgtc 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
 ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
 taacgcgaat ttaacaaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
 cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
 acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg 1020
 accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 1080
 cagagagga gtggccaact ccatcactag gggttcctac gcgtagatct catattctgg 1140
 cagggtcagt ggctccaact aacatttggt tggtacttta cagtttatta aatagatggt 1200
 tatatggaga agctctcatt tctttctcag aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca 1260
 ccatattcat tttgcagtg aaattcctga gatgtaagga gctgctgtga cttgctcaag 1320
 gccttatatc gagtaaacyg tagcgtggg 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
 gccagagta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga 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 gcatctggac tccagcctgg 1860
 gttggggcaa agagggaaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata 1920
 tccagaacct tgaccctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg 1980

ES 2 811 500 T3

tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg 2040
 tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg 2100
 ctgtggcctg gagcaactag tgggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgcgccgttc 2160
 cgaaagtgc cttttatggc tgggcggaga atgggcggtg aacgccgatg attatataag 2220
 gacgcgcggg gtgtggcaca gctagtccg tcgcagccgg gatttgggtc gcggttcttg 2280
 tttgttccgg aaagccacca tggcgtccc agtgacagcc ttacttttac ctctggcggt 2340
 attattgcac gcggctcgtc ctgacataca gatgactcag actacctctt ccctatctgc 2400
 ttcttttaggc gaccgagtaa caatatcttg ccgggccagc caggacatct caaaatactt 2460
 aaactggtat cagcagaagc cggacggaac agttaagttg ctcatttacc acacgtcgag 2520
 attacactca ggcgttcccta gccgattttc gggttccggg tccggtagcg actacagcct 2580
 gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cggcacctac ttctgtcagc agggcaacac 2640
 gctcccgtac acattcggtg ggggaactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagcgg 2700
 tggcggcggc agcgggggtg gcggctcggg ggtcaagtta caggagagcg gaccgggctt 2760
 ggtcgcacct agccagagcc tctcagtcac gtgcaactgt tctggagtca gtctcccaga 2820
 ctacggggta tcatggatac gacagccgcc tagaaagggc ttagagtggc tgggggttat 2880
 ctggggaagt gaaaccacat actacaactc agctctcaag agccgcctca ccatcattaa 2940
 ggacaacagt aagtcgcagg ttttcttaa gatgaactct ctccagactg acgacaccgc 3000
 tatttactac tgcgcgaagc actactacta cggcgggagt tacgcaatgg actactgggg 3060
 tcagggcact tctgtgaccg tatccagcac tactacccca gcccacgtc ccccacgcc 3120
 agctccaacg atagcaagtc agcccttate tcttcgccct gaggcttgea ggcccgcggc 3180
 gggcggcgcc gttcacacgc gaggactaga cttcgcctgc gacatctaca tctgggcacc 3240
 actagccggg acttgccggg tgttgttgtt gagcttggtg ataacgctct actgcaaagc 3300
 gagccgcaaa aaagcggcgg cggcggcgaa aagcccgttt gcgagcccgg cgagcagcgc 3360
 gcaggaagaa gatgagcagc gctgccgcgc gccgagcgaa gaagaaggca gctgccaact 3420
 gagagtgaag ttctctcgtt ccgcggacgc acccgcttac cagcagggtc agaaccagct 3480
 atacaacgag ttaaacctgg gcgcgggga ggagtagcac gtgttagaca agcgtagagg 3540
 tagggaccgg gagatgggag gcaagcctcg gagaaagaac cccagggagg gcctgtacaa 3600
 cgaactccag aaggacaaga tggctgagge gtactcggag attggtatga agggcgagag 3660
 acgtcgcgga aaggacacg acggcttata ccaggggctt tccaccgcga ccaaggacac 3720
 atacgacggg ctgcacatgc aagccttacc acctcagatga ggtaccagcg gccgcgatcc 3780
 agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa 3840
 atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa 3900

ES 2 811 500 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| taaacaagtt | aacaacaaca | attgcattca | ttttatgttt | caggttcagg | gggaggtgtg | 3960 |
| ggaggttttt | taaagcaagt | aaactggtac | tagtacggat | ccgcaacaaa | tctgactttg | 4020 |
| catgtgcaaa | cgccttcaac | aacagcatta | ttccagaaga | caccttcttc | cccagcccag | 4080 |
| gtaagggcag | ctttggtgcc | ttcgcaggct | gtttccttgc | ttcaggaatg | gccaggttct | 4140 |
| gcccagagct | ctggtcaatg | atgtctaaaa | ctcctctgat | tggtggtctc | ggccttatcc | 4200 |
| attgccacca | aaaccctctt | tttactaaga | aacagtgagc | cttgttctgg | cagtccagag | 4260 |
| aatgacacgg | gaaaaaagca | gatgaagaga | aggtggcagg | agagggcacg | tggcccagcc | 4320 |
| tcagtctctc | caactgagtt | cctgcctgcc | tgcctttgct | cagactgttt | gccccttact | 4380 |
| gctcttctag | gcctcattct | aagccccctc | tccaagttgc | ctctccttat | ttctccctgt | 4440 |
| ctgccaaaaa | atctttccca | gctcactaag | tcagtctcac | gcagtcactc | attaaccac | 4500 |
| caatcactga | ttgtgccggc | acatgaatgc | accaggtggt | gaagtggagg | aattaaanaag | 4560 |
| tcagatgagg | ggtgtgcca | gaggaagcac | cattctagtt | gggggagccc | atctgtcagc | 4620 |
| tgggaaaagt | ccaataaact | tcagattgga | atgtgtttta | actcaggggt | gagaaaacag | 4680 |
| ccaccttcag | gacaaaagtc | agggaaagggc | tctctgaaga | aatgctactt | gaagatacca | 4740 |
| gccctaccaa | gggcagggag | aggaccaatt | gatggagttg | gccactccct | ctctgcgcgc | 4800 |
| tcgctcgctc | actgaggccg | cccgggcaaa | gcccgggcgt | cgggcgacct | ttggtcgccc | 4860 |
| ggcctcagtg | agcgagcgag | cgcgagaga | gggagtggcc | aacggcgcg | ctgcaggtct | 4920 |
| caaaaatagc | taccctctcc | ggcatgaatt | tatcagctag | aacggttga | tatcatattg | 4980 |
| atggtgattt | gactgtctcc | ggcctttctc | acccgtttga | atctttacct | acacattact | 5040 |
| caggcattgc | atttaaaata | tatgaggggt | ctaaaaattt | ttatccttgc | gttgaaataa | 5100 |
| aggcttctcc | cgcaaaagta | ttacagggtc | ataatgtttt | tggtacaacc | gatttagctt | 5160 |
| tatgctctga | ggctttattg | cttaattttg | ctaattcttt | gccttgctg | tatgatttat | 5220 |
| tggatgttgg | aattcctgat | gcggtatfff | ctccttacgc | atctgtgcgg | tatttcacac | 5280 |
| cgcataatgg | gcactctcag | tacaatctgc | tctgatgccg | catagttaag | ccagccccga | 5340 |
| caccgcgcaa | caccgctga | cgcgccctga | cgggcttgtc | tgctcccggc | atccgcttac | 5400 |
| agacaagctg | tgaccgtctc | cgggagctgc | atgtgtcaga | ggttttcacc | gtcatcaccg | 5460 |
| aaacgcgcga | gacgaaagg | cctcgtgata | cgcctatfff | tataggttaa | tgtcatgata | 5520 |
| ataatggttt | cttagacgtc | aggtggcact | tttcggggaa | atgtgcgcgg | aaccctatt | 5580 |
| tgtttatfff | tctaaataca | ttcaaataatg | tatccgctca | tgagacaata | accctgataa | 5640 |
| atgcttcaat | aatattgaaa | aaggaagagt | atgagtattc | aacatttccg | tgtcgcctt | 5700 |
| attccctfff | ttgcggcatt | ttgccttctt | gtttttgctc | accagaaac | gctggtgaaa | 5760 |

ES 2 811 500 T3

gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtggggtt acatcgaact ggatctcaac 5820
 agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacggtt ttccaatgat gagcactttt 5880
 aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg cggggcaaga gcaactcgggt 5940
 cgccgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtac agaaaagcat 6000
 cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataacat gatgataac 6060
 actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg 6120
 cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc 6180
 ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa 6240
 ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag 6300
 gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct 6360
 gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat 6420
 ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa 6480
 cgaaatagac agatcgtga gatagtgcc tctactgatta agcattggta actgtcagac 6540
 caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc 6600
 taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc 6660
 cactgagcgt cagaccccgat agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg 6720
 cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg 6780
 gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca 6840
 aatactgtcc ttctagtga gccgtagta gggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg 6900
 cctacatacc tcgctctgct aatcctgta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg 6960
 tgtcttaccg ggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga 7020
 acgggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac 7080
 ctacagcgtg agctatgaga aagcgcacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat 7140
 ccggtaaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc 7200
 tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga 7260
 tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcgccctt tttacggttc 7320
 ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg 7380
 gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag 7440
 cgcagcagat cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc 7500
 gcgcgttggc cgattcatta atg 7523

ES 2 811 500 T3

<211> 172
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sintetizado

<400> 39

Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg
 20 25 30

Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr
 35 40 45

Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu
 50 55 60

Glu Thr Gln Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly
 65 70 75 80

Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Asp Leu Leu Thr Lys Leu
 85 90 95

Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp
 100 105 110

Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Glu Ala Glu Lys Pro
 115 120 125

Leu Gln Val Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu
 130 135 140

Ala Gly Ile Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly His Met Pro Glu Arg
 145 150 155 160

Phe Asp Ala Phe Ile Cys Tyr Cys Pro Ser Asp Ile
 165 170

10 <210> 40
 <211> 8044
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 40
 cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttccaac agttgcccag 60

15

ES 2 811 500 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
 agctcccgt ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
 gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgccgc tcttttcgct ttcttcctt cctttctcgc 540
 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttag ggttccgatt 600
 tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
 gccatcgcgc tgatagacgg ttttctgccc ttgacggtg gagtccacgt tctttaatag 720
 tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
 ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
 taacgcgaat ttttaacaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
 cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtacat atgattgaca tgctagtttt 960
 acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg 1020
 accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgcgcgcg 1080
 cagagagga gtggccaact ccatcactag gggttcctac gcgtagatct catattctgg 1140
 cagggtcagt ggctccaact aacatttgtt tggacttta cagtttatta aatagatgtt 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 gagaccctc 1500
 cagattccaa gatgtacagt ttgctttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct 1560
 gccagagtta tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga 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 cccgccttg tccatcactg gcactctggac tccagcctgg 1860
 gttggggcaa agagggaaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata 1920
 tccagaacct tgaccctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg 1980

ES 2 811 500 T3

tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg 2040
 tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggctctat ggacttcaag agcaacagtg 2100
 ctgtggcctg gagcaactag tgggcgaggt tagggcgag ccaatcagcg tgcgccgttc 2160
 cgaaagttgc cttttatggc tgggcgagga atgggcggtg aacgccgatg attatataag 2220
 gacgcgccgg gtgtggcaca gctagttccg tgcgagccgg gatttgggtc gcggttcttg 2280
 tttgttccgg aaagccacca tggcgctccc agtgacagcc ttacttttac ctctggcggt 2340
 attattgcac gcggtcgtc ctgacataca gatgactcag actacctctt ccctatctgc 2400
 ttcttttaggc gaccgagtaa caatatcttg ccgggcccagc caggacatct caaataactt 2460
 aaactggtat cagcagaagc cggacggaac agttaagttg ctcatctacc acacgtcgag 2520
 attacactca ggcgttccta gccgattttc gggttccggt tccggtacgg actacagcct 2580
 gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cgccacctac ttctgtcagc agggcaacac 2640
 gctcccgtac acattcgggtg ggggaactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagcgg 2700
 tggcggcggc agcgggggtg gcggtcggga 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 aagtgcagc ttttcttaa gatgaactct ctccagactg acgacaccgc 3000
 tatttactac tgcgcgaagc actactacta cggcgggagt tacgcaatgg actactgggg 3060
 tcagggcaact tctgtgaccg tatccagcac tactacccca gcccacgtc ccccacgcc 3120
 agctccaacg atagcaagtc agcccttacc tcttcgccct gaggcttgca ggcccgcggc 3180
 gggcggcgcc gttcacacgc gaggactaga cttcgcctgc gacatctaca tctgggcacc 3240
 actagccggg acttgccgag tgttgttgtt gagcttggtg ataacgctct actgcatggc 3300
 tgcaggaggt cccggcgcgg ggtctgcggc cccggtctcc tccacatcct cccttcccct 3360
 ggctgctctc aacatgcgag tgcggcgccg cctgtctctg ttcttgaacg tgcggacaca 3420
 ggtggcggcc gactggaccg cgctggcgga ggagatggac tttgagtact tggagatccg 3480
 gcaactggag acacaagcgg accccactgg caggctgctg gacgcctggc agggacgccc 3540
 tggcgcctct gtaggccgac tgctcgatct gcttaccaag ctgggcccgc acgacgtgct 3600
 gctggagctg ggaccagca ttgaggagga ttgccaaaag tatacttga agcagcagca 3660
 ggaggaggct gagaagcctt tacaggtggc cgctgtagac agcagtgctc cacggacagc 3720
 agagctggcg ggcacacca cacttgatga cccctgggg catatgcctg agcgtttcga 3780
 tgccttcac tgcattgcc ccagcgacat cgtcgagaaa gcgagccgca aaaaagcggc 3840

ES 2 811 500 T3

ggcggcggcg aaaagcccgt ttgcgagccc ggcgagcagc ggcgaggaag aagatgagag 3900
 cagctgccgc gcgccgagcg aagaagaagg cagctgcgaa ctgagagtga agttctctcg 3960
 ctccgcggac gcacccgctt accagcaggg tcagaaccag ctatacaacg agttaaacct 4020
 ggggcgcccg gaggagtacg acgtgttaga caagcgtaga ggtagggacc cggagatggg 4080
 aggcaagcct cggagaaaga acccccagga gggcctgtac aacgaactcc agaaggacaa 4140
 gatggctgag gcgtactcgg agattggtat gaagggcgag agacgtcgcg gaaagggaca 4200
 cgacggctta taccaggggc tttccaccgc gaccaaggac acatacgacg cgctgcacat 4260
 gcaagcctta ccacctcgat gaggtaccag cggcccgcat ccagacatga taagatacat 4320
 tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat 4380
 ttgtgatgct attgctttat ttgtaacctat tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa 4440
 caattgcatt cattttatgt ttcaggttca gggggaggtg tgggaggttt ttaaaagcaa 4500
 gtaaactggt actagtacgg atccgcaaca aatctgactt tgcatgtgca aacgccttca 4560
 acaacagcat tattccagaa gacaccttct tcccagccc aggtaagggc agctttggtg 4620
 ccttcgcagc ctgtttcctt gcttcaggaa tggccaggtt ctgccagag ctctggtcaa 4680
 tgatgtctaa aactcctctg attggtggtc tcggccttat ccattgccac caaaacctc 4740
 ttttactaa gaaacagtga gccttgttct ggcagtccag agaatgacac gggaaaaaag 4800
 cagatgaaga gaaggtggca ggagagggca cgtggcccag cctcagtctc tccaactgag 4860
 ttctgcctg cctgcctttg ctcagactgt ttgcccctta ctgctcttct aggcctcatt 4920
 ctaagcccct tctccaagtt gcctctcctt atttctccct gtctgcaaaa aaatctttcc 4980
 cagctcacta agtcagtctc acgcagtcac tcattaacct accaatcact gattgtgccg 5040
 gcacatgaat gcaccaggtg ttgaagtga ggaattaaag agtcagatga ggggtgtgcc 5100
 cagaggaagc accattctag ttgggggagc ccatctgtca gctgggaaaa gtccaaataa 5160
 cttcagattg gaatgtgttt taactcaggg ttgagaaaac agccacctc aggacaaaag 5220
 tcaggaagc gctctctgaa gaaatgctac ttgaagatac cagccctacc aagggcaggg 5280
 agaggaccaa ttgatggagt tggccactcc ctctctcgcg gctcgtcgc tactgaggc 5340
 cccccgggca aagcccgggc gtcgggcgac ctttggctgc cggcctcag tgagcgagcg 5400
 agcgcgcaga gagggagtgg ccaacggcgc gcctgcaggt tcaaaaatag ctacctctc 5460
 cggcatgaat ttatcagcta gaacggttga atatcatatt gatggtgatt tgactgtctc 5520
 cggcctttct caccogtttg aatctttacc tacacattac tcaggcattg catttaaaat 5580
 atatgagggc tctaaaaatt tttatccttg cgttgaaata aaggcttctc ccgcaaaagt 5640
 attacagggc cataatgttt ttggtacaac cgatttagct ttatgctctg aggttttatt 5700
 gcttaatttt gctaattctt tgccttgcct gtatgattta ttggatgttg gaattcctga 5760

ES 2 811 500 T3

| | | | | | | | | |
|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| tgcggtat | ttt | tctccttacg | catctgtg | cg | gtatttcaca | ccgcatatgg | tgcactctca | 5820 |
| gtacaatctg | ctctgatgcc | gcatagttaa | gccagccccg | acaccgcca | acaccgctg | | | 5880 |
| acgcgcctg | acgggcttgt | ctgctcccgg | catccgctta | cagacaagct | gtgaccgtct | | | 5940 |
| ccgggagctg | catgtgtcag | aggttttcac | cgatcatcacc | gaaacgcgcg | agacgaaagg | | | 6000 |
| gcctcgtgat | acgcctat | ttataggtta | atgtcatgat | aataatgggt | tcttagacgt | | | 6060 |
| caggtggcac | ttttcgggga | aatgtgcgcg | gaaccctat | ttgtttat | ttctaaatac | | | 6120 |
| attcaaata | gtatccgctc | atgagacaat | aacctgata | aatgcttcaa | taatattgaa | | | 6180 |
| aaaggaagag | tatgagtatt | caacatttcc | gtgtgcacct | tattccctt | tttgcggcat | | | 6240 |
| tttgccttcc | tgtttttgct | caccagaaa | cgctggtgaa | agtaaaagat | gctgaagatc | | | 6300 |
| agttgggtgc | acgagtgggt | tacatcgaac | tggatctcaa | cagcggtaag | atccttgaga | | | 6360 |
| gttttcgccc | cgaagaacgt | tttccaatga | tgagcacttt | taaagtctg | ctatgtggcg | | | 6420 |
| cggtattatc | ccgtattgac | gccgggcaag | agcaactcgg | tcgccgcata | cactattctc | | | 6480 |
| agaatgactt | ggttgagtac | tcaccagtca | cagaaaagca | tcttacggat | ggcatgacag | | | 6540 |
| taagagaatt | atgcagtgct | gccataacca | tgagtgataa | cactgcggcc | aacttacttc | | | 6600 |
| tgacaacgat | cggaggaccg | aaggagctaa | ccgctttttt | gcacaacatg | ggggatcatg | | | 6660 |
| taactcgcct | tgatcgttgg | gaaccggagc | tgaatgaagc | cataccaaac | gacgagcgtg | | | 6720 |
| acaccacgat | gcctgtagca | atggcaacaa | cgttgcgcaa | actattaact | ggcgaactac | | | 6780 |
| ttactctagc | ttcccggcaa | caattaatag | actggatgga | ggcggataaa | gttgcaggac | | | 6840 |
| cacttctg | ctcggccctt | ccggctggct | ggtttattgc | tgataaatct | ggagccgggtg | | | 6900 |
| agcgtgggtc | tcgcggtatc | attgcagcac | tggggccaga | tggttaagccc | tcccgtatcg | | | 6960 |
| tagttatcta | cacgacgggg | agtcaggcaa | ctatggatga | acgaaataga | cagatcgctg | | | 7020 |
| agataggtgc | ctcactgatt | aagcattgggt | aactgtcaga | ccaagtttac | tcatatatac | | | 7080 |
| tttagattga | tttaaaactt | catttttaat | ttaaaaggat | ctaggtgaag | atcctttttg | | | 7140 |
| ataatctcat | gaccaaatac | ccttaacgtg | agttttcggt | ccactgagcg | tcagacccccg | | | 7200 |
| tagaaaagat | caaaggatct | tcttgagatc | ctttttttct | gcgcgtaatc | tgctgcttgc | | | 7260 |
| aaacaaaaaa | accaccgcta | ccagcgggtg | tttgtttgcc | ggatcaagag | ctaccaactc | | | 7320 |
| tttttccgaa | ggtaactggc | ttcagcagag | cgcagatacc | aaatactgtc | cttctagtgt | | | 7380 |
| agccgtagtt | aggccaccac | ttcaagaact | ctgtagcacc | gcctacatac | ctcgcctctgc | | | 7440 |
| taatcctggt | accagtggct | gctgccagtg | gcgataagtc | gtgtcttacc | gggttgact | | | 7500 |
| caagacgata | gttaccggat | aaggcgcagc | ggtcgggctg | aacgggggggt | tcgtgcacac | | | 7560 |
| agcccagctt | ggagcgaacg | acctacaccg | aactgagata | cctacagcgt | gagctatgag | | | 7620 |

ES 2 811 500 T3

aaagcgccac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggctg 7680
 gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg 7740
 tggggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga 7800
 gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt 7860
 ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct 7920
 ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 7980
 aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt 8040
 aatg 8044

<210> 41
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 41

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

ES 2 811 500 T3

Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly
 145 150 155 160

Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala Gln Met Ser
 165 170 175

Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly
 180 185 190

Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr Leu Val Phe
 195 200 205

Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu
 210 215

<210> 42
 <211> 7760
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintetizado

<400> 42
 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 cttaaatcgg cctcctgttt 360
 agctcccgt ctgattctaa cgaggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata 420
 gtacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480
 cgctacactt gccagcggc tagcggccgc tcctttcgtt ttcttccctt cctttctcgc 540
 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttag ggttccgatt 600
 tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 660
 gccatcgccc tgatagacgg tttttcggcc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 720
 tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 780
 ataagggtt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840
 taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgct tacaatttaa atatttgctt atacaatctt 900
 cctgtttttg gggcttttct gattatcaac cggggtagat atgattgaca tgctagtttt 960
 acggcgcgcc gggttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg 1020

ES 2 811 500 T3

accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 1080
 cagagagggg gtggccaact ccatcactag gggttcctac gcgtagatct catcacgagc 1140
 agctggtttc taagatgcta tttcccgtat aaagcatgag accgtgactt gccagcccca 1200
 cagagccccg cccttgtcca tctactggcat ctggactcca gcctgggttg gggcaaagag 1260
 ggaaatgaga tcatgtccta accctgatcc tcttgtccca cagatatcca gaacctgac 1320
 cctgccgtgt accagctgag agactctaaa tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc 1380
 gatthttgatt ctcaaacaaa tgtgtcacia agtaaggatt ctgatgtgta tatcacagac 1440
 aaaactgtgc tagacatgag gtctatggac ttcaagagca acagtgtctg gccctggagc 1500
 aactagtggg cggagttagg gcggagccaa tcagcgtgcg ccgttccgaa agttgccttt 1560
 tatggctggg cggagaatgg gcggtgaacg ccgatgatta tataaggacg cgccgggtgt 1620
 ggcacagcta gttccgtcgc agccgggatt tgggtcgcgg ttcttgtttg ttccctcgag 1680
 ccaccatggc tgcaggaggt cccggcgcgg ggtctgcggc cccggtctcc tccacatcct 1740
 cccttcccct ggctgctctc aacatgcgag tgcggcgccg cctgtctctg ttcttgaacg 1800
 tgcggacaca ggtggcggcc gactggaccg cgctggcgga ggagatggac tttgagtact 1860
 tggagatccg gcaactggag acacaagcgg accccactgg caggctgctg gacgcctggc 1920
 agggacgccc tggcgcctct gtaggccgac tgctcgatct gcttaccaag ctgggcccgg 1980
 acgacgtgct gctggagctg ggaccagca ttgaggagga ttgccaaaag tatatcttga 2040
 agcagcagca ggaggaggct gagaagcctt tacaggtggc cgctgtagac agcagtgtcc 2100
 cacggacagc agagctggcg ggcatcacca cacttgatga ccccctgggg catatgcctg 2160
 agcgtttoga tgccttcata tgctattgcc ccagcgacat cgtcgagaaa gcgagccgca 2220
 aaaaagcggc ggcggcggcg aaaagcccgt ttgcgagccc ggcgagcagc gcgcaggaag 2280
 aagatgcgag cagctgccgc gcgccgagcg aagaagaagg cagctgcgaa ctggtcgagg 2340
 gcgtccaagt cgaaaccatt agtcccggcg atggcagaac atttcctaaa aggggacaaa 2400
 catgtgtcgt ccattataca ggcatgttgg aggacggcaa aaaggtggac agtagtagag 2460
 atcgcaataa acctttcaaa ttcattgttg gaaaacaaga agtcattagg ggatgggagg 2520
 agggcgtggc tcaaagtcc gtcggccaac gcgctaagct caccatcagc cccgactacg 2580
 catacggcgc taccggacat cccggaatta ttccccctca cgctaccttg gtgtttgacg 2640
 tcgaactggt gaagctcgaa gtcgaggag tgcaggtgga gactatctcc ccaggagacg 2700
 ggcgcacctt ccccaagcgc ggccagacct gcgtggtgca ctacaccggg atgcttgaag 2760
 atggaaagaa agttgattcc tcccgggaca gaaacaagcc ctttaagttt atgctaggca 2820
 agcaggagggt gatccgaggc tgggaagaag gggttgccca gatgagtgtg ggtcagagag 2880
 ccaaactgac tatactcca gattatgcct atggtgccac tgggcacca gccatcatcc 2940

ES 2 811 500 T3

caccacatgc cactctcgtc ttcgatgtgg agcttctaaa actggaaccg cgggaaggcc 3000
gagggagcct gctgacatgt ggcgatgtgg aggaaaacc aggaccacca tggatggcgc 3060
tcccagtgac agccttactt ttacctctgg cgttattatt gcacgcggct cgtcctgaca 3120
tacagatgac tcagactacc tcttccctat ctgcttcttt aggcgaccga gtaacaatat 3180
cttgccgggc cagccaggac atctcaaaat acttaaactg gtatcagcag aagccggacg 3240
gaacagttaa gttgctcatt taccacacgt cgagattaca ctcaggcggt cctagccgat 3300
tttcgggttc cggttccggg acggactaca gcctgacaat cagtaacctt gagcaggagg 3360
acatcgccac ctacttctgt cagcagggca acacgctccc gtacacattc ggtgggggaa 3420
ctaagctgga gattaccgga ggcggtggca gcggtggcgg cggcagcggg ggtggcggct 3480
cggaggtcaa gttacaggag agcggaccgg gcttggctgc acctagccag agcctctcag 3540
tcacgtgcac tgtgtctgga gtcagtctcc cagactacgg ggtatcatgg atacgacagc 3600
cgcctagaaa gggcttagag tggctggggg ttatctgggg aagtgaacc acatactaca 3660
actcagctct caagagccgc ctcacatca ttaaggacaa cagtaagtcg caggttttct 3720
taaagatgaa ctctctccag actgacgaca ccgctattta ctactgcgcg aagcactact 3780
actacggcgg gagttacgca atggactact ggggtcaggg cacttctgtg accgtatcca 3840
gcactactac cccagccccca cgtccccca cgcagctcc aacgatagca agtcagccct 3900
tatctcttcg ccctgaggct tgcaggcccg cggcggggcg cgccttcac acgcgaggac 3960
tagacttcgc ctgcgacatc tacatctggg caccactagc cgggacttgc ggagtgttgt 4020
tgttgagctt ggtaataacg ctctactgca gagtgaagtt ctctcgtcc gcggacgcac 4080
ccgcttacca gcagggtcag aaccagctat acaacgagtt aaacctgggg cgcggggagg 4140
agtacgacgt gttagacaag cgtagaggta gggaccgga gatgggaggc aagcctcgga 4200
gaaagaacc caggaggggc ctgtacaacg aactccagaa ggacaagatg gctgaggcgt 4260
actcggagat tggatgaag ggcgagagac gtcgcgga aaggacacgac ggcttatacc 4320
aggggctttc caccgcgacc aaggacacat acgacgcgct gcacatgcaa gccttaccac 4380
ctcgatgagg taccagcgcg gcccgatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg 4440
aaaaccaca actagaatgc agtgaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat 4500
tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca 4560
ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt taaagcaagt aaactggtac 4620
tagtacggat ccgcaacaaa tctgactttg catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta 4680
ttccagaaga caccttcttc cccagcccag gtaagggcag ctttgggtgcc ttcgcaggct 4740
gtttccttgc ttcaggaatg gccaggttct gccagagct ctggtcaatg atgtctaaaa 4800

ES 2 811 500 T3

ctctctgat tgggtgtctc ggccttatcc attgccacca aaaccctctt tttactaaga 4860
 aacagtgagc cttgttctgg cagtccagag aatgacacgg gaaaaagca gatgaagaga 4920
 aggtggcagg agagggcagc tggcccagcc tcagtctctc caactgagtt cctgcctgcc 4980
 tgcctttgct cagactgttt gcccaattga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc 5040
 gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctt ggtcgcccgg 5100
 cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagggtccaa cggcgcgccct gcaggttcaa 5160
 aatagctac cctctccggc atgaatttat cagctagaac ggttgaatat catattgatg 5220
 gtgattgac tgtctccggc ctttctcacc cgtttgaatc tttacctaca cattactcag 5280
 gcattgcatt taaaatata gagggttcta aaaattttta tccttgcggt gaaataaagg 5340
 cttctcccgc aaaagtatta cagggtcata atgtttttgg tacaaccgat ttagctttat 5400
 gctctgaggc tttattgctt aattttgcta attctttgcc ttgcctgtat gatttattgg 5460
 atgttgaat tcctgatgcg gtatctctc cttacgcac tgtgcggtat ttcacaccgc 5520
 atatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgat agttaagcca gccccgacac 5580
 ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga 5640
 caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt tttcaccgtc atcaccgaaa 5700
 cgcgcgagac gaaagggcct cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata 5760
 atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 5820
 ttatctctc aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 5880
 cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt 5940
 cccttttttg cggcattttg ctttctgctt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta 6000
 aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc 6060
 ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cacttttaaa 6120
 gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccc ggcaagagca actcggtcgc 6180
 cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 6240
 acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taacatgag tgataaact 6300
 gcgccaact tacttctgac aacgatcggg gaccggaagg agctaaccgc ttttttgac 6360
 aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata 6420
 ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaacta 6480
 ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg 6540
 gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggt tattgctgat 6600
 aatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt 6660
 aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga 6720

ES 2 811 500 T3

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| aatagacaga | tcgctgagat | aggtgcctca | ctgattaagc | attggtaact | gtcagaccaa | 6780 |
| gtttactcat | atatacttta | gattgattta | aaacttcatt | ttaatttaa | aaggatctag | 6840 |
| gtgaagatcc | tttttgataa | tctcatgacc | aaaatccctt | aacgtgagtt | ttcgttccac | 6900 |
| tgagcgtcag | accccgtaga | aaagatcaaa | ggatcttctt | gagatccttt | ttttctgcgc | 6960 |
| gtaatctgct | gcttgcaaac | aaaaaaacca | ccgctaccag | cggtggtttg | tttgccggat | 7020 |
| caagagctac | caactctttt | tccgaaggta | actggcttca | gcagagcgca | gataccaaat | 7080 |
| actgtccttc | tagtgtagcc | gtagttaggc | caccacttca | agaactctgt | agcaccgcct | 7140 |
| acatacctcg | ctctgctaata | cctgttacca | gtggctgctg | ccagtggcga | taagtctgtg | 7200 |
| cttaccgggt | tggactcaag | acgatagtta | ccggataaag | cgcagcggtc | gggctgaacg | 7260 |
| gggggttcgt | gcacacagcc | cagcttggag | cgaacgacct | acaccgaact | gagataccta | 7320 |
| cagcgtgagc | tatgagaaaag | cgccacgctt | cccgaaggga | gaaaggcggga | caggtatccg | 7380 |
| gtaagcggca | gggtcggaac | aggagagcgc | acgagggagc | ttccaggggg | aaacgcctgg | 7440 |
| tatctttata | gtcctgtcgg | gtttcgccac | ctctgacttg | agcgtcgatt | tttgtgatgc | 7500 |
| tcgtcagggg | ggcggagcct | atggaaaaac | gccagcaacg | cggccttttt | acggttcctg | 7560 |
| gccttttgct | ggccttttgc | tcacatgttc | tttctctgct | tatcccctga | ttctgtggat | 7620 |
| aaccgtatta | ccgcctttga | gtgagctgat | accgctcgcc | gcagccgaac | gaccgagcgc | 7680 |
| agcagatcag | tgagcgagga | agcgggaagag | cgcccaatac | gcaaaccgcc | tctccccgcg | 7740 |
| cgttggccga | ttcattaatg | | | | | 7760 |

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.
- 5 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende dicho dominio coestimulador.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2, en la que dicho CAR comprende un dominio de señalización intracelular ζ de CD3.
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que dicho CAR comprende un dominio transmembrana alfa de CD8.
- 10 5. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en la que dicho CAR comprende un dominio de unión a antígeno específico de CD19.
6. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en la que dicho CAR comprende la SEQ ID NO: 28.
- 15 7. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha molécula de ácido nucleico es un ARNm, una construcción de ADN recombinante o un genoma vírico de un vector vírico.
8. Una construcción de ADN recombinante que comprende dicha molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
9. La construcción de ADN recombinante de la reivindicación 8, en la que dicha construcción de ADN recombinante codifica un vector vírico, en la que dicho vector vírico comprende dicha molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, preferentemente en la que dicho vector vírico es un vector vírico adenoasociado (VAA) recombinante.
- 20 10. Un vector vírico que comprende dicha molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, preferentemente en la que dicho vector vírico es un vector VAA recombinante.
11. Un linfocito T humano genéticamente modificado que comprende en su genoma un casete de expresión que comprende dicha molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 25 12. Un procedimiento de producción de un linfocito T humano genéticamente modificado que comprende un CAR, comprendiendo dicho procedimiento introducir en un linfocito T humano dicha molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6 usando un vector vírico.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicho procedimiento comprende además introducir en dicho linfocito T humano una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una nucleasa diseñada mediante ingeniería genética, en el que dicha nucleasa diseñada mediante ingeniería genética se expresa en dicha célula, y en el que dicha nucleasa diseñada mediante ingeniería genética reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento en el genoma de dicha célula para producir un sitio de escisión, y en el que dicha molécula de ácido nucleico que codifica dicho CAR se inserta en el genoma de dicho linfocito T humano en dicho sitio de escisión.
- 30 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que dicha nucleasa diseñada mediante ingeniería genética es una meganucleasa diseñada mediante ingeniería genética, una nucleasa de dedo de zinc recombinante (ZEN), una nucleasa efectora de tipo activador de la transcripción recombinante (TALEN), una nucleasa CRISPR/Cas, o una nucleasa megaTAL.
15. El procedimiento de las reivindicaciones 13 o 14, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende secuencias homólogas a las secuencias que flanquean dicho sitio de escisión, de tal manera que dicha molécula de ácido nucleico se inserta en el genoma de dicha célula en dicho sitio escisión mediante recombinación homóloga.
- 40 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que dicha molécula de ácido nucleico que codifica dicho CAR se introduce en dicho linfocito T humano usando un vector VAA recombinante.
17. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y dicho linfocito T humano genéticamente modificado de la reivindicación 11.
- 45 18. Un linfocito T humano genéticamente modificado de la reivindicación 11 para su uso en un procedimiento de inmunoterapia para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita.
19. El linfocito T humano genéticamente modificado para el uso de la reivindicación 18, en el que dicho cáncer es un carcinoma, linfoma, sarcoma, blastoma o leucemia, preferentemente en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de origen de linfocitos B, tal como leucemia linfoblástica aguda de linaje B, leucemia
- 50

ES 2 811 500 T3

linfocítica crónica de linfocitos B y linfoma no Hodgkin 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; rhabdomyosarcoma; leucemia; y linfoma de Hodgkin.

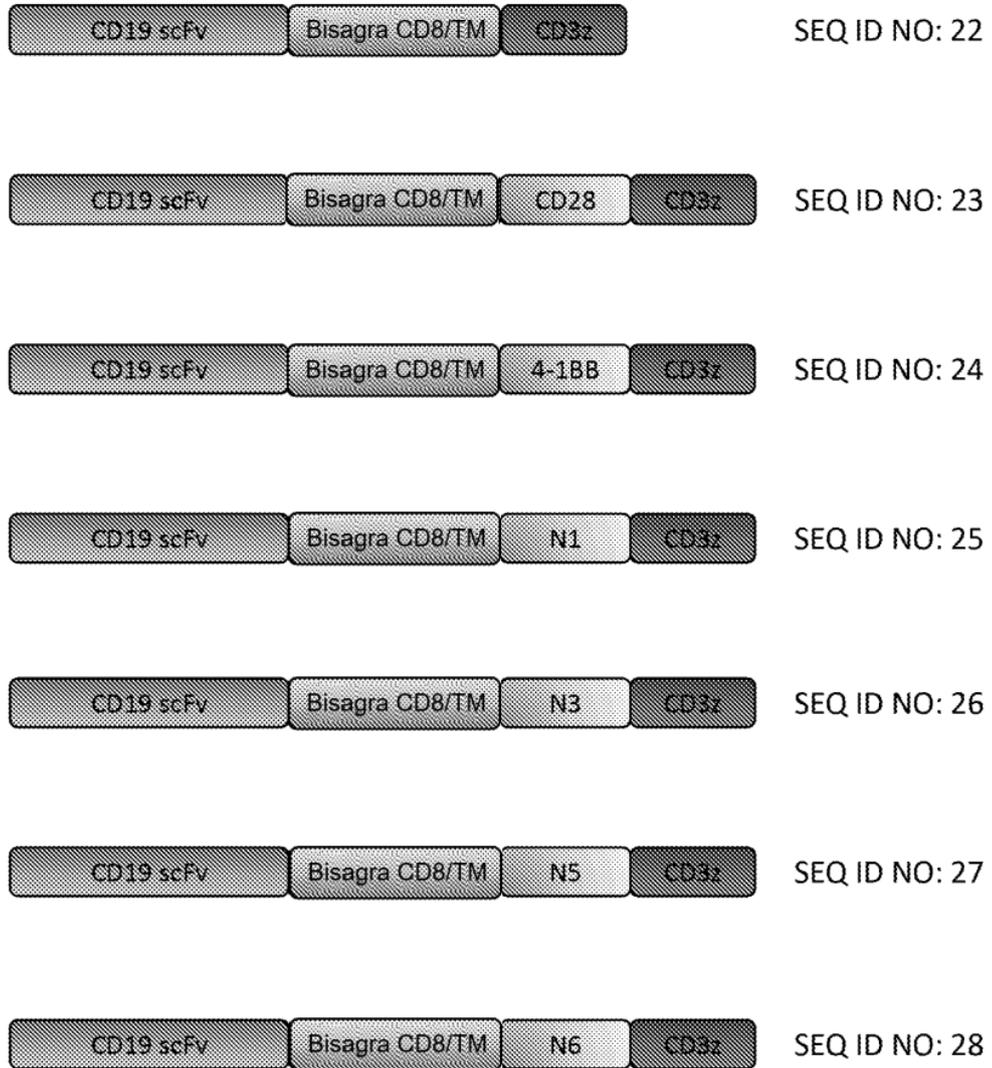


FIGURA 2

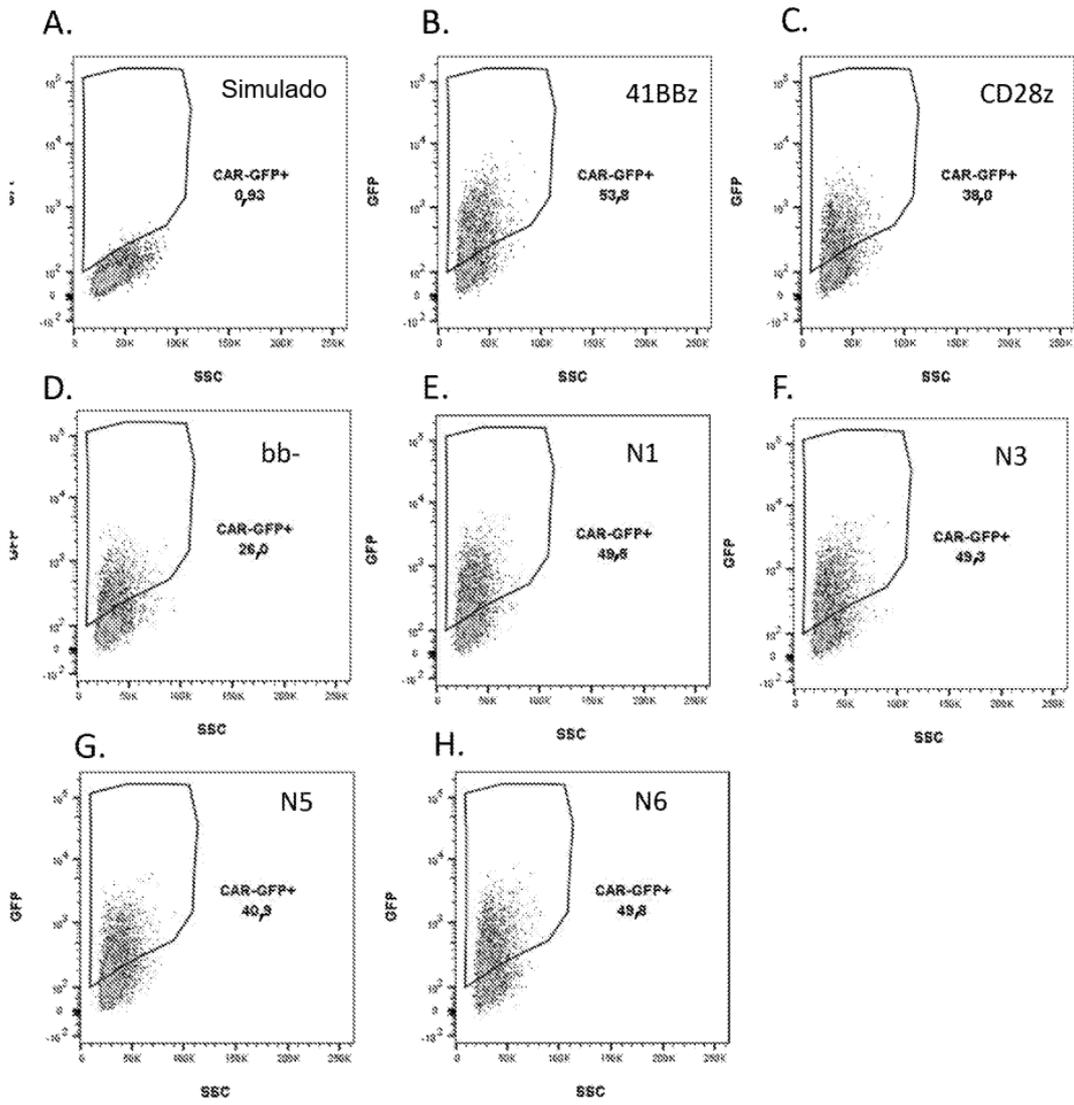


FIGURA 3

A.

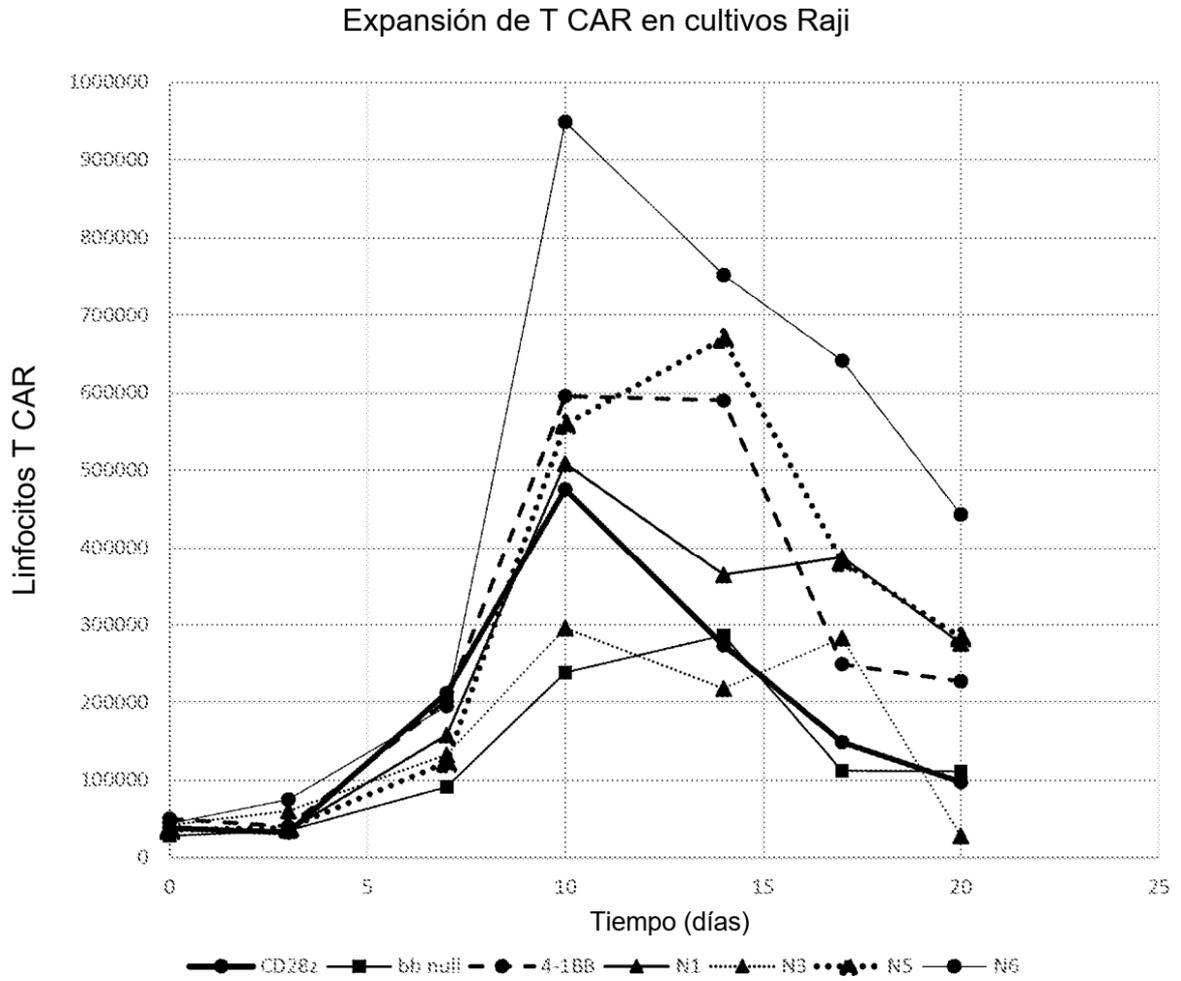
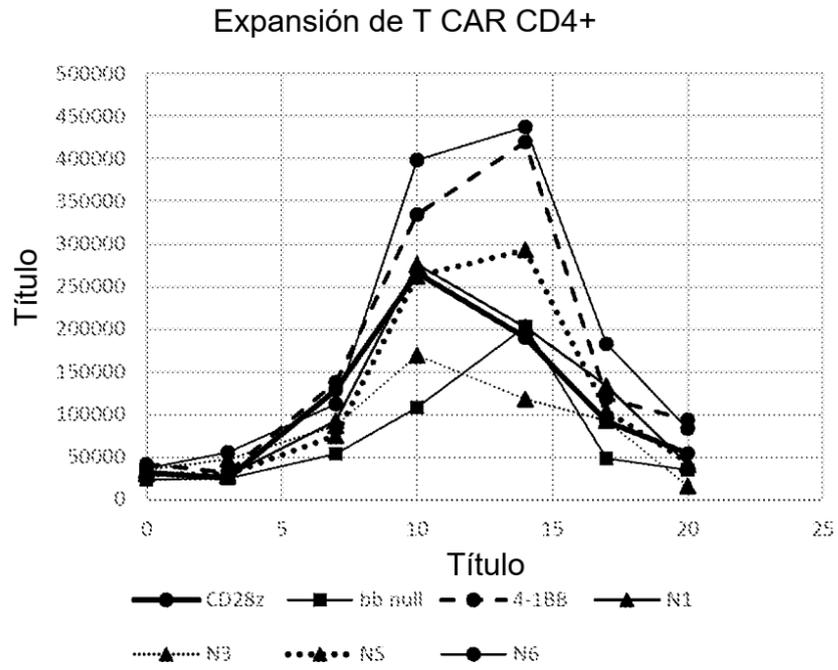


FIGURA 4

B.



C.

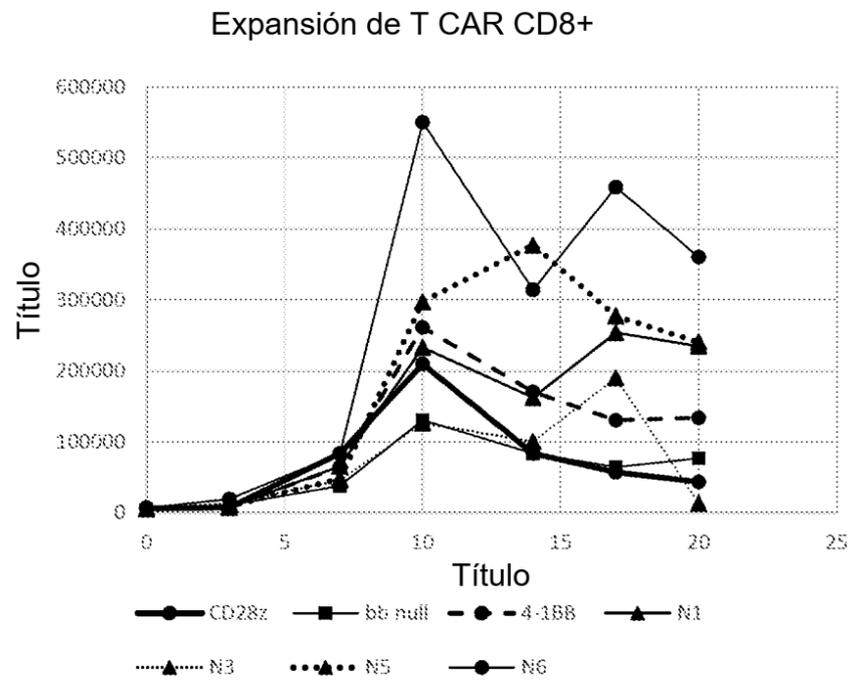
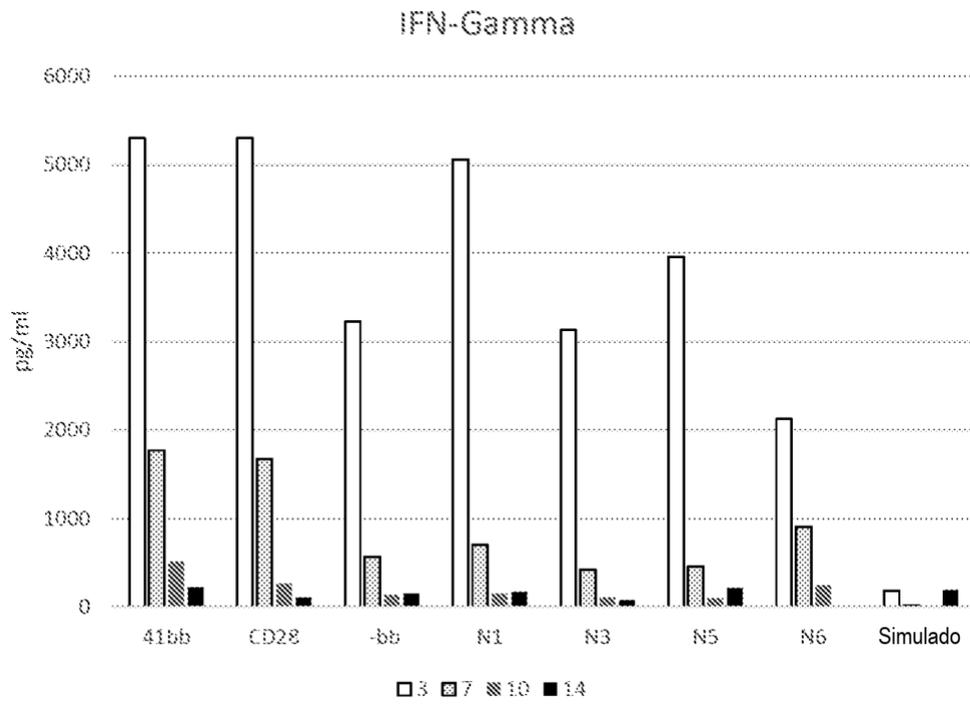


FIGURA 4 (cont.)

A.



B.

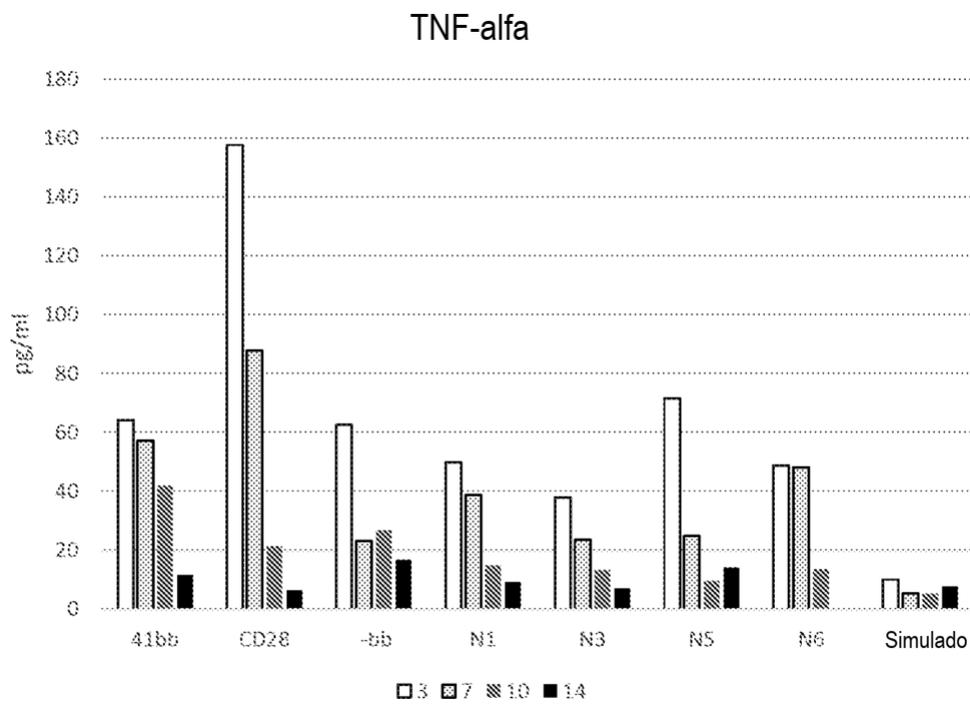


FIGURA 5

C.

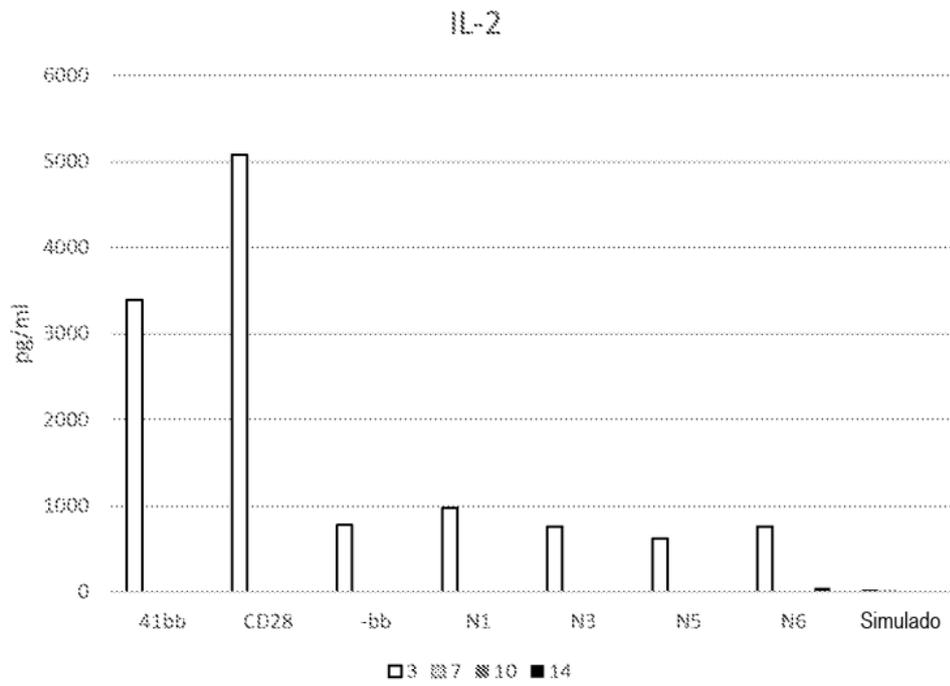


FIGURA 5 (cont.)

A.

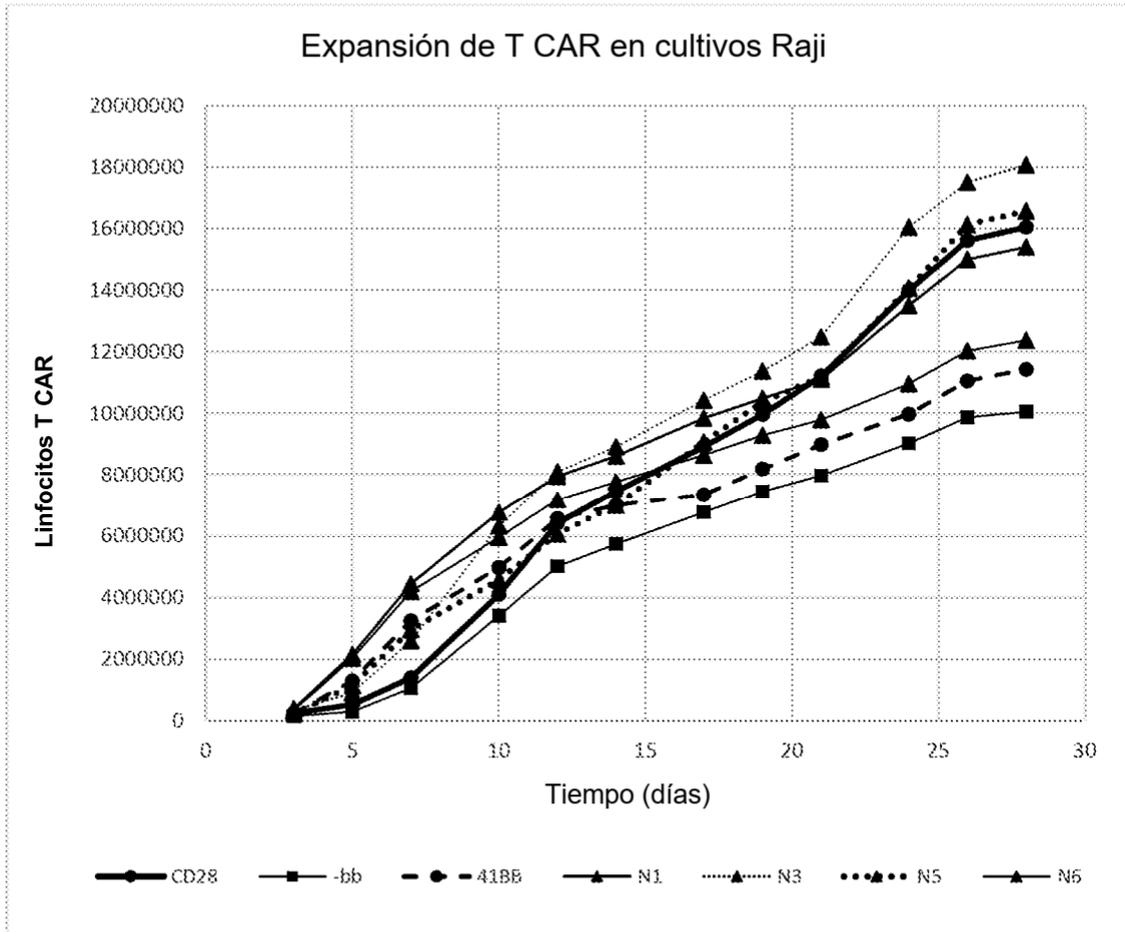
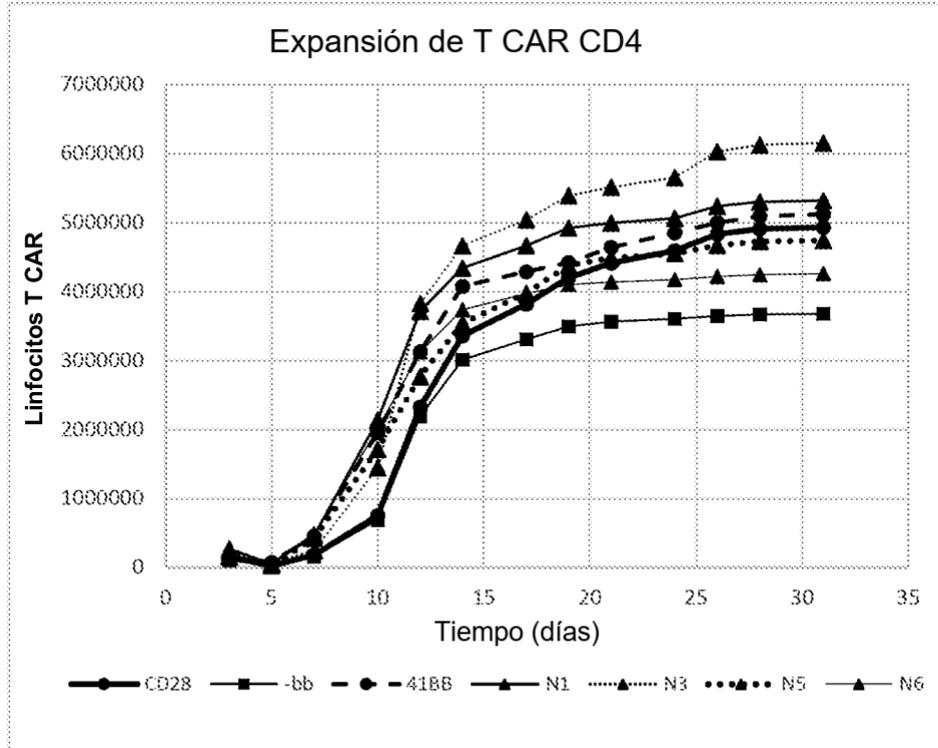


FIGURA 6

B.



C.

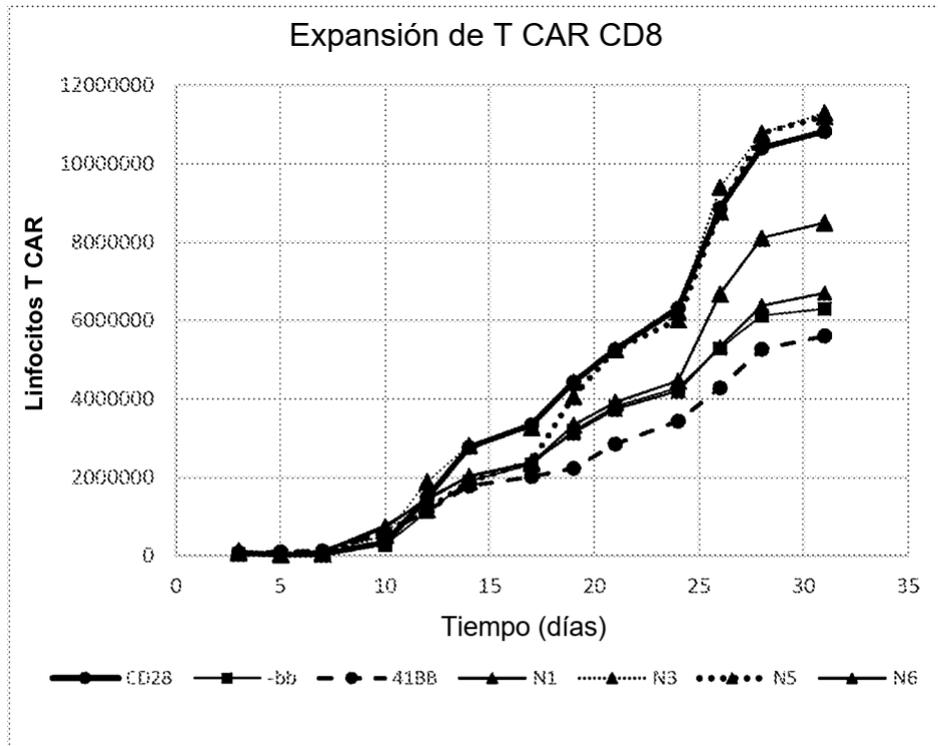


FIGURA 6 (cont.)

CD19 4-1BB CAR



CD19 N1 CAR

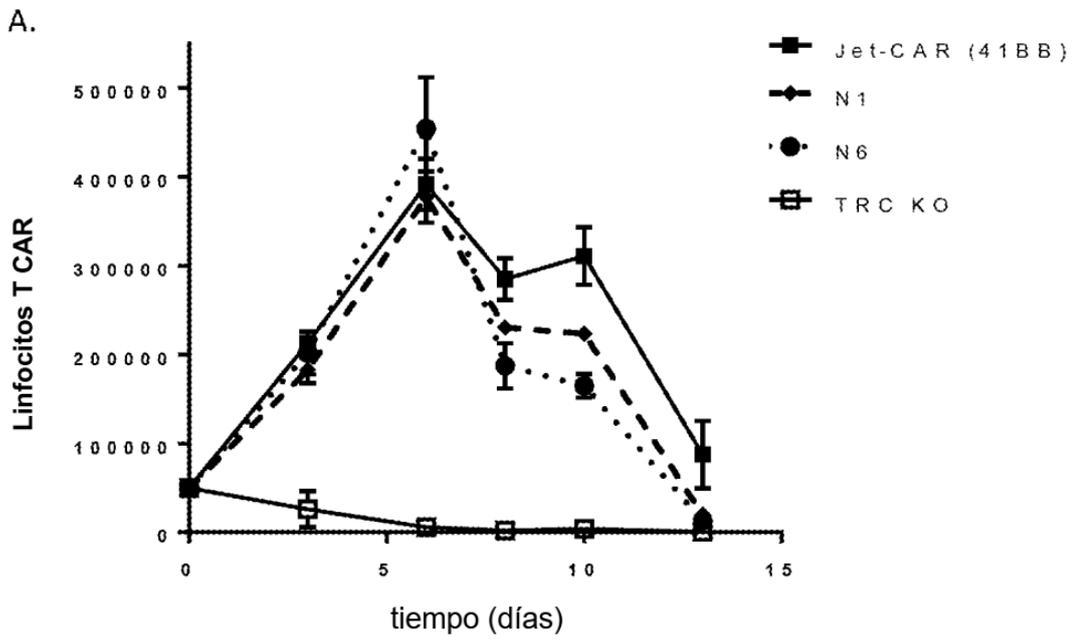


CD19 N6 CAR



FIGURA 7

Donante K799



Donante z4100

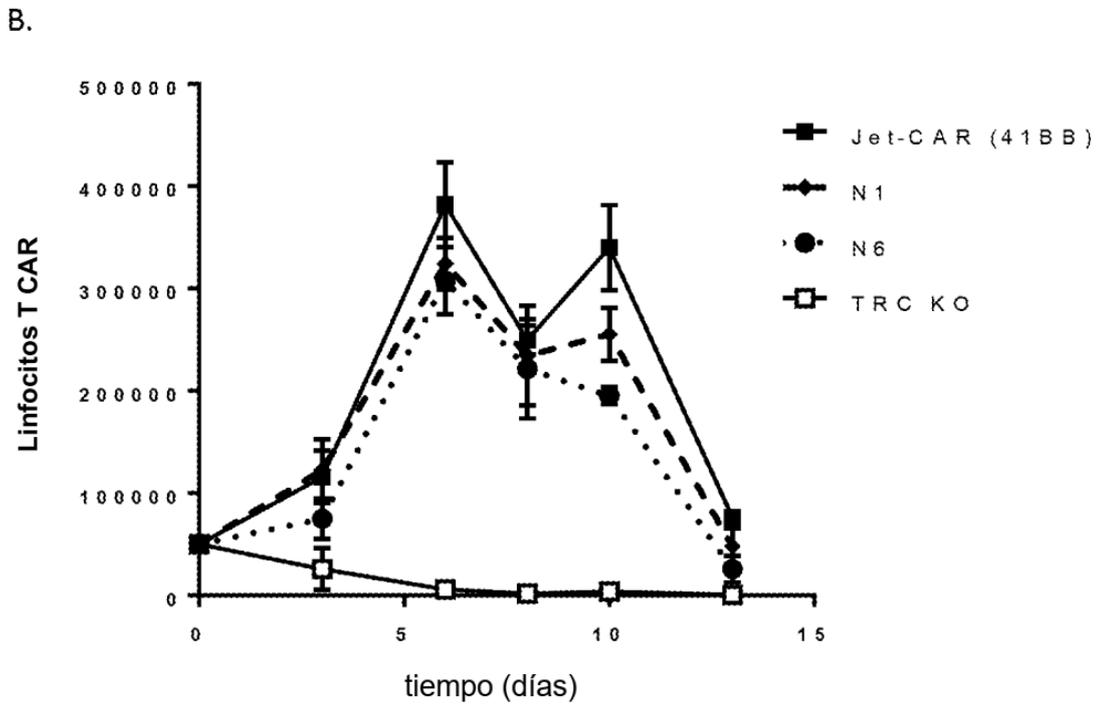


FIGURA 8

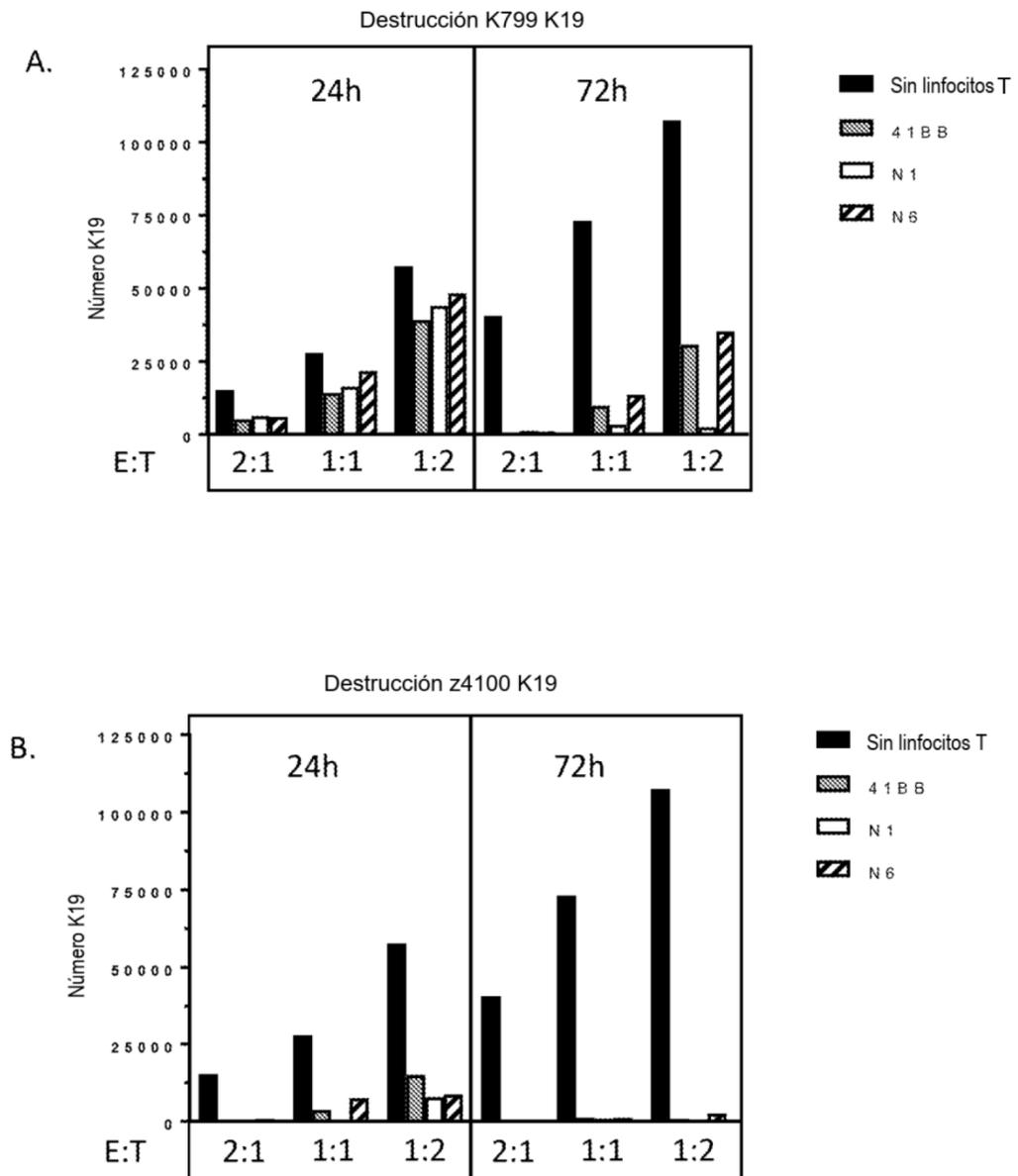


FIGURA 9

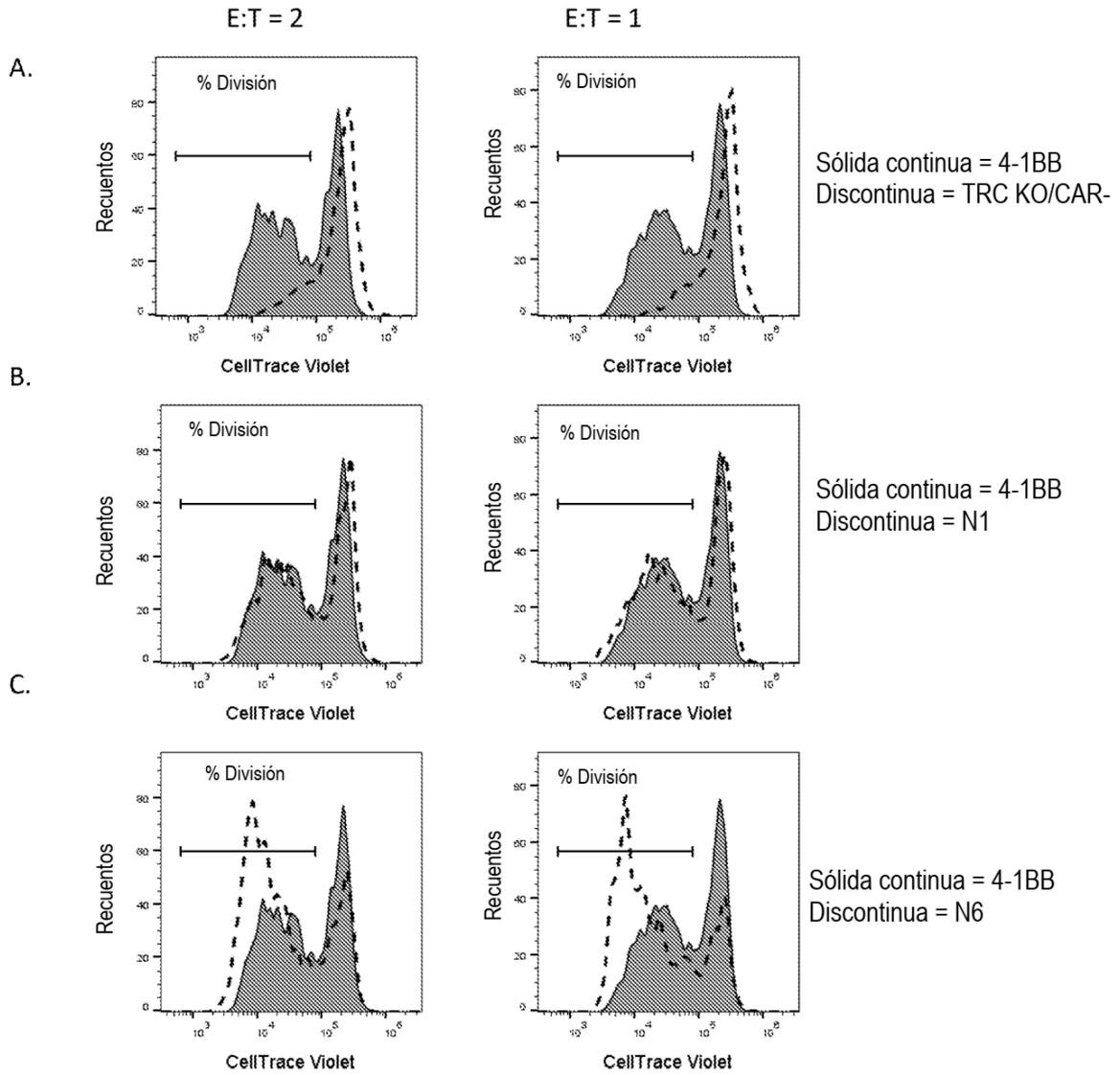


FIGURA 10

7241 CD19 4-1BB CAR



7205 CD19 N6 CAR



7206 CD19 N6 CAR

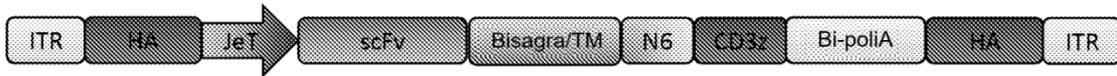


FIGURA 11

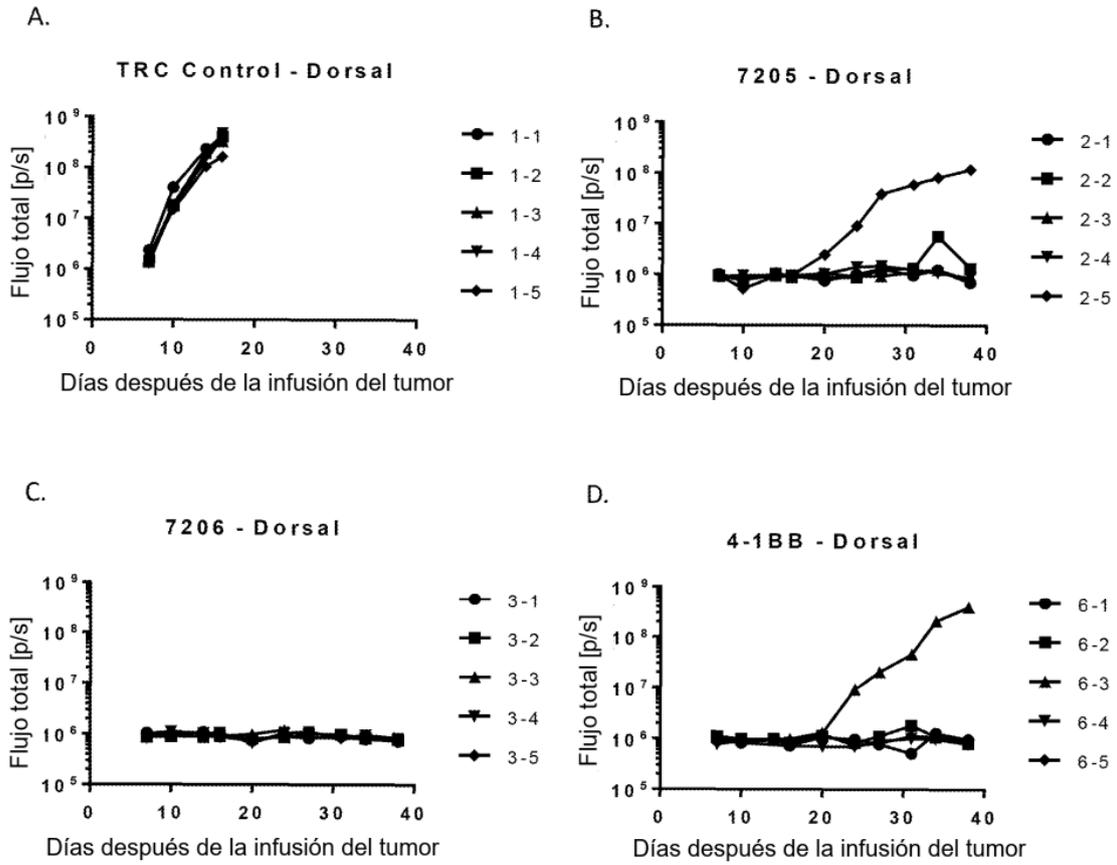


FIGURA 12

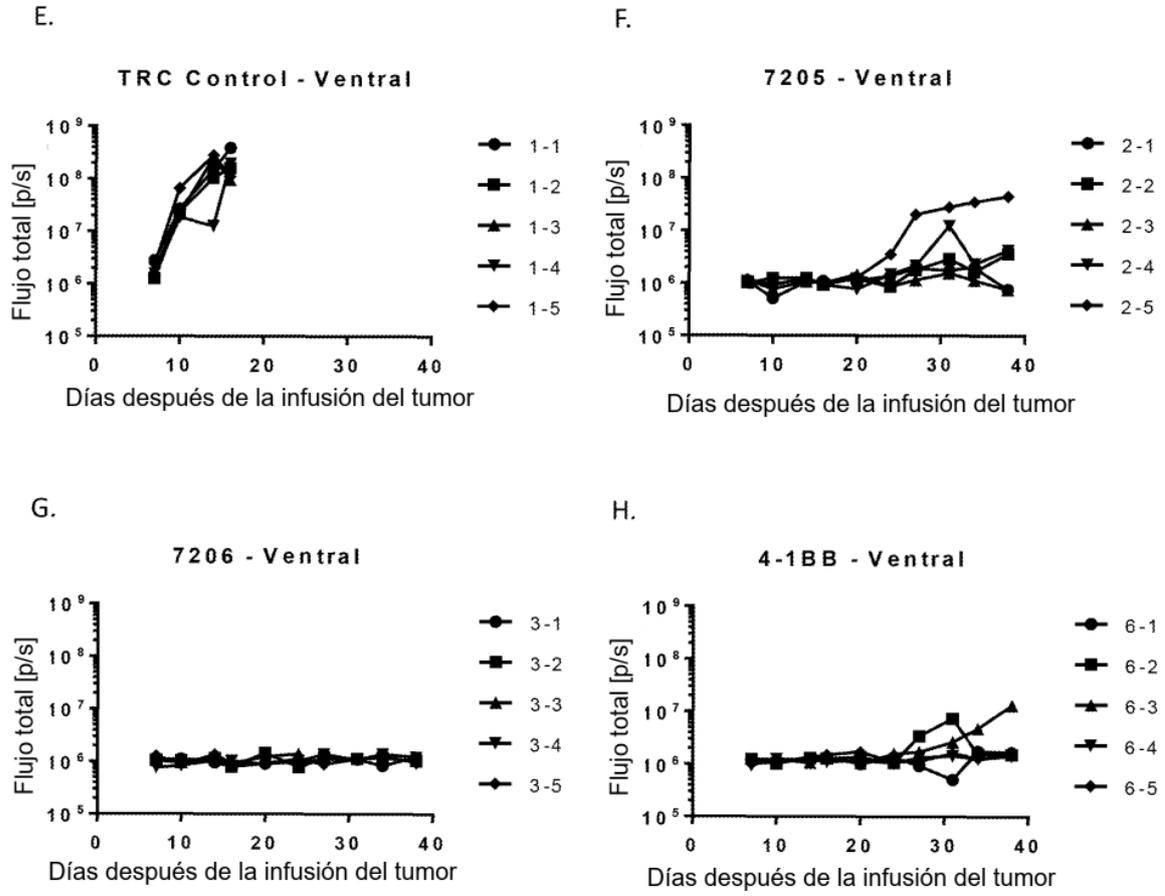


FIGURA 12 (cont.)

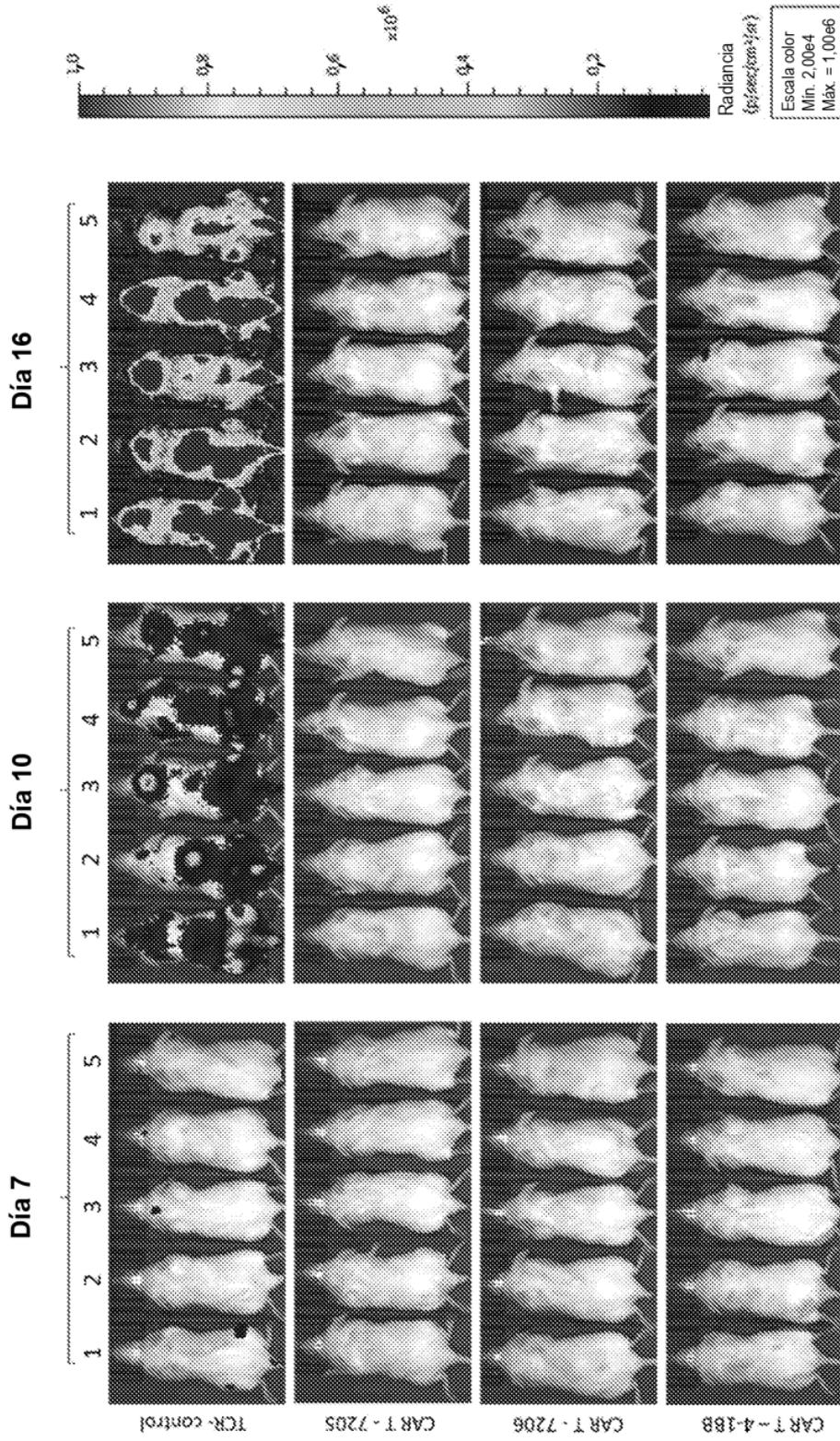
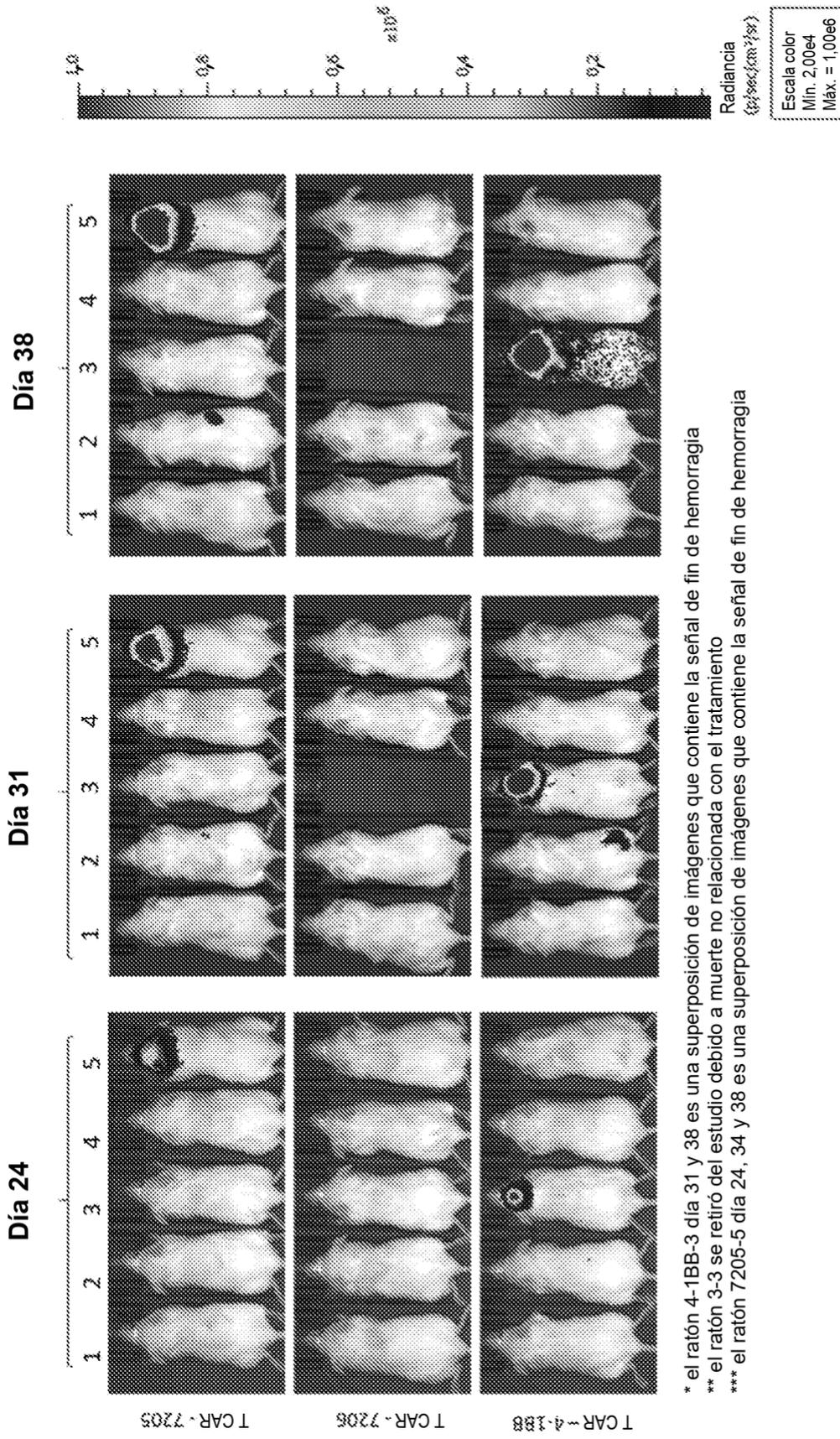


FIGURA 13A



* el ratón 4-188-3 día 31 y 38 es una superposición de imágenes que contiene la señal de fin de hemorragia
 ** el ratón 3-3 se retiró del estudio debido a muerte no relacionada con el tratamiento
 *** el ratón 7205-5 día 24, 34 y 38 es una superposición de imágenes que contiene la señal de fin de hemorragia

FIGURA 13B

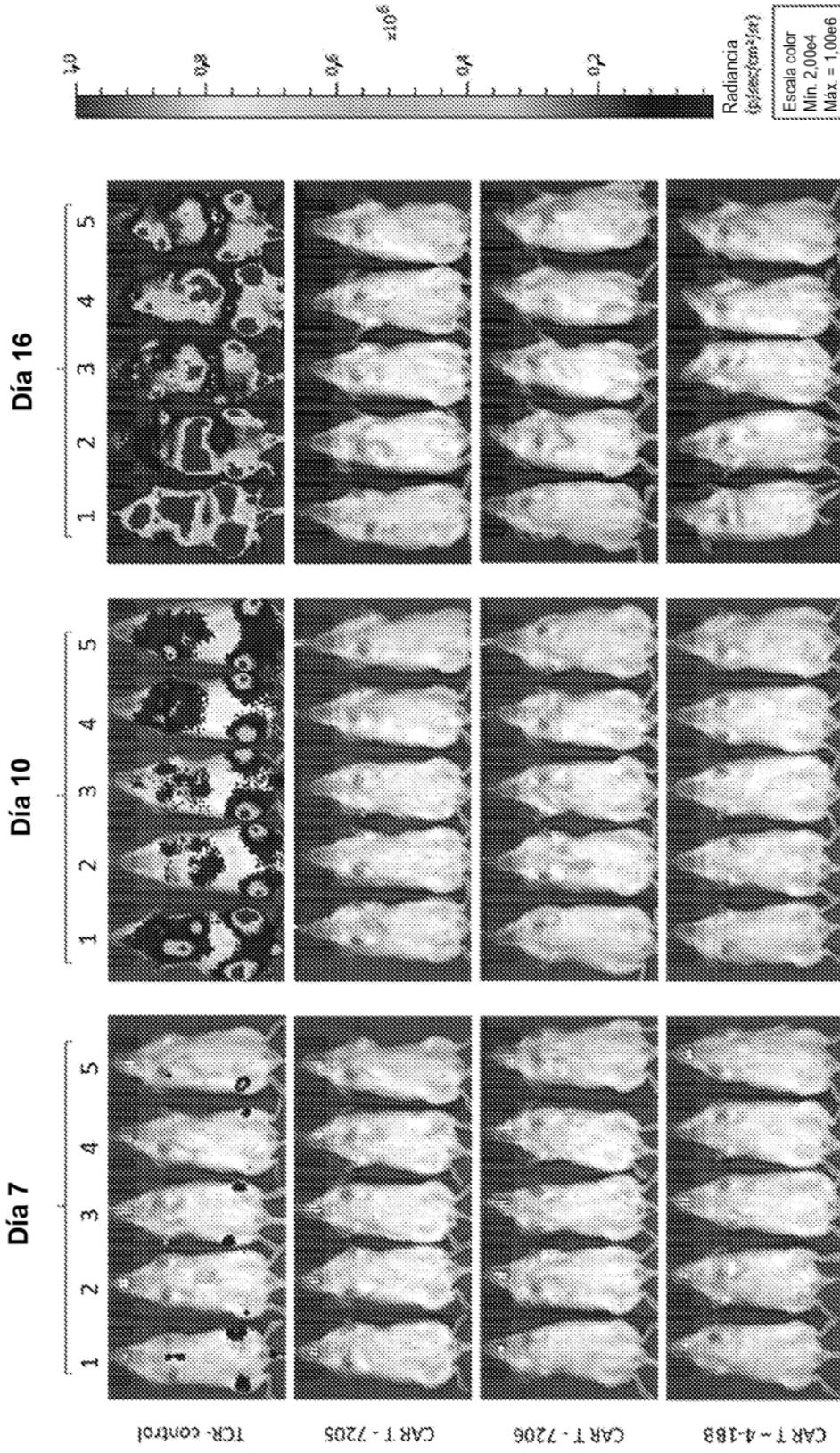


FIGURA 13C

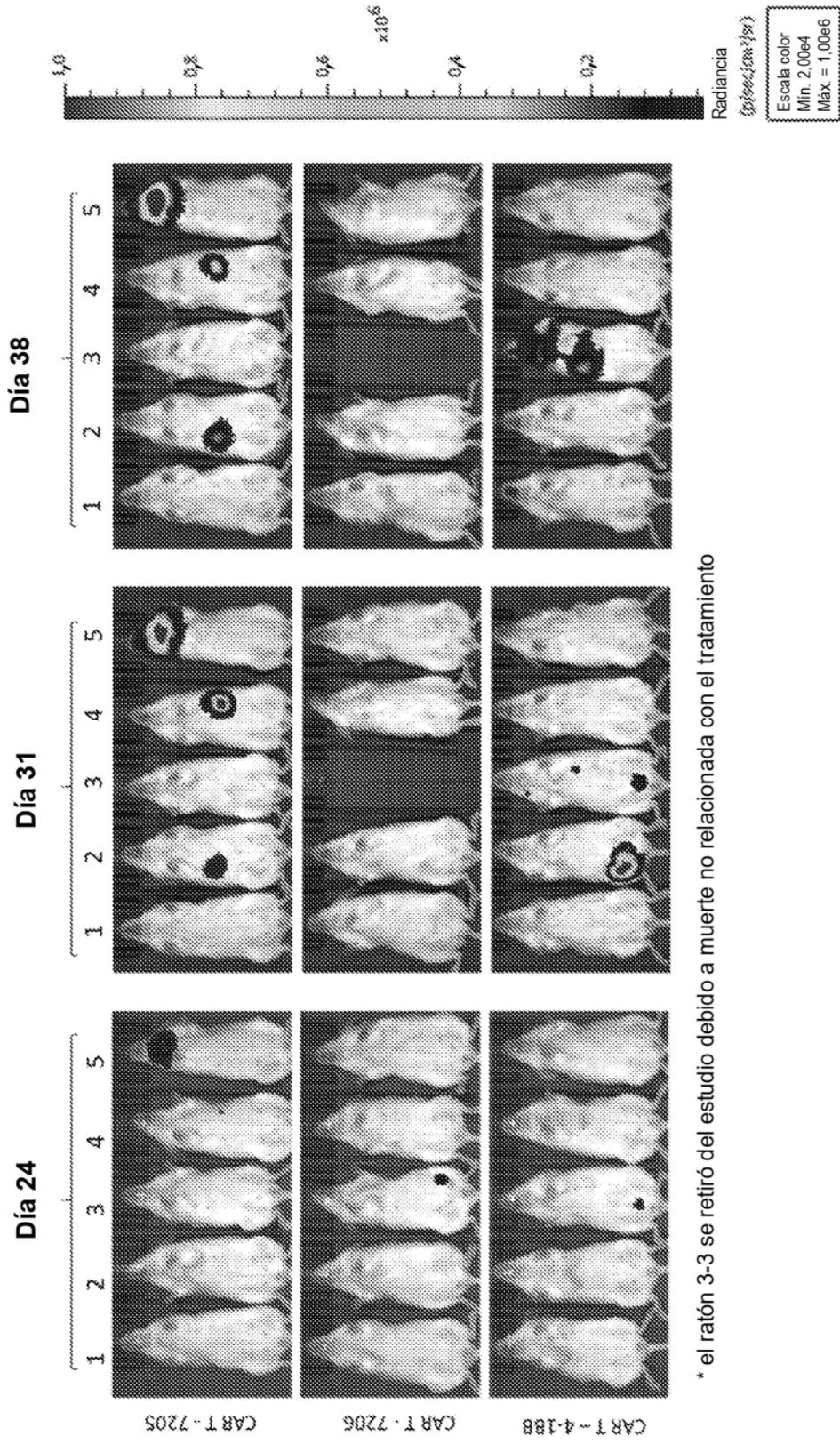


FIGURA 13D

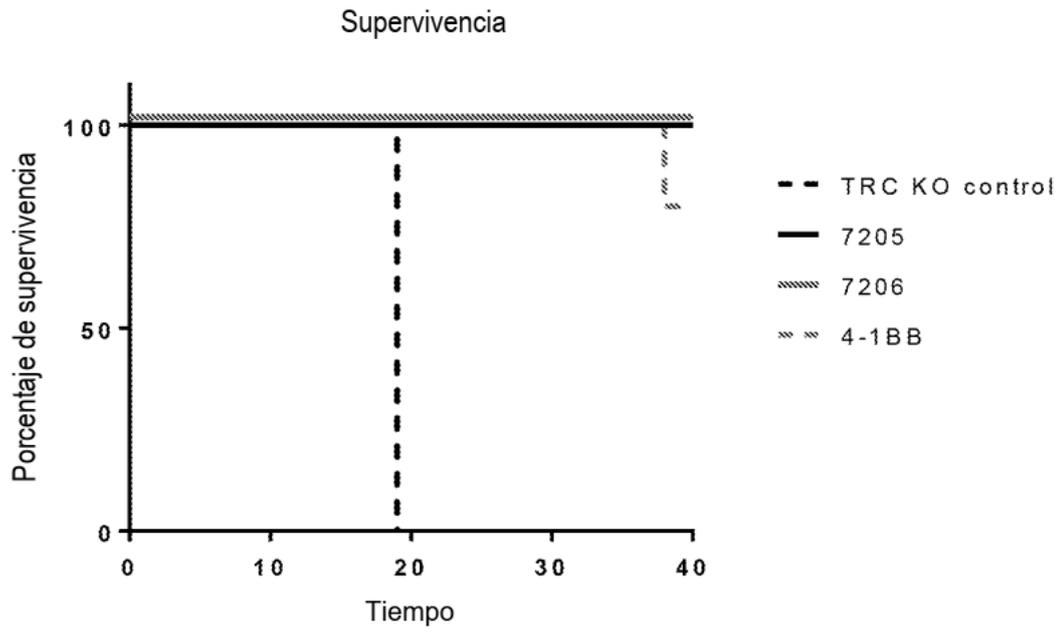


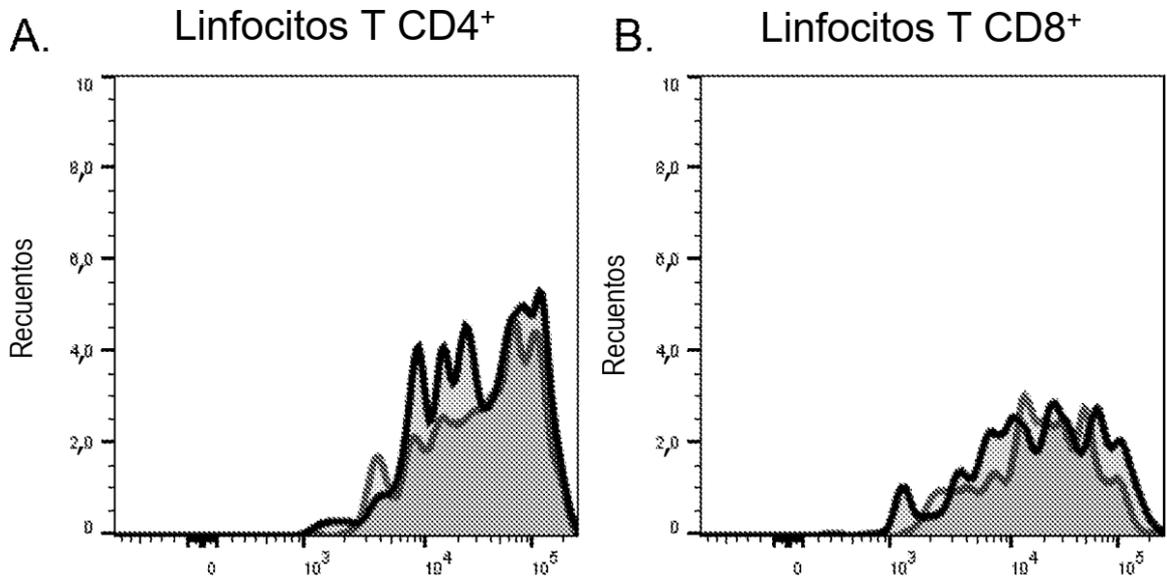
FIGURA 14

7240 MyD88/N6 CD19 CAR



FIGURA 15

TRC Control



N6 CAR

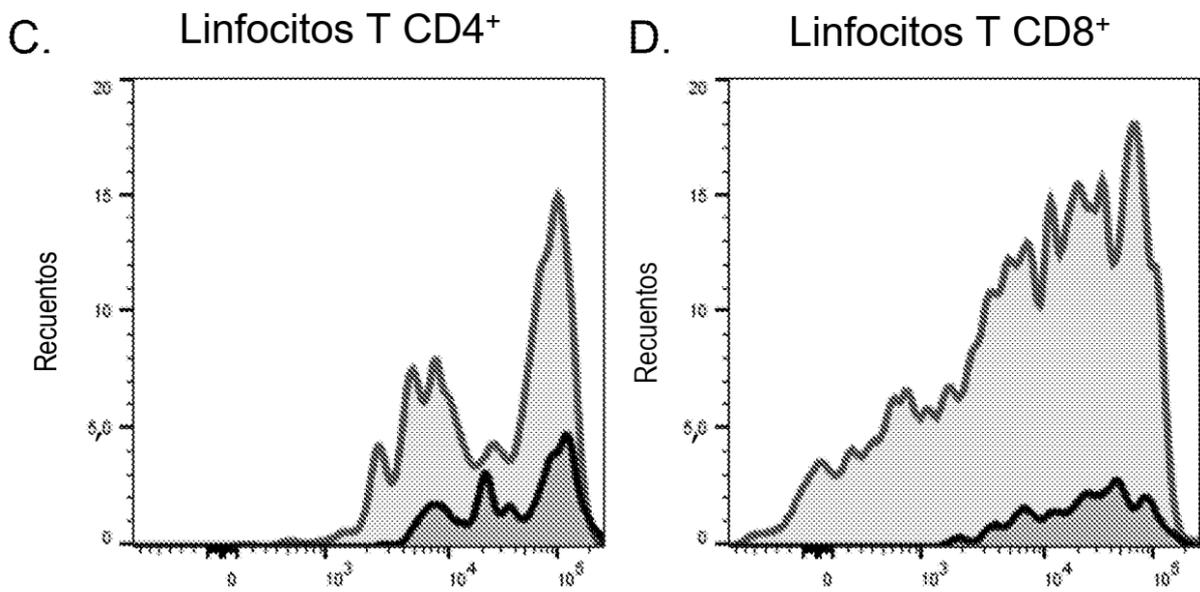


FIGURA 16

MyD88/N6 CAR

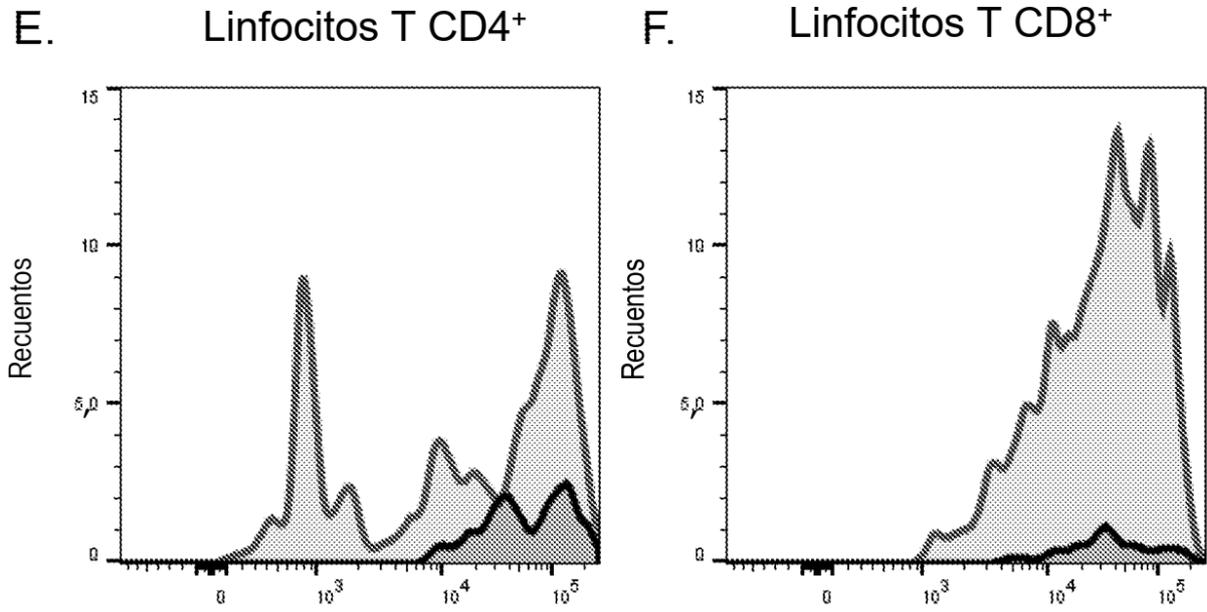


FIGURA 16 (cont.)

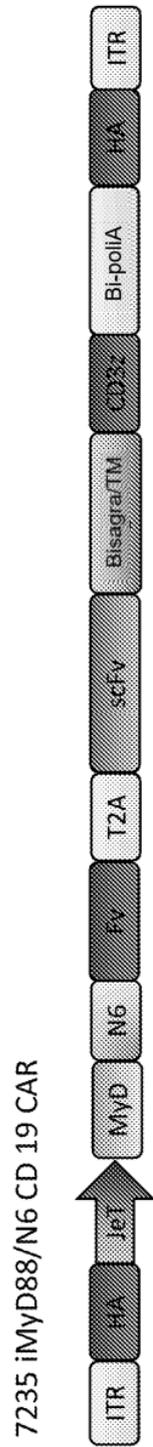


FIGURA 17

TRC Control

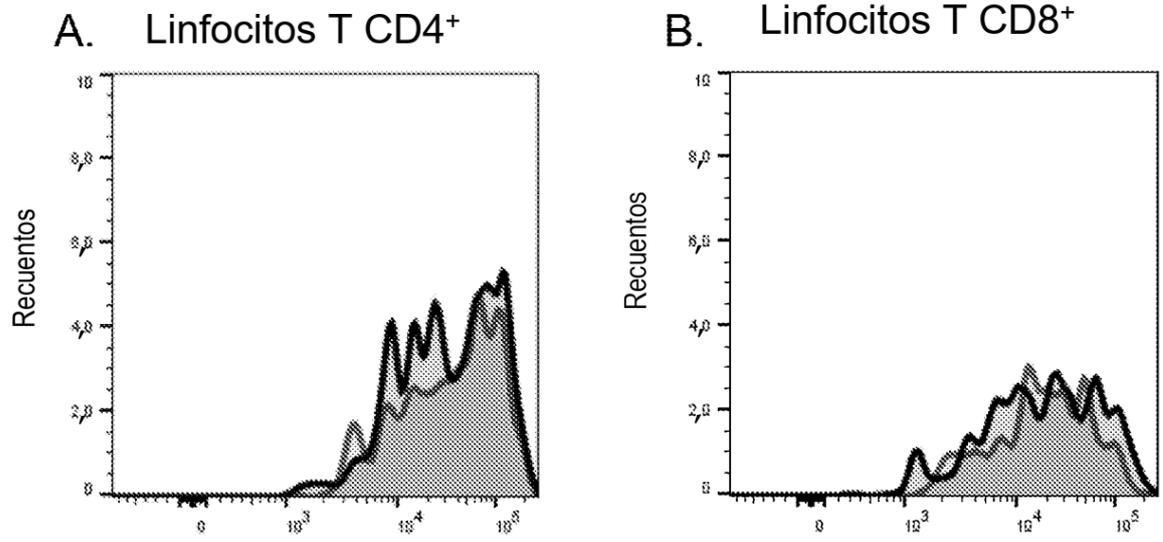
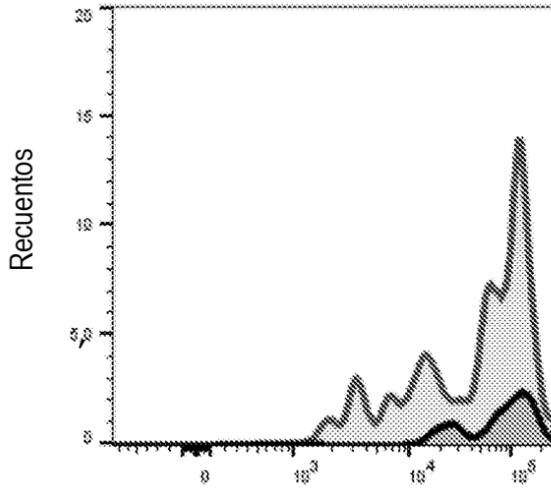


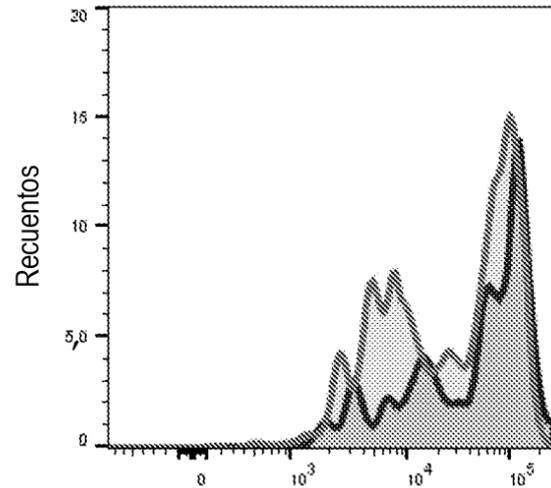
FIGURA 18

N6 CAR – Linfocitos T CD4⁺

A. K19/K562

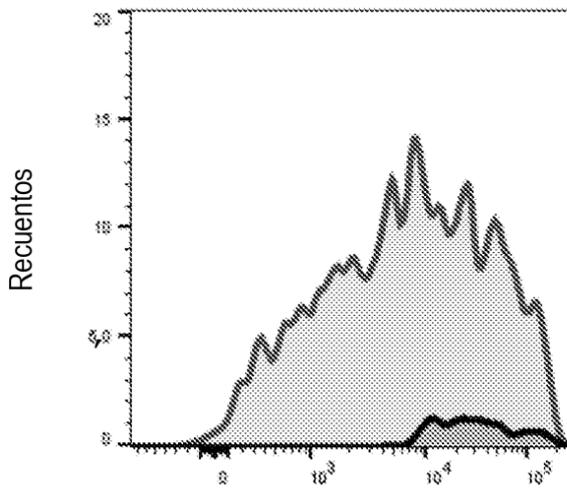


B. K19 +/- Rimiducid



N6 CAR – Linfocitos T CD8⁺

C. K19/K562



D. K19 +/- Rimiducid

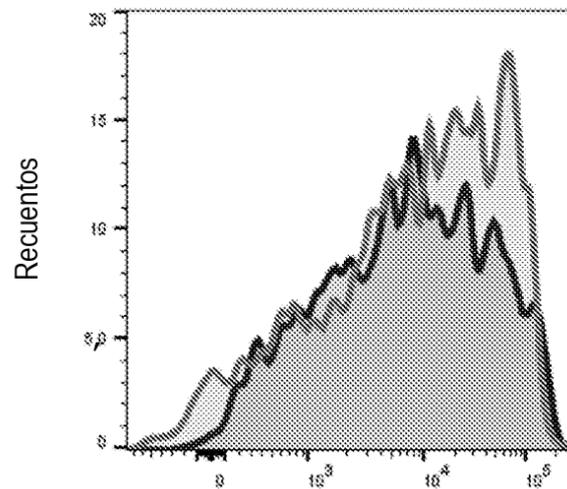
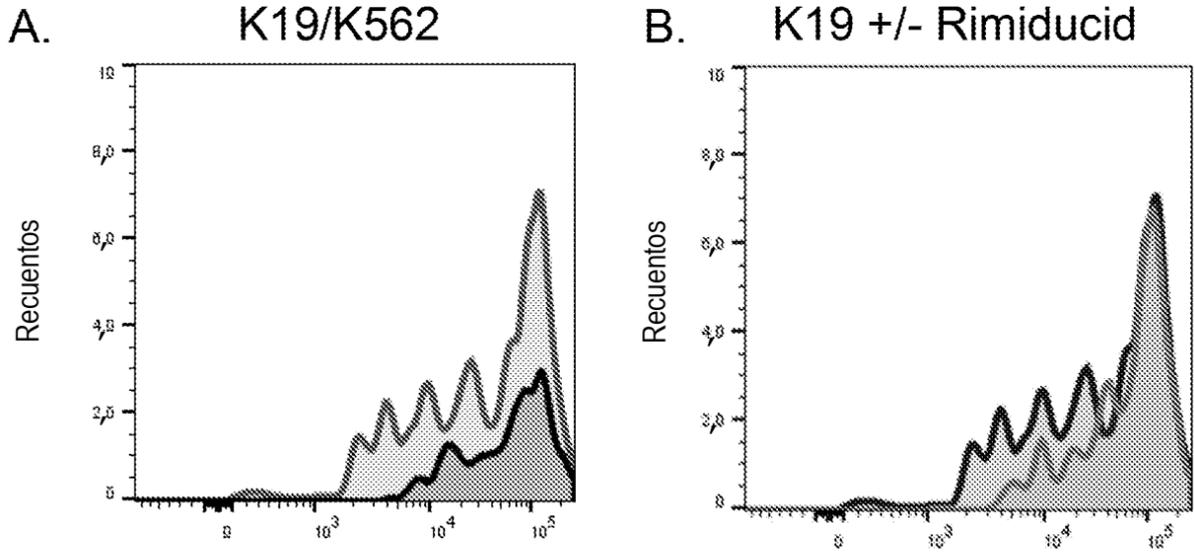


FIGURA 19

iMyD88/N6 – Linfocitos T CD4⁺



iMyD88/N6 – Linfocitos T CD8⁺

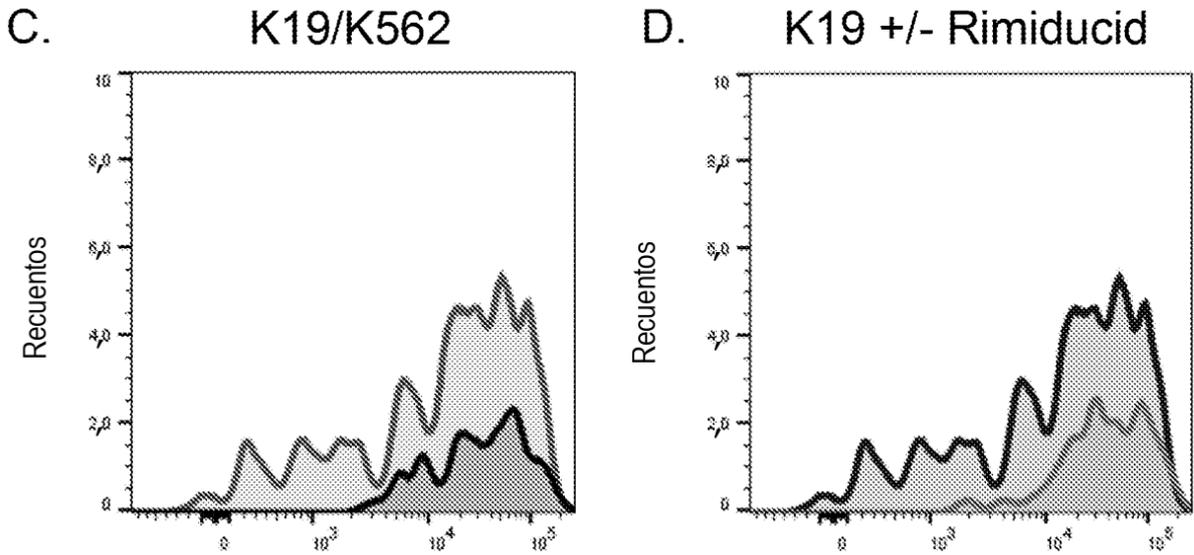


FIGURA 20