(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 942 671**

(51) Int. CI.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2017 PCT/US2017/022800**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017 WO17161180**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2017 E 17767569 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2023 EP 3429609**

(54) Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de deficiencias de colágeno tipo VII**

(30) Prioridad:

18.03.2016 US 201662310623 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2023

(73) Titular/es:

PRECIGEN, INC. (100.0%)
20358 Seneca Meadows Parkway
Germantown, Maryland 20876, US

(72) Inventor/es:

DAILEY, VERNON;
CHAKIATH, MARION;
ZHANG, SHYUAN;
MASLOWSKI, JOHN y
MALYALA, ANNA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Composiciones y métodos para el tratamiento de deficiencias de colágeno tipo VII

Lista de secuencias

La presente solicitud contiene una lista de secuencias que se ha enviado electrónicamente en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 9 de marzo de 2017, se denomina 0100-0016PR1_SL.txt y tiene un tamaño de 92 924 bytes.

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento de deficiencias de colágeno tipo VII tales como la epidermólisis ampollosa distrófica que comprende la administración de células autólogas modificadas genéticamente que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica el colágeno tipo VII (C7) o una variante funcional del mismo.

Antecedentes de la invención

El colágeno tipo VII (C7) es una proteína importante para la formación de fibrillas de anclaje en la unión dermoepidérmica (DEJ), que mantiene unidas las capas de la piel (Burgeson 1993; Leigh et al. 1988). La epidermólisis ampollosa distrófica (DEB) es una enfermedad hereditaria caracterizada por una deficiencia de C7 que produce una alteración de las fibrillas de anclaje para adherirse entre la epidermis y la dermis subyacente que afecta a la piel y los órganos. Las mutaciones del gen COL7A1 que codifica C7 causan la deficiencia de C7. Los pacientes que padecen DEB son muy susceptibles a la formación de ampollas graves. La epidermólisis ampollosa distrófica dominante (DDEB) se caracteriza por ampollas generalizadas. La dermatosis ampollosa transitoria es una forma de DDEB, que se corrige sola durante la infancia. La epidermólisis ampollosa distrófica recesiva (RDEB) es un trastorno debilitante que produce ampollas en la piel. La RDEB inversa es otra forma de RDEB, donde se forman ampollas en zonas donde la piel roza con la piel. Sin estas fibrillas, las capas de la piel se separan y producen ampollas graves, heridas abiertas y cicatrices en respuesta a cualquier tipo de fricción, incluidas las actividades diarias normales como frotarse o rascarse.

Actualmente no existen tratamientos curativos y los pacientes dependen en gran medida del cuidado paliativo de las heridas. Los estudios preclínicos que emplean una serie de estrategias muestran resultados alentadores que sugieren que los efectos de la enfermedad se pueden corregir mediante el restablecimiento de la función de C7 en la piel de la RDEB. Los enfoques iniciales se basaban en el injerto de tejido epidérmico frágil modificado y requerían la extracción del tejido de la piel que se va a reemplazar, lo que generaba cicatrices (Mavilio et al. 2006; Chen, *Nat. Gineta*. 2002; Siprashvili 2010). Otros métodos han incluido la administración del C7 correctivo mediante la expresión directa basada en virus y la administración sistémica de proteína recombinante (Remington 2009; Woodley et al. 2003). Todos estos tratamientos potenciales tienen una serie de inconvenientes que incluyen problemas de coste y bioseguridad.

El uso de vectores lentivirales (LV) autoinactivantes (SIN) y defectuosos en la replicación ofrece varias ventajas para la terapia génica: 1) capacidad para transducir tanto células en división como no en división, 2) alta eficiencia de transducción, 3) expresión transgénica sostenida a largo plazo, 4) la capacidad de dispensar secuencias que codifican proteínas virales que podrían desencadenar una respuesta inmunitaria, 5) un mayor perfil de seguridad debido a la repetición terminal larga (LTR) SIN transcripcionalmente inactiva, y 6) la capacidad de empaquetar transgenes grandes. Los estudios de seguridad de los ensayos clínicos que utilizan vectores LV para la terapia génica no han mostrado una integración preferencial en o cerca de protooncogenes o genes supresores de tumores. Los pacientes a los que se les administró una dosis de 10 000 millones de células T transducidas con vector LV por sujeto y se les hizo un seguimiento durante una mediana de 4 años, no mostraron leucemia u otros acontecimientos adversos. Los ensayos con indicaciones de leucodistrofia metacromática, síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) y adrenoleucodistrofia X (ALD), no pusieron de manifiesto expansión clonal aberrante observada hasta 21 meses, 32 meses y 36 meses de seguimiento, respectivamente (Biffi et al. 2013; Aiuti et al. 2013).

El tratamiento con fibroblastos dérmicos humanos modificados genéticamente (GM-HDF) autólogos ofrece una alternativa prometedora basada en corregir el defecto hereditario *ex vivo* en los fibroblastos del propio paciente (Ortiz-Urda et al. 2003; Woodley et al. 2003). Georgiadis et al. (*J. Investigative Dermatology* 136: 284-92 (2015)) describieron la transducción de fibroblastos de RDEB con un vector lentiviral autoinactivante que codifica COL7a1 de codones optimizados. Se ha descrito que los fibroblastos corregidos por el gen hCOL7A1 son mejores que los queratinocitos para suministrar C7 a la zona de la membrana basal (BMZ) en ratones con injertos de piel de RDEB (Goto et al. 2006). Además, la inyección de fibroblastos se puede completar más fácilmente que el injerto de queratinocitos.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige a células modificadas genéticamente autólogas para su uso en un método de tratamiento de un paciente que padece una deficiencia de colágeno tipo VII (C7), en donde dicho método comprende: (i) poner en contacto células, obtenidas de la dermis o la epidermis, preferiblemente fibroblastos o queratinocitos, del paciente con deficiencia de C7, con un vector lentiviral de transducción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica *COL7A1* o una variante funcional del mismo para formar las células modificadas genéticamente autólogas que tienen un número de copias del vector, en donde dicho vector lentiviral tiene un número de copias del vector de transducción en el intervalo de 0.1 a 5.0 copias por célula; (ii) cultivar dichas células modificadas genéticamente

autólogas; y administrar una cantidad eficaz de las células modificadas genéticamente al paciente con deficiencia de C7, en donde el vector lentiviral de transducción comprende además (a) una repetición terminal larga (LTR) 5' modificada, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) al menos un elemento del tracto de polipurina central lentiviral, y (c) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis. La administración se puede hacer por inyección, preferiblemente inyección intradérmica. En un aspecto de la invención, la deficiencia de C7 es la epidermólisis ampollosa distrófica (DEB), tal como epidermólisis ampollosa distrófica recesiva (RDEB) o epidermólisis ampollosa distrófica dominante (DDEB). También se prevé que los subtipos de RDEB sean tratados según la presente invención, incluidos RDEB de Hallopeau-Siemens, RDEB no Hallopeau-Siemens, RDEB inversa, RDEB pretibial, RDEB acral y RDEB centrípeta. En una realización de la invención, el vector lentiviral de transducción está en forma de una partícula de vector lentiviral.

En una realización de la invención, la partícula de vector lentiviral de transducción se construye a partir de un vector lentiviral de transferencia que comprende (a) una repetición terminal larga 5' modificada en LTR, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) el gen *COL7A1* o una variante funcional del mismo, (c) al menos un tracto de polipurina central lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en el donde la 3' LTR modificada comprende una deleción con respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis, en donde el gen *COL7A1* o variante funcional se incorpora a las células para formar células modificadas genéticamente que tienen un gen *COL7A1* o variante funcional del mismo.

En una realización, hay al menos dos elementos de tracto de polipurina central lentiviral. En otra realización, el PRE es un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). Preferiblemente, el vector lentiviral de transferencia usado para construir el vector de transducción se selecciona del grupo que consiste en pSMPUW y pFUGW. Preferiblemente, la partícula de vector lentiviral de transducción es INXN-2004 o INXN-2002.

La partícula de vector lentiviral INXN-2004 comprende un vector de transferencia que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 34.

La partícula de vector lentiviral INXN-2002 se construye a partir de un plásmido de expresión lentiviral pSMPUW que comprende (a) una repetición terminal larga 5' modificada en LTR, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) un gen *COL7A1* funcional, (c) al menos un tracto central de polipurina lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis (PRE).

La administración de los fibroblastos modificados genéticamente autólogos al paciente con deficiencia de C7 se puede realizar de cualquier manera adecuada, incluyendo por inyección, vía tópica, oral o insertados en una matriz biocompatible.

Otro aspecto de la invención se dirige a fibroblastos modificados genéticamente autólogos de un paciente con deficiencia de C7, tal como un paciente con RDEB o DDEB, transducidos con una partícula de vector lentiviral que comprende un gen *COL7A1* funcional o una variante funcional del mismo, y que expresa colágeno tipo VII, en donde la partícula de vector lentiviral tiene un número de copias del vector de transducción en el intervalo de 0.1 a 5.0 copias por célula, en donde dicha partícula de vector lentiviral de transducción se construye a partir de un vector lentiviral de transferencia que comprende (a) una repetición terminal larga 5' modificada en LTR, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) un gen *COL7A1* funcional, (c) al menos un tracto central de polipurina lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis, en donde el gen *COL7A1* o la variante funcional del mismo se incorpora a las células para formar células modificadas genéticamente que tienen un gen *COL7A1*.

Otra realización se dirige a un vector lentiviral autoinactivante formado a partir de un vector de transferencia que comprende (a) una 5' terminal larga modificada en LTR, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) el gen *COL7A1* o una variante funcional del mismo, (c) al menos un elemento del tracto de polipurina central lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, y en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis, en donde el PRE eliminado es un elemento regulador postranscripcional PRE de la marmota (WPRE). En una realización, el vector comprende al menos dos elementos del tracto de polipurina central lentiviral. El vector de la invención incluye el vector denominado INXN-2004 y que comprende la secuencia del plásmido IGE308 (SEQ ID NO: 34); o el vector denominado INXN-2002 en el presente documento.

Otra realización de la invención se dirige a composiciones farmacéuticas que comprenden un fibroblasto obtenido de un paciente que padece RDEB o DDEB transducido con un vector lentiviral según las reivindicaciones, tal como el vector lentiviral denominado INXN-2004 que comprende la secuencia del plásmido IGE308; o el vector lentiviral denominado INXN-2002 en el presente documento.

En una realización, la presente invención se dirige a células transducidas *in vitro* o *ex vivo* utilizando los vectores según las reivindicaciones, tales como INXN-2002 e INXN-2004.

En una realización, la presente invención se dirige a fibroblastos autólogos transducidos usando vectores INXN-2002 o INXN-2004, que pueden obtenerse y propagarse según los métodos descritos en la patente de EE. UU. Nº 8,728,819 y solicitud de patente internacional/ WO2008/027984 titulada "Métodos para cultivar fibroblastos con pases mínimos y usos de los mismos".

La presente invención también se refiere a una población de células autólogas para usar en el tratamiento de un paciente que padece pseudosindactilia, en donde dicha población de células autólogas se va a obtener de dicho paciente y se transduce con una partícula de vector lentiviral que comprende un gen *COL7A1* funcional o una variante funcional del mismo, y que expresa colágeno tipo VII, en donde dicha partícula de vector lentiviral tiene un número de copias del vector de transducción en el intervalo de 0.1 a 5.0 copias por célula, en donde dicha partícula de vector lentiviral de transducción se construye a partir de un vector lentiviral de transferencia que comprende (a) una repetición terminal larga 5' modificada en LTR, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) un gen *COL7A1* funcional, (c) al menos un tracto de polipurina central lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis, en donde el gen *COL7A1* o la variante funcional del mismo se incorpora a las células para formar células modificadas genéticamente que tienen un gen *COL7A1*.

La invención se refiere además a un uso médico para tratar, inhibir o reducir las ampollas de una epidermólisis ampollosa distrófica (DEB) o para tratar lesiones en pacientes que padecen RDEB que comprende administrar las células genéticamente modificadas autólogas de la presente invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una población aislada de fibroblastos modificados genéticamente autólogos de un paciente con deficiencia de C7, tal como un paciente con DDEB o RDEB, transducidos con una partícula de vector que comprende un gen *COL7A1* funcional o variante funcional del mismo y que expresa colágeno tipo VII, así como métodos para preparar estas poblaciones aisladas, como se define en las reivindicaciones.

La invención también se refiere a un método para aumentar el número de copias del transgén integradas por célula en fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos genéticamente modificados, que comprende (a) poner en contacto un vector lentiviral de transducción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un gen *COL7A1* o una variante funcional del mismo con un fibroblasto o queratinocito dérmico humano obtenido de un paciente con deficiencia de C7 para formar una composición de transducción; (b) someter la primera composición de transducción a espinoculación para formar fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos; (c) poner en contacto los fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos de la etapa (b) con un segundo vector lentiviral de transducción para formar una segunda composición de transducción; y (d) someter dicha primera composición de transducción a espinoculación para formar fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos, en donde el número de copias de transgén integradas de los fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos es al menos 5, 10, 15, 20, 25, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 o 50 veces mayor respecto a los fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos no sometidos a espinoculación o a una segunda etapa de transducción, y en donde el vector lentiviral de transducción comprende además (a) una repetición terminal larga 5' (LTR) modificada, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) al menos un elemento del tracto de polipurina central lentiviral, y (c) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende un deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis. En un aspecto, el vector lentiviral de transducción es INXN-2002 o INXN-2004, preferiblemente INXN-2004. Se ha encontrado que los fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos tienen al menos o aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 25, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 o 50 veces mayor número de copias de transgén integradas por célula respecto a una composición de transducción no sometida a espinoculación o supertransducción. En otra realización, la invención se refiere a tener un número de copias de transgén integradas por célula de al menos 0.05, 0.09, 0.41 o 0.74 o un intervalo entre aproximadamente de 0.1 a aproximadamente 5, de 0.1 a aproximadamente 1, de 0.4 a aproximadamente 1 o de 0.4 a aproximadamente 0.75. Se ha encontrado que la expresión aumenta usando los métodos de transducción descritos en el presente documento. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de C7 ha aumentado 10, 25, 50, 100, 150 o 200 veces con respecto a los fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos no sometidos a espinoculación o a una segunda transducción.

Breve descripción de los dibujos

Puede obtenerse una comprensión más completa de la presente invención con referencia a los dibujos adjuntos, cuando se consideran junto con la descripción detallada posterior. Las realizaciones ilustradas en los dibujos están destinadas únicamente a ejemplificar la invención y no deben interpretarse como una limitación de la invención a las realizaciones ilustradas.

La figura 1A representa trímeros de colágeno tipo VII (C7), que forman fibrillas de anclaje. El gen *COL7A1* codifica una cadena alfa de 290 kDa y tres de las cadenas forman una triple hélice (trímero). Imagen de Bruckner-Tuderman L. *Molecular Therapy* (2008) 17:6-7.

La Figura 1B representa la estructura general de la piel normal y de RDEB. Las fibrillas de anclaje de C7 se unen a otros colágenos, proteínas de la matriz extracelular y Lam332 para mediar la unión de la dermis a la epidermis. La ausencia de fibrillas de anclaje puede conducir a la formación de ampollas.

La figura 2 describe un procedimiento de producción de GM-HDF a escala de cGMP según un aspecto de la presente invención. Se clonó un casete de expresión de C7 en el esqueleto de un lentivirus autoinactivante. En una producción a escala piloto se generó el vector lentiviral (INXN-2002) que comprende el gen *COL7A1* (LV-COL7) con un título de ~9 × 10^6 UI/ml para su uso en el procedimiento de producción a escala de cGMP. Los fibroblastos se aislaron de biopsias de pacientes con RDEB, se cultivaron y luego se dividieron en tres grupos para la transducción simulada, alta y baja de LV-COL7. Cada grupo de fibroblastos se cultivó a escala 2 × CS10 y luego se crioconservó (principio activo). Para el tratamiento del paciente, los viales de principio activo se descongelan y formulan (producto farmacéutico), luego se envían de regreso a la clínica para la inyección en el sitio de la herida del paciente del que proceden.

La figura 3A proporciona el número de copias de LV-COL7 (para INXN-2002) por célula. Los viales del principio activo se descongelaron y se analizaron las copias de ADN de LV-COL7 por célula usando qPCR. Los cebadores eran específicos para el vector lanzadera LV. Los resultados demuestran niveles dependientes de la dosis de copias por célula con un promedio de 0.38 y 0.18 copias de los grupos de dosis alta y baja, respectivamente.

La Figura 3B proporciona los niveles de expresión de C7 producidos por fibroblastos de pacientes con RDEB transducidos con LV-COL7: Los viales de principio activo se descongelaron y cultivaron durante 3 días. Se recogieron los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares acondicionados y se analizaron los niveles de C7 mediante ELISA. Los resultados muestran una expresión de proteína dependiente de la dosis del virus que varía de 60 a 120 ng/ml de C7 en células transducidas con LV-COL7.

La Figura 3C muestra la forma trimérica de C7 producida por fibroblastos de pacientes con RDEB transducidos con LV-COL7: También se usaron líquidos sobrenadantes de cultivos celulares acondicionados en un ensayo de inmunoprecipitación. El C7 inmunoprecipitado se separó en SDS-PAGE no desnaturalizante y se visualizó mediante transferencia Western. El C7 producido por los fibroblastos de RDEB era predominantemente trimérico expresando las células transducidas con LV-COL7 más COL7 que las células transducidas de forma simulada (Grupo C). También se observaron algunas especies de menor peso molecular que mostraban inmunorreactividad.

La Figura 4A representa la unión de COL7 purificado a Lam332. COL7 se expresó en células CHO-DG44, se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se analizó la unión preferencial a Lam332 en comparación con BSA para establecer el ensayo (el aumento en la OD450 corresponde al aumento en la unión de COL7 a la Laminina-332).

La Figura 4B representa la unión a Lam332 de COL7 en líquidos sobrenadantes de cultivo de fibroblastos transducidos con LV-COL7 (transducidos por el vector INXN-2002). Los viales del principio activo se descongelaron y se cultivaron durante 3 días. Los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares acondicionados se recogieron y se analizó la unión a Lam332 en comparación con el control BSA. Los resultados muestran una unión a Lam332 dependiente de la dosis del virus.

La Figura 5 representa injertos de piel de RDEB compuestos en el dorso de ratones SCID a los que se inyectó por vía intradérmica 1 × 10^6 GM-HDF (transducidos por el vector INXN-2002) y se analizó por tinción inmunofluorescente con anticuerpos humanos específicos para COL7. Se muestran imágenes representativas. Se observó la localización de COL7 en injertos compuestos (n = 4) generados con queratinocitos de RDEB el día 10 después de la inyección intradérmica de 1 × 10^6 HDF-GM. Los injertos de control positivo generados a partir de queratinocitos y fibroblastos normales mostraron una tinción intensa de COL7 y los injertos de control negativo no mostraron tinción de COL7 en las mediciones de referencia (flechas en DEJ para comparación de referencia negativa).

La Figura 6 proporciona un esquema del vector plasmídico de expresión lentiviral pSMPUW.

La figura 7 compara las características del vector de expresión lentiviral pSMPUW respecto a los vectores de expresión lentivirales de tercera generación.

La Figura 8 proporciona un esquema del vector de plásmido de expresión lentiviral pFUGW.

La figura 9 representa una micrografía electrónica de partículas del virus VIH-1.

La Figura 10 proporciona los resultados de inmunoprecipitación para GM-HDF de TR8 que detectan la formación de trímeros de C7.

La figura 11A proporciona los resultados de inmunoprecipitación para GM-HDF de TR10 y ER1 que detectan la formación de trímeros C7.

La Figura 11B proporciona los resultados de inmunoprecipitación para TR9 que detectan la formación de trímeros de C7.

La figura 12 muestra los resultados de unión de Lam332 por C7 expresados por GM-HDF.

La Figura 13 proporciona un esquema de la construcción del plásmido del vector lentiviral, que codifica un gen *COL7A1*.

La Figura 14 presenta un esquema de la estructura del genoma de ARN proviral del vector lentiviral INXN-2002.

La figura 15 muestra un esquema que representa los detalles de la partícula del virus INXN-2002 maduro.

La Figura 16 proporciona un esquema del ensayo de inmortalización *in vitro* para evaluar el potencial de genotoxicidad por inserción de INXN-2002.

La Figura 17 representa la morfología y estructuras celulares típicas de FXC-007 en cultivo.

La figura 18 proporciona un gráfico de los niveles de expresión de C7 determinados por ELISA para dosis particulares de GM-HDF de TR8.

La figura 19 proporciona la transferencia western que muestra la inmunoprecipitación de trímeros C7 contra anticuerpos específicos de NC1 producidos por GM-HDF de FCX-007.

La Figura 20 muestra la lectura del ensayo (densidad óptica a 450 nm (OD450)) para un ensayo de unión para detectar la interacción de C7 con laminina 332 o pocillos recubiertos con albúmina de suero bovino (BSA). El C7 unido se detectó usando un anticuerpo específico de NC1 de C7 y un anticuerpo secundario conjugado con HRP.

La Figura 21A representa gráficamente la cantidad de migración celular de fibroblastos de pacientes normales y con RDEB transducidos con LV-COL7 a lo largo del tiempo.

La Figura 21B proporciona imágenes de la migración celular de fibroblastos de pacientes normales y con RDEB transducidos con LV-COL7 a lo largo del tiempo.

La Figura 22 proporciona el esquema para la clonación del gen *COL7A1* humano.

La Figura 23 proporciona el esquema de la clonación del gen *COL7A1* en el vector de expresión pSMPUW para producir el plásmido de transferencia del vector lentiviral INXN-2002, IGE230.

La Figura 24 proporciona la representación esquemática de la construcción del plásmido de transferencia de vector lentiviral INXN-2004 (IGE308).

La Figura 25A representa esquemáticamente los elementos génicos del plásmido IGE308.

La Figura 25B representa esquemáticamente los elementos génicos del plásmido IGE308.

La Figura 26 proporciona el análisis de inmunofluorescencia de injertos compuestos inyectados de GM-HDF.

La Figura 27 proporciona un gráfico que representa los niveles de transcripción de LV-COL7 medidos por su valor de cambio frente a las células de control.

La Figura 28 proporciona imágenes representativas de la tinción de C7 para fibroblastos de RDEB transducidos con INXN-2002 y LV-HA-COL7.

La Figura 29 proporciona una representación gráfica de los niveles de proteína C7 medidos en los líquidos sobrenadantes celulares de GM-HDF transducidos por TR8, TR9, T10 y ER1.

La figura 30 representa gráficamente la corrección de la hipermotilidad de los GM-HDF a lo largo del tiempo para TR8, TR9, TR10 y ER1.

La Figura 31 representa imágenes de inmunofluorescencia indirecta (IF) representativas para examinar la expresión de proteína C7 por células GM-HDF utilizando un anticuerpo específico para C7 con dos aumentos, 20x y 5x. (Solo se ensayó el grupo A para TR12.1 y TR13. Solo se muestra el grupo A de TR8 para comparar con procedimientos anteriores).

La figura 32 proporciona el porcentaje de células positivas para C7 (C7+) de los GM-HDF para cada grupo de experimento de entrenamiento de TR11, TR12.1 y TR13.

La Figura 33 proporciona una representación gráfica de la cantidad de niveles de proteína C7 expresados para TR8, TR11, TR12.1 y 13. Las barras de error representan la desviación estándar; n=3. Solo se muestran los resultados del grupo A para TR8, TR12.1 y TR13.

La Figura 34 proporciona SDS-PAGE/inmunotransferencias para la detección de trímeros de C7 de los GM-HDF (a) TR11, (b) TR12.1 y TR13.

La Figura 35 representa un gráfico de C7 expresado por GM-HDF que se une a Laminina-332 (Lam332) para TR11, TR12.1 y TR13.

La Figura 36 proporciona los resultados de los ensayos de migración celular que representan la corrección de la hipermotilidad (% de migración) a lo largo del tiempo para los GM-HDF para TR11, TR12.1 y TR13. Se proporciona la hipermotilidad de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) y fibroblastos de control de células de epidermólisis ampollosa distrófica recesiva.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo utilizado en el presente documento tienen los mismos significados que entiende normalmente un experto en la técnica en el campo de esta invención. Aunque se puede usar cualquier composición, método, kits y medios para comunicar información similar o equivalente a los descritos en el presente documento para practicar esta invención, las composiciones, métodos, kits y medios preferidos para comunicar información se describen en el presente documento.

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen ciertos términos en el presente documento. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más, "al menos uno" y "uno o más de uno".

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio. Por lo general, el término pretende abarcar aproximadamente o menos del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20% de variabilidad dependiendo de la situación.

El uso del término "o" en las reivindicaciones significa "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o las alternativas se excluyen mutuamente, aunque la descripción apoye una definición que se refiera solo a alternativas y "y/ o."

Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y reivindicación(es), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, tal como “comprender" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, tal como "tener" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, tal como "incluye" e "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, tal como "contiene" y "contener") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos adicionales no citados o etapas del método. Se contempla que cualquier realización descrita en esta memoria descriptiva puede implementarse con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones de la invención se pueden usar para lograr métodos de la invención.

Los ácidos nucleicos y/o las secuencias de ácidos nucleicos son "homólogos" cuando derivan, natural o artificialmente, de un ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico ancestral común. Las proteínas y/o secuencias de proteínas son homólogas cuando sus ADN codificantes derivan, natural o artificialmente, de un ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico ancestral común. Las moléculas homólogas pueden denominarse homólogos. Por ejemplo, cualquier proteína de origen natural, como se describe en el presente documento, puede modificarse mediante cualquier método de mutagénesis disponible. Cuando se expresa, este ácido nucleico mutagenizado codifica un polipéptido que es homólogo a la proteína codificada por el ácido nucleico original. La homología generalmente se deduce de la identidad de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o proteínas (o secuencias de los mismos). El porcentaje preciso de identidad entre secuencias que es útil para establecer la homología varía con el ácido nucleico y la proteína en cuestión, pero se usa rutinariamente tan solo un 25% de identidad de secuencia para establecer la homología. También pueden usarse niveles más altos de identidad de secuencia, p. ej., 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% o más para establecer la homología. Los métodos para determinar los porcentajes de identidad de secuencia (p. ej., BLASTP y BLASTN usando parámetros predeterminados) se describen en el presente documento y están disponibles en general.

Los términos "idéntico" o "identidad de secuencia" en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos de polipéptidos se refiere a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada. Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, normalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más normalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en la que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de manera óptima. Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; por el algoritmo de alineación de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 85:2444; mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (incluidos, pero no limitados a CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligentics, Mountain View Calif., GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., EE. UU.); el programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins y Sharp (1988) *Gene* 73: 237-244 y Higgins y Sharp (1989) CABIOS 5:151-153; Corpet et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-10890; Huang et al (1992) *Computer Applications in the Biosciences* 8: 155-165; y Pearson et al. (1994) *Methods in Molecular Biology* 24:307-331. La alineación también se realiza a menudo mediante inspección y alineamiento manual.

En una clase de realizaciones, los polipéptidos del presente documento son al menos 70%, generalmente al menos 75%, opcionalmente al menos 80%, 85%, 90%, 98% o 99% o más idénticos a un polipéptido de referencia, o un fragmento del mismo, p. ej., medido por BLASTP (o CLUSTAL, o cualquier otro software de alineamiento disponible) utilizando parámetros predeterminados. De manera similar, los ácidos nucleicos también se pueden describir con referencia a un ácido nucleico inicial, p. ej., pueden ser 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 98%, 99% o más idénticos a un ácido nucleico de referencia o un fragmento del mismo, p. ej., medido por BLASTN (o CLUSTAL, o cualquier otro software de alineamiento disponible) utilizando parámetros predeterminados. Cuando se dice que una molécula tiene cierto porcentaje de identidad de secuencia con una molécula más grande, significa que cuando las dos moléculas están alineadas de manera óptima, dicho porcentaje de restos en la molécula más pequeña encuentra un resto coincidente en la molécula más grande de acuerdo con el orden en que las dos moléculas están óptimamente alineadas.

La expresión "sustancialmente idéntico" aplicado a secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos significa que una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia o más, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% y lo más preferiblemente al menos 99%, en comparación con una secuencia de referencia usando los programas descritos anteriormente (preferiblemente BLAST) usando parámetros estándar. Por ejemplo, el programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1992)). El porcentaje de identidad de secuencia se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de una ventana de comparación, en donde la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparecen la base de ácido nucleico o el resto de aminoácido idénticos en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Preferiblemente, la identidad sustancial existe en una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 50 restos de longitud, más preferiblemente en una región de al menos aproximadamente 100 restos, y más preferiblemente las secuencias son sustancialmente idénticas en al menos aproximadamente 150 restos. En una realización más preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las regiones codificantes.

Una "variante funcional" de una proteína descrita en el presente documento puede, por ejemplo, comprender la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia con al menos o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sustituciones de aminoácidos conservadoras. La frase "sustitución de aminoácidos conservadora" o "mutación conservadora" se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con una propiedad común. Una forma funcional de definir propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre proteínas correspondientes de organismos homólogos (Schulz, G. E. y Schirmer, R. H., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, Nueva York (1979)). De acuerdo con dichos análisis, se pueden definir grupos de aminoácidos donde los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferiblemente entre sí y, por lo tanto, se parecen más entre sí en su impacto en la estructura de proteína general (Schulz, G. E. y Schirmer, R. H., véase antes). Los ejemplos de mutaciones conservadoras incluyen sustituciones de aminoácidos de los aminoácidos dentro de los subgrupos anteriores, por ejemplo, arginina por lisina y viceversa, de modo que se pueda mantener una carga positiva; ácido aspártico por ácido glutámico y viceversa, de modo que se pueda mantener una carga negativa; treonina por serina de modo que se pueda mantener un --OH libre; y asparagina por glutamina de modo que se pueda mantener un --NH_2 libre. En una realización de la presente invención, un gen *COL7A1* codifica la proteína C7 o una variante funcional de la misma, siempre que la variante sea capaz de anclar las fibrillas entre la epidermis y la dermis.

Como alternativa o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia con al menos una sustitución de aminoácidos no conservadora. Las "mutaciones no conservadoras" implican sustituciones de aminoácidos entre diferentes grupos, por ejemplo, triptófano por lisina, o serina por fenilalanina, etc. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácidos no conservadora no interfiera con, o inhiba la actividad biológica de, la variante funcional. La sustitución de aminoácidos no conservadora puede potenciar la actividad biológica de la variante funcional, de manera que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en comparación con la secuencia de referencia.

Las proteínas descritas en el presente documento (incluidas partes funcionales y variantes funcionales de las mismas) pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos naturales. Dichos aminoácidos sintéticos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexanocarboxílico, norleucina, ácido α-amino-n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4 -aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β-fenilserina β-hidroxifenilalanina, fenilglicina, α-naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolina-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida del ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α-aminociclopentanocarboxílico, ácido α-aminociclohexanocarboxílico, ácido α-aminocicloheptanocarboxílico, ácido α-(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ-diaminobutírico, ácido α,β-diaminopropiónico, homofenilalanina y α-terc-butilglicina.

La invención incluye los vectores INXN-2002; e IGE308 también denominado en el presente documento INXN-2004, así como vectores sustancialmente idénticos y/u homólogos a los mismos, así como variantes funcionales de los mismos.

El término "paciente" o "sujeto" se refiere a mamíferos, incluidos seres humanos y animales.

El término "tratar" se refiere a reducir o aliviar los síntomas y/o prevenir recaídas y/o la progresión de la DEB, incluyendo RDEB y/o DDEB.

La expresión "células autólogas" se refiere a las células obtenidas y luego devueltas al mismo individuo. En particular, las células pueden extraerse del cuerpo de un paciente con DEB, que posteriormente se pueden modificar genéticamente, cultivar para proliferar y luego devolver al cuerpo del paciente del que se extrajeron originalmente.

El término "transducción" se refiere al suministro de un gen(es) usando un vector viral o retroviral por medio de una infección viral en lugar de una transfección.

La expresión "vector lentiviral de transducción" o "partícula de vector lentiviral de transducción" se refiere a las partículas de vector lentiviral infecciosas formadas a partir de la cotransfección de una línea celular de empaquetamiento con el vector plasmídico de expresión/transferencia lentiviral que comprende el gen *COL7A1* o variante funcional del mismo, un vector(es) de empaquetamiento y un vector de envoltura. El vector lentiviral de transducción se recoge del líquido sobrenadante del cultivo de células productoras después de la transfección. Las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, la línea celular 293T.

La expresión "vector lentiviral" se refiere a un vector que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales fuera de las LTR que derivan principalmente de un lentivirus.

La expresión “vector autoinactivante” (SIN) se refiere a vectores en los que la región promotora-potenciadora de 3’ LTR, conocida como la región U3, se ha modificado (p. ej., por eliminación o sustitución) para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. En consecuencia, los vectores son capaces de infectar y luego integrarse en el genoma del hospedante solo una vez y no pueden pasar más. Los vectores SIN reducen en gran medida el riesgo de crear virus competentes para la replicación no deseados, ya que la región U3 de la 3' LTR se ha modificado para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación, lo que elimina la capacidad de pase del virus.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a soluciones líquidas que, dentro del alcance del buen criterio médico, son adecuadas para su uso en contacto con las células autólogas modificadas genéticamente sin afectar a su actividad y sin ser tóxicas para los tejidos de seres humanos y animales o causar irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones, en consonancia con una relación beneficio/riesgo razonable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable útil puede ser una solución inyectable que es biocompatible con las células autólogas modificadas genéticamente y que no reduce su actividad ni produce su muerte.

La presente descripción se refiere a una terapia con células autólogas genéticamente modificadas para pacientes con deficiencia de C7. Los "pacientes con deficiencia de C7" carecen o tienen una producción sustancialmente reducida de colágeno tipo VII (C7), que es importante para la formación de fibrillas de anclaje en la unión dermoepidérmica (DEJ), lo que da como resultado la epidermólisis ampollosa distrófica (DEB). La presente descripción se refiere a la modificación genética de células obtenidas de un paciente con DEB, tales como fibroblastos o queratinocitos, para insertar un gen *COL7A1* funcional o variante funcional del mismo, expandir las células modificadas genéticamente y administrar una población de células modificadas genéticamente de nuevo al paciente con DEB.

Las células se pueden obtener de un paciente que padece DEB. Se prefieren fibroblastos o queratinocitos. Las células se pueden obtener mediante métodos conocidos, incluyendo muestras de piel de pacientes, raspados y biopsias, por ejemplo. En una realización, las células se obtienen de la piel sin ampollas de un paciente con DEB. En otra realización, las células se obtienen de la piel con ampollas de un paciente con DEB. Las células obtenidas de un paciente con DEB tienen un gen *COL7A1* mutado, no funcional o ausente. Estas células se cultivan utilizando técnicas de cultivo celular convencionales. Las células obtenidas del paciente posteriormente se tratan *ex vivo* con material genético que codifica un gen de colágeno tipo VII funcional (C7) o una variante funcional del mismo.

El gen *COL7A1* tiene el ácido nucleico, SEQ ID NO: 1, que codifica una cadena alfa de 290 kDa, en donde tres cadenas forman una triple hélice (trímero), como se representa en la Figura 1A. C7 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y es la proteína importante para la formación de fibrillas de anclaje en la unión dermoepidérmica (DEJ). Las mutaciones en el gen C7 producen una ausencia o reducción de C7, el cual forma fibrillas de anclaje que mantienen la unión de la epidermis a la dermis. Las fibrillas de anclaje de C7 se unen a otros colágenos, proteínas de la matriz extracelular y Lam332 que median la unión de la dermis a la epidermis, como se muestra en la Figura 1B. La ausencia de fibrillas de anclaje conduce a la formación de ampollas en la piel. Los vectores pueden comprender ácidos nucleicos y polipéptidos sustancialmente idénticos a *COL7A1* y C7 respectivamente. En otro aspecto, los vectores pueden comprender ácidos nucleicos que codifican una variante funcional de la proteína COL7A1 o C7, con la condición de que la variante sea capaz de anclar las fibrillas entre la epidermis y la dermis. En otro aspecto, sólo se puede usar el marco de lectura abierto del gen *COL7A1* que codifica la proteína C7 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de *COL7A1* tiene codones optimizados para aumentar la expresión de C7 en la célula transducida, como se sabe en la técnica.

Según la presente invención, el COL7A1 se puede transducir en las células de DEB obtenidas de un paciente usando un vector lentiviral de transducción, que es defectuoso en la replicación y autoinactivante. Los vectores lentivirales autoinactivantes se obtienen del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), que son pseudotipados con una proteína de envoltura VSV-G heteróloga en lugar de la proteína de envoltura del VIH-1. Como se ha descrito previamente, se introduce una deleción de 400 pb en la región U3 de la LTR que da como resultado un vector autoinactivante (SIN) (Zuffery 1998). Los vectores de la presente invención se distinguen de los vectores SIN de segunda y tercera generación. En particular, los vectores de la presente invención se han modificado para mejorar las características de seguridad y aumentar la capacidad de clonación como se describe más adelante en el presente documento.

Los vectores utilizados para construir los vectores lentivirales de transducción de la presente invención se introducen mediante transfección o infección en una línea celular de empaquetamiento. La línea celular de empaquetamiento produce partículas de vector lentiviral de transducción que contienen el genoma del vector. Después de la cotransfección de los vectores de empaquetamiento, el vector de transferencia y un vector de envoltura a la línea celular de empaquetamiento, el virus recombinante se recupera del medio de cultivo y se titula mediante métodos convencionales usados por los expertos en la técnica. Por lo tanto, las construcciones de empaquetamiento pueden introducirse en líneas celulares humanas mediante transfección con fosfato de calcio, lipofección o electroporación, generalmente junto con un marcador seleccionable dominante, tal como kanamicina, neomicina, DHFR o glutamina sintetasa, seguido de selección en presencia del fármaco apropiado y aislamiento de clones. El gen marcador seleccionable se puede ligar físicamente a los genes de empaquetamiento en la construcción.

Se conocen líneas celulares estables en donde las funciones de empaquetamiento están configuradas para ser expresadas por una célula de empaquetamiento adecuada. Por ejemplo, véase la patente de EE. UU. Nº 5,686,279; y Ory et al., (1996), que describen células de empaquetamiento. Las células de empaquetamiento con un vector lentiviral incorporado en ellas forman células productoras. Las células productoras son, por lo tanto, células o líneas celulares que pueden producir o liberar partículas virales infecciosas empaquetadas que llevan el gen terapéutico de interés. Un ejemplo de líneas celulares de empaquetamiento de vectores lentivirales adecuadas incluye las células 293.

Según la invención, el vector lentiviral de transducción se construye a partir de un vector plasmídico de expresión lentiviral que comprende (a) una repetición terminal larga (LTR) 5' modificada, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) el gen *COL7A1*, (c) al menos un elemento del tracto de polipurina central lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador transcripcional (PRE) del virus de la hepatitis B.

En otro aspecto de la invención, el elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis B eliminado es un elemento regulador postranscripcional PRE de marmota (WPRE).

En otro aspecto de la invención, el vector plasmídico de expresión lentiviral comprende dos o más elementos del tracto de polipurina central lentiviral (cPPT). Se ha descubierto que la incorporación del elemento cPPT aumenta los niveles de expresión génica.

En otro aspecto de la invención, la 3' LTR puede modificarse para eliminar un fragmento de 400 pb (como describe Zuffery 1998), en lugar de la eliminación de 133 pb comúnmente utilizada de vectores de LV SIN de 3ª generación convencionales. Se cree que la eliminación de 400 pb aumenta la seguridad al evitar la transcripción de lectura completa y también aumenta el título viral porque la transcripción del vector es más estable en las células de empaquetamiento.

En otro aspecto más de la descripción, el plásmido de expresión lentiviral puede incorporar un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis B, que es preferiblemente el elemento regulador postranscripcional PRE de la marmota (WPRE). Se ha encontrado que el WPRE aumenta el título viral del vector.

Se ha demostrado que la adición de cPPT y la eliminación de 3' LTR modificada mejoran la función del vector lentiviral que comprende el gen *COL7A1* de la presente invención para aumentar los niveles de expresión génica, el título viral y la seguridad.

La presente invención incluye además el uso de vectores de transferencia lentivirales en los que se eliminan ciertos elementos comunes para los vectores de expresión lentivirales de tercera generación. En particular, las preocupaciones de seguridad para el uso de vectores lentivirales en seres humanos se basan en el temor de generar un lentivirus competente para la replicación, que puede surgir de la recombinación entre genomas divididos de vectores lentivirales de 3ª generación. (Tareen et al., 2013.). La secuencia gag y/o los elementos de respuesta a rev (RRE) pueden eliminarse del vector viral con el fin de reducir la homología de secuencia con otros plásmidos auxiliares y aumentar así la seguridad para los seres humanos. En consecuencia, en una realización de la invención, la secuencia gag está ausente en el vector. En otra realización de la invención, tanto la secuencia gag como la RRE están ausentes en el vector.

Los materiales de partida para generar los vectores lentivirales de la presente invención son preferiblemente un vector de plásmido de expresión lentiviral que comprende un cPPT y un PRE que pueden acomodar la inserción del gen grande *COL7A1* (8.89 kpb) o una variante funcional del mismo. Preferiblemente, el material de partida para construir el vector lentiviral de transducción de la presente invención se selecciona de los vectores plasmídicos de expresión lentivirales, pSMPUW (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA) y pFUGW (Addgene, Cambridge, MA).

En un aspecto de la invención, el vector plasmídico de expresión lentiviral pSMPUW se selecciona para la construcción del vector lentiviral de transducción. La Figura 6 muestra un esquema de los elementos genéticos en el vector plasmídico de expresión lentiviral pSMPUW. Las características del vector de expresión lentiviral pSMPUW se han modificado respecto a los vectores de expresión de lentivirus de 3ª generación con el fin de mejorar los niveles de expresión génica y las características de seguridad, como se representa en la Figura 7. En particular, el vector de expresión lentiviral pSMPUW codifica un sitio de clonación múltiple (MCS) seguido por el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). El elemento gag residual (Δgag) y el RRE se eliminaron de la construcción del vector pSMPUW. Además, la construcción del vector pSMPUW utilizó una deleción mayor de 400 pb en la región U3 de 3'LTR en lugar de la deleción de 133 pb comúnmente utilizada en un vector de LV SIN convencional de tercera generación. El gen *COL7A1* de tipo natural se incorporó en el vector pSMPUW.

En otro aspecto de la invención, el plásmido de expresión lentiviral pFUGW se selecciona para la construcción del vector lentiviral de transducción. La Figura 8 muestra un esquema de los elementos genéticos en este vector de plásmido. Las características del vector pFUGW incluyen un RRE, dos elementos cPPT y un elemento WPRE, que pueden mejorar la producción lentiviral y la expresión transgénica.

En otro aspecto de la invención, el elemento WPRE se ha eliminado del vector lentiviral.

En una realización de la presente invención, las partículas de vector lentiviral de transducción de la presente invención se denominan INXN-2002 (vector plasmídico de transferencia - IGE230) o INXN-2004 (vector plasmídico de transferencia - IGE308), o un vector sustancialmente idéntico que comprende variantes funcionales del mismo.

Las células obtenidas del paciente con DEB se transforman con un gen *COL7A1* funcional. En un aspecto, las células se transducen con un vector lentiviral que tiene el gen *COL7A1*. En otro aspecto, el vector lentiviral es un vector autoinactivante. El número de copias del transgén integradas se puede evaluar usando cualquier método conocido. Por ejemplo, el número de copias se puede determinar mediante PCR cuantitativa, amplificación de sonda dependiente de ligación multiplex, hibridación in situ fluorescente (FISH), selección de número de copias basada en micromatrices y cariotipo convencional. El número de copias de transgén integradas en cada célula puede estar modulado por la dosis de virus administrada a las células durante la producción. El número de copias de transgén integradas por célula en las células de RDEB obtenidas transducidas con un vector que contiene *COL7A1* depende de la dosis.

Las células obtenidas del paciente con DEB y transformadas con el gen *COL7A1* funcional tendrán un gen *COL7A1* funcional y presentan morfologías celulares normales. Se puede hacer que estas células proliferen o se expandan en cultivo usando técnicas de cultivo celular convencionales.

Se observan características morfológicas de fibroblastos normales entre los fibroblastos obtenidos transducidos con vectores de transducción de *COL7A1* dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, las morfologías de fibroblastos normales incluyen células que presentan aspecto alargado, fusiforme o forma de huso con extensiones delgadas. Las morfologías normales incluyen además células que parecen células estrelladas aplanadas más grandes que pueden tener bordes de dirección citoplásmica. La Figura 9 muestra un ejemplo de morfología celular normal para fibroblastos transducidos con un vector de transducción de *COL7A1*.

También se ha observado la producción de C7 producido por células de DEB obtenidas de un paciente y transducidas con un vector de transducción de *COL7A1*. En particular, la formación de trímeros de C7 es importante en el ensamblaje de fibrillas de anclaje. Se ha encontrado que las células de pacientes con DEB transducidas con un vector de transducción de *COL7A1* son capaces de formar los trímeros de C7 con la estructura, tamaño y función correctos.

En un aspecto de la invención, es posible verificar que el C7 expresado por fibroblastos transducidos con un vector de transducción de *COL7A1*, como se define en las reivindicaciones, será capaz de formar fibrillas de anclaje usando inmunoprecipitación con un anticuerpo específico anti-C7. Por ejemplo, el anticuerpo específico anti-C7, fNC1, se puede usar para la captura selectiva y la concentración de C7 de líquidos sobrenadantes de cultivos para la detección por SDS-PAGE/inmunotransferencia. Por ejemplo, las Figuras 9 y 10 demuestran que el C7 producido por fibroblastos transducidos con un vector de transducción de *COL7A1* eran predominantemente triméricos.

En otro aspecto de la invención, la función de C7 puede evaluarse usando métodos conocidos, tales como el uso de un ensayo de unión a laminina o ensayo de migración celular. Se ha demostrado que C7 se une a los componentes de la matriz extracelular (ECM) inmovilizada, incluida la fibronectina, Laminina-332 (Lam332), COL1 y COL4 (Chen, et al., 2002a). La interacción entre C7 y Lam332 se produce a través del dominio NC1 NH2-terminal de C7 y depende de la conformación nativa tanto de Lam332 como del NC1 de C7 (Rousselle, et al., 1997). La asociación entre C7 y Lam332 es importante para establecer la arquitectura correcta de Lam332 en la unión dermoepidérmica. Tal organización es importante para las interacciones con ligandos extracelulares y receptores de superficie celular, y para la señalización celular (Waterman, et al., 2007). En un aspecto de la descripción, se ha desarrollado un ELISA que usa un anticuerpo contra el dominio NC1 de C7 para detectar la unión de C7 a Lam332 purificada. Aunque ya se ha descrito en la bibliografía un ELISA de unión a C7/Lam332 (Chen, et al., 2002a), hasta donde saben los autores de la invención, nunca se ha utilizado para analizar la presencia de C7 en los líquidos sobrenadantes de las células transducidas. Los resultados en la Figura 12 muestran la unión dependiente de la dosis a Lam332 por C7 expresado por los GM-HDF de los experimentos de entrenamiento y genotecnológicos.

Además, se puede utilizar un ensayo de migración celular para evaluar la actividad funcional de C7. Estudios previos han mostrado que los fibroblastos y queratinocitos de RDEB muestran un aumento en la motilidad en relación con sus homólogos normales, y que la motilidad normal se puede restablecer mediante la expresión de C7 (Chen, et al., 2000; Chen, et al., 2002b; Cogan, et al., 2014; Baldeschi et al., 2003). El ensayo adecuado incluye el ensayo de migración de sal de oro coloidal para medir la migración de fibroblastos y queratinocitos, o un ensayo de cicatrización de heridas para medir la migración de queratinocitos. Las células que tienen actividad C7 funcional presentarán una motilidad reducida en relación con las células de RDEB en dichos ensayos.

La presente invención se dirige, en un aspecto, a formulaciones farmacéuticas que comprenden células autólogas modificadas genéticamente de pacientes con DEB. Estas células pueden estar presentes en cualquier cantidad adecuada para la administración al paciente en el que se recogieron originalmente las células. Por ejemplo, estas células pueden encontrarse presentes en una concentración celular de 1.0 - 5.0 × 10^7 células/ml, 1.0 - 4.0 × 10^7 células/ml, 1.0 - 3.0 × 10^7 células/ ml, o 1.0 - 2.0 × 10^7 células/ml. Las células están presentes en una suspensión adecuada para mantener la viabilidad de las células, tal como en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). En particular, la viabilidad de las células en la formulación está presente en una cantidad de ≥ 60%, 70%, 75% u 80%. También pueden estar presentes en la formulación excipientes adecuados, tales como solución salina tamponada con fosfato que puede usarse para lavar las células de viales descongelados que contienen el autólogo genéticamente modificado. Preferiblemente, no está presente rojo de fenol en la formulación final.

Las células modificadas genéticamente autólogas de la presente descripción tienen un número de copias del vector de transducción de al menos o aproximadamente 0.05, 0.09, 0.41 o 0.74 o en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 6.0, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5.5, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5.0, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 4.5, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 4.0, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3.5, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 3.0, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1, de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 1, o de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.75. Preferiblemente, el número de copias del vector de transducción está en el intervalo de aproximadamente 0.1 aproximadamente 5.0. Se ha encontrado que los fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos tienen un número de copias del transgén integradas por célula al menos o aproximadamente 1, 2, 5, 10, 20, 25, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 o 50 veces mayor en relación con una composición de transducción no sometida a espinoculación o supertransducción. Además, los valores de expresión de la proteína C7 de las células FCX-007 de la presente invención son ≥ 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 ng/día/ E6 células. Preferiblemente, los valores de expresión de la proteína C7 de las células autólogas modificadas genéticamente de la presente invención son ≥ 500 ng/día/E6 células. La presente invención también ha encontrado que la expresión de C7 ha aumentado 10, 25, 50, 100, 150 o 200 veces con respecto a los fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos no sometidos a espinoculación o una segunda transducción.

La multiplicidad de infección (MOI) se refiere al número de partículas de vector por célula utilizadas en la transducción. Según la presente invención, el número de copias del vector de transducción deseado se ha logrado incluso cuando las MOI disminuyen, como se muestra en los ejemplos a continuación. Por ejemplo, la invención se refiere a MOI de ≤ 15, < 14, ≤ 13, ≤ 12, ≤ 11 o ≤ 10. Preferiblemente, la MOI es aproximadamente de 1 a 10.

Las formulaciones de la presente invención pueden ser para usar en el tratamiento de diversas enfermedades de pacientes que padecen deficiencia de Tipo VII. En particular, las formulaciones de la presente invención son adecuadas para tratar la DEB, incluyendo DDEB o RDEB. En una realización de la invención, el uso médico es para tratar subtipos de RDEB, incluyendo, pero no limitados a, RDEB de Hallopeau-Seiemens, RDEB no Hallopeau-Siemens, RDEB inversa, RDEB pretibial, RDEB acral y RDEB centrípeta.

La invención se refiere además al uso médico para el tratamiento, reducción, prevención y/o inhibición de diversos síntomas atribuidos a las deficiencias de C7. Por ejemplo, se sabe que la DEB produce cicatrices después de las ampollas, lo que puede causar deformidades por contracturas, dificultad para tragar si están afectados la boca y el esófago, fusión de los dedos de las manos y los pies y movilidad limitada. Por tanto, en un aspecto de la invención se contempla el uso médico para el tratamiento, reducción, inhibición y/o prevención de la pseudosindactilia, también conocida como síndrome de la mano en mitón. En otro aspecto, la invención se refiere al uso médico para el tratamiento, reducción, inhibición y/o prevención de fibrosis profunda y/o cicatrización asociada con la RDEB y/o DDEB, que puede producir milio, contracturas articulares, fibrosis de tejidos blandos generalizada, fibrosis de órganos, lesiones corneales, placas cicatriciales, alopecia cicatricial, distrofia ungueal, anquiloglosia y aumento de la frecuencia de caries dental, por ejemplo. En otro aspecto, la invención se refiere al uso médico para el tratamiento, reducción, prevención y/o inhibición de lesiones en la mucosa oral y lesiones gastrointestinales asociadas con la RDEB. Otra realización se refiere al uso médico para el tratamiento, prevención, reducción y/o inhibición de ampollas asociadas con pacientes con DEB.

La administración de las células autólogas modificadas genéticamente se puede realizar en cualquier momento apropiado, como sería capaz de determinar un experto en la técnica en función de las necesidades del paciente. Por ejemplo, la administración se puede realizar una vez, una vez al día, una vez al mes, una vez al trimestre o 1-2 veces al año.

La formulación de la presente invención que contiene las células autólogas modificadas genéticamente puede

administrarse al paciente mediante cualquier método conocido, que incluye, pero no se limita a inyección, vía tópica, oral o insertada en una matriz biocompatible. La inyección puede ser, p. ej., inyección parenteral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraósea, intraarterial, ocular e intraperitoneal o directa en un órgano/tejido específico, p. ej., próstata o hígado. Por vía tópica, la formulación se puede administrar directamente en un sitio afectado, tal como en el sitio de una lesión. El desbridamiento del tejido afectado puede preceder a la aplicación directa de la formulación en el sitio. Alternativamente, la formulación puede encapsularse en un sistema de administración adecuado, tal como una cápsula de polímero, o insertarse en una matriz o injerto biocompatible, p. ej., matriz de colágeno, en un hidrogel, injerto de piel o malla.

Las células autólogas genéticamente modificadas de la presente invención pueden administrarse solas o en combinación con otros tratamientos para un paciente que padece DEB. Los ejemplos de agentes terapéuticos utilizados para tratar la DEB incluyen el cuidado tópico, tal como Zorblisa, injertos de piel, antiinflamatorios, anticuerpos, otras terapias potenciales basadas en genes o células. En otra realización, las células modificadas de la presente invención pueden administrarse por la piel o zonas mucosas donde las terapias de trasplante de médula ósea (u otras terapias celulares del sistema, tales como las células madre mesenquimales) no proporcionaron una terapia suficiente. La capacidad de expresión de C7 de las células autólogas genéticamente modificadas preferiblemente no se ve afectada por una combinación con otros agentes terapéuticos.

La presente invención se refiere además a un método para potenciar o aumentar el número de copias de transgén integradas por célula en las células modificadas genéticamente obtenidas de pacientes con deficiencia de C7 y transducidas según la presente invención. En particular, se ha encontrado que ciertas etapas durante la transducción mejoraron sustancialmente el número de copias del transgén en estas células. Según la invención, las células obtenidas del paciente deficiente en C7 se ponen en contacto con el vector lentiviral de transducción de la presente invención y esa composición se somete a espinoculación, también conocida como transducción por centrifugación. De esta manera, los vectores lentivirales se centrifugan sobre las células diana. La adición de la espinoculación ha aumentado inesperadamente el número de copias por células en los fibroblastos dérmicos humanos modificados genéticamente en un nivel de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 o 50 veces en relación con una transducción sin espinoculación o transducción. Sin embargo, con el fin de identificar métodos adicionales para aumentar el número de copias, se ha descubierto inesperadamente una segunda etapa de transducción (o supertransducción) en la que las células diana se pasan por la primera transducción con espinoculación, y posteriormente se pasan por una segunda transducción opcionalmente con espinoculación. De esta manera, se ha encontrado que esta supertransducción con espinoculación aumenta el número de copias en un aumento adicional de 2 veces en relación con el método de transducción tradicional original que no incluía espinoculación ni supertransducción.

En otra realización, se ha encontrado que cambiar el vector lentiviral de INXN-2002 a INXN-2004 aumentó el número de copias de transgén en los fibroblastos dérmicos humanos modificados genéticamente en 4 veces con respecto a la transducción tradicional sin espinoculación o supertransducción.

Mediante la evaluación exhaustiva de los números de copias de transgenes integradas, se encontró que el cambio acumulativo de añadir espinoculación, añadir supertransducción con espinoculación y cambiar de INXN-2002 a INXN-2004, en relación con el procedimiento de transducción original que no incluía espinoculación o supertransducción, aumentó inesperadamente el número de copias > 27 veces (véase el Ejemplo 9: comparación de TR12.1 y TR3 con TR8 en estudios originales (que no incluían espinoculación ni supertransducción). Por consiguiente, la presente invención se refiere al aumento del número de copias de las células transducidas del paciente con deficiencia de C7.

Para ilustrar adicionalmente la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

FCX-007 es una suspensión de células vivas de fibroblastos dérmicos humanos autólogos modificados genéticamente usando un vector lentiviral (INXN-2002) (como se muestra en el Ejemplo 1) o un vector lentiviral (INXN-2004) (como se muestra en el Ejemplo 2) para expresar la proteína de colágeno humano tipo 7.

Ejemplo 1

A. Elucidación de la estructura y características de FCX-007 transducidas con el vector lentiviral INXN-2002

Las células FCX-007 derivadas de células con el vector lentiviral INXN-2002 se suspenden en un medio de crioconservación que consiste en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) sin suero fetal bovino (50.0%), Profreeze-CDMTM (42.5%) y dimetilsulfóxido (DMSO) (7.5%). Las características estructurales del principio activo (DS, por sus siglas en inglés *Drug Substance*) FCX-007 incluyen la estructura primaria de las células de fibroblastos dérmicos humanos (HDF) autólogas y la estructura del vector lentiviral utilizado para transducir y modificar genes de las células HDF.

B. Vector lentiviral (INXN-2002)

El vector lentiviral (LV) INXN-2002, que se utiliza para transducir e introducir el gen del colágeno 7A1 humano en las células HDF, es un vector lentiviral recombinante que codifica el gen del colágeno 7A1 humano. El LV INXN-2002 es un

vector lentiviral autoinactivante (SIN) que se construye basado en el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) pseudotipado con una proteína heteróloga de envoltura VSV-G. La partícula de virus para el vector lentiviral INXN-2002 tiene aproximadamente 120 nm de diámetro y está compuesta por numerosas proteínas con dos copias de un genoma de ARN monocatenario. No se dispone de una fórmula molecular específica, peso molecular o estereoquímica.

Las características estructurales del LV INXN-2002 incluyen la estructura primaria del genoma viral de ARN y la estructura de la partícula viral. La estructura primaria del genoma de ARN de INXN-2002 se determina por la secuenciación completa de nucleótidos del genoma viral. La estructura de las partículas virales se deduce de la estructura de las partículas del VIH-1 con pseudotipado de la proteína VSV-G añadida. A continuación se proporciona una visión general de la estructura del ácido nucleico y la estructura de la partícula viral.

C. Estructura del genoma viral de ARN de INXN-2002

El LV INXN-2002 es un vector lentiviral autoinactivante (SIN) que se construye basado en el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) pseudotipado con una proteína heteróloga de la envoltura VSV-G en lugar de la proteína de la envoltura del VIH-1. Se introduce una deleción de 400 pb en la región U3 de la LTR que da como resultado un vector autoinactivante (SIN) (Zuffery 1998). El vector plasmídico de expresión lentiviral pSMPUW (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA) se seleccionó para la construcción del LV INXN-2002. La Figura 6 muestra un esquema de los elementos genéticos en el vector plasmídico de expresión lentiviral pSMPUW.

Los elementos de codificación entre las 5’ y 3' LTR del virus VIH-1 están completamente vaciados. El vector codifica un sitio de clonación múltiple seguido por el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). Con el fin de maximizar la capacidad de clonación del vector, estos elementos se eliminaron digiriendo el vector con BamHI del sitio de multiclonación y KpnI en el extremo 5' de la repetición terminal izquierda 3'. El casete de expresión del gen COL7A1 con un promotor CMV se clona en el vector digerido mediante reasociación monocatenaria para generar la construcción del plásmido del vector lentiviral que codifica el gen COL7A1 como se muestra en la Figura 13.

La construcción del plásmido del vector lentiviral se cotransfecta en células HEK293T con tres plásmidos auxiliares (pCMV-G, pCMV-Rev2 y pCgp) para producir las partículas de vector lentiviral INXN-2002. El plásmido pCMV-G proporciona la proteína de superficie de pseudotipado VSV-G, pCMV-Rev2 proporciona la proteína Rev del VIH-1 para un transporte y empaquetamiento eficientes del ARN, y pCgp proporciona las proteínas enzimáticas virales y estructurales para la producción de las partículas de vector lentiviral INXN-2002. La figura 14 muestra un esquema de la estructura del genoma de ARN proviral del vector lentiviral INXN-2002.

D. Estructura de la partícula del vector lentiviral INXN-2002

El vector lentiviral INXN-2002 se construye basándose en un esqueleto del vector derivado del VIH-1 y tiene una estructura de partícula viral similar al virus VIH-1. La figura 9 muestra una micrografía electrónica de partículas de VIH-1.

La partícula de VIH-1 tiene una forma esférica de aproximadamente 120 nm de diámetro, con un peso molecular estimado de 277 MDa (Carlson 2008). La partícula tiene una membrana de bicapa lipídica atravesada con proteína de envoltura. La proteína de la envoltura interacciona con los receptores de las células diana para la infección y el suministro del genoma viral de ARN a las células diana. En el interior de la partícula viral se puede observar un núcleo-centro en forma de cono, donde se alojan dos hebras del genoma del ARN viral. El núcleo-centro en forma de cono está formado por la proteína de la cápside viral.

Para INXN-2002, se utiliza VSV-G (glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G)) como sustituta de las proteínas de la envoltura del VIH-1, lo que da como resultado una mejor estabilidad del vector, tropismo de la célula diana y eficiencia de transducción (Cronin 2005).

Durante la producción, las partículas virales INXN-2002 se ensamblan y brotan de la superficie de las células HEK293T transfectadas. La proteína VSV-G es proporcionada por el plásmido auxiliar pCMV-G, el núcleo del vector y las proteínas enzimáticas son proporcionadas por el plásmido auxiliar pCgp, y la proteína Rev, que se necesita para el transporte eficiente del genoma de ARN y el empaquetamiento en la partícula viral, es proporcionada por el plásmido pCMV-Rev2. Obsérvese que todas las demás proteínas accesorias del VIH-1, incluidas Vpu, Vif, Vpr, Nef y Tat, se eliminan del vector INXN-2002.

Después de brotar de la superficie de la célula productora, la enzima proteasa empaquetada dentro de la partícula del virus escinde la proteína precursora Gag en sus proteínas constituyentes (MA, CA, NC), para convertir el virión inmaduro en una partícula de vector INXN-2002 infecciosa madura. La figura 15 muestra un esquema que representa los detalles de la partícula de virus INXN-2002 maduro.

Dos hebras del genoma de ARN de INXN-2002 están empaquetadas dentro del núcleo en forma de cono formado por la proteína de la cápside (CA). La proteína de la nucleocápside (NC) forma un complejo estable con el genoma de ARN dentro del núcleo de la cápside. La proteína de la matriz forma una capa en la superficie interna de la membrana. El virus brota a través de la membrana plasmática celular enriquecida con la proteína de envoltura VSV-G y forma la envoltura lipídica. Basado en el reciente análisis tridimensional de la estructura de las partículas de virus VIH-1

(Carlson 2008), la Tabla 1 muestra las proteínas componentes que componen el vector lentiviral INXN-2002 y una breve descripción de la función de cada uno de los componentes.

Tabla 1: Proteínas componentes principales del vector lentiviral INXN-2002

Proteínas componentes	MW de proteína (kD)	Funciones de las proteínas
Cápside (CA)	24	Forma el núcleo-centro
Matriz (MA)	17	Forma la capa de proteína en la superficie interna de la membrana lipídica.
Nucleocápside (NC)	7	Forma un complejo estable con el genoma de ARN.
VSV-G	69	La proteína de la envoltura pseudotipada interacciona y se une a los receptores en las células diana para la transducción para suministrar el genoma del ARN del vector a las células.
Proteasa	11	Desempeña un papel importante en la maduración del vector INXN-2002 escindiendo las proteínas Gag en sus constituyentes funcionales, CA, MA y NC.
Transcriptasa inversa	66/51	Construye una copia de ADN del genoma de ARN viral
Integrasa	31	Inserta la copia de ADN del genoma de ARN viral en el genoma de la célula infectada

E. Caracterización de INXN-2002

La Tabla 2 proporciona una lista de los ensayos de caracterización y las especificaciones para INXN-2002 fabricado por City of Hope. Los resultados del ensayo de caracterización se proporcionan en el CoA adjunto para el número de lote INXN-2002 0786-240-0002-1, el lote previsto para su uso en la fabricación del producto clínico FCX-007.

Tabla 2: Caracterización de INXN-2002

Categoría	Ensayo	Método de ensayo	Laboratorio	SOP	Especificación de objetivo
Identidad	Identidad del vector	RT-PCR	CoH	QC-SOP-0843	Banda del tamaño correcto detectada
	Estabilidad del inserto del vector	Análisis de transferencia Southern	Universidad de Indiana	VP-10-17.16	Comunicar resultado
Potencia	Título físico de antígenos virales (p24)	ELISA	Universidad de Indiana	VP-10-05.06	Comunicar resultado
	Título de TU	Transducción de H1299 con lectura de qPCR	BioReliance	016135.BSV	Comunicar resultado
	Expresión de C7 (Potencia)	ELISA	BioReliance	016136.BSV	Comunicar resultado
Aspecto y pH	Aspecto	Inspección visual	CoH	QC-SOP-0734	Solución opaca
	pH	medidor de pH	CoH	QC-SOP-0675	6.9 - 7.8

F. Caracterización de INXN-2002 mediante un ensayo de inmortalización *in vitro*

El potencial de genotoxicidad por inserción de INXN-2002 se evaluó usando un ensayo de inmortalización in vitro (IVIM). El ensayo se realizó en el Centro Médico del Hospital Infantil de Cincinnati, División de Hematología Experimental y Biología del Cáncer (CCHMC).

El principio del ensayo IVIM se basa en el entendimiento de que las células normales de médula ósea (BM) de linaje negativo (Lin-) dejarán de proliferar después de 3-4 semanas in vitro, pero en presencia de ciertas integraciones de vectores que causan la regulación por aumento de protooncogenes, algunos clones continuarán proliferando después de 5 o más semanas. El número de dichos clones inmortalizados es representativo del potencial oncogénico del vector. Los clones inmortalizados se expanden y se analizan además los marcadores de células madre por FACS, el número de copias del vector por qPCR o el sitio de integración por LAM-PCR. La inserción en sitios de integración comunes (cis) tales como Evil o Prdm 16 se observa con frecuencia en clones inmortalizados generados en ensayos IVIM (Calmels et al., 2005; Modlich et al., 2008).

Se aislaron células de médula ósea (BM) de linaje negativo (Lin-) de ratones C57BL/6 a partir de BM completa mediante separación magnética usando anticuerpos específicos de linaje. A continuación, las células de BM Lin- se cultivaron y estimularon en medio de crecimiento completo durante 2 días. El día 4, las células se transdujeron con el vector INXN-2002 en una placa de 48 pocillos recubierta con RetroNectin (10 µg/cm^2, Takara). La figura 16 muestra una configuración esquemática del ensayo IVIM.

Para mejorar la eficiencia de transducción de INXN-2002 en células de BM Lin-, el vector INXN-2002 se concentró aproximadamente 14 veces usando un concentrador centrífugo. Para la transducción, se añadieron 80 µl del INXN-2002 concentrado a cada pocillo que contenía 1.5 × 10^5 células con 150 µl de medio de transducción. La placa se centrifugó a 1000 g a 32°C durante 70 minutos (espinoculación) para mejorar aún más la eficacia de la transducción. Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO_2 incubadora O/N.

Con el fin de lograr un alto número de copias del vector INXN-2002 en las células de BM Lin- transducidas, la transducción de INXN-2002 se repitió el día 5, día 6 y día 7 para un total de 4 transducciones consecutivas.

Las células de BM Lin- transducidas se expandieron durante 10 días y la concentración celular se ajustó a 2 - 4 × 10^5 células/ml cada dos días, y se suministró medio de nuevo según fuera necesario. El día 10 después de la transducción, se recogieron y contaron las células. Luego, una parte de las células se envió para aislamiento de ADN y qPCR para determinar el número de copias del vector (VCN). Las células restantes se volvieron a poner en cultivo para el potencial cultivo en placa del ensayo IVIM entre los días 18-21.

La Tabla 3 muestra el resultado del experimento del ensayo piloto de células de BM Lin- transducidas con INXN-2002 recogidas el día 10.

Tabla 3: Análisis de células de BM Lin- después de la transducción el Día 10

Artículo de ensayo	Células totales	Viabilidad celular	Copias de vector por célula
INXN-2002	1.5 x10^6	89%	0.09
Vector de control-1	2.7 x10^6	95%	0.81
Vector de control-2	2.1 x10^6	91%	3.58
Simulado	3.0 x10^6	88%	0.0

A pesar del uso del vector INXN-2002 concentrado y las transducciones por espinoculación consecutivas 4x, el número de copias del vector alcanzado en las células de BM Lin- fue significativamente menor que el número de copias objetivo de 1-3 esperado para el ensayo IVIM. El ensayo piloto se terminó.

Debido a los bajos números de copias de vectores experimentados en los ensayos IVIM, así como a los bajos números de copias de vectores logrados en todas los experimentos de transducción de células de fibroblastos de RDEB, se cree que este lote de INXN-2002 presenta un riesgo mínimo de genotoxicidad por inserción cuando se usa para transducir células de fibroblastos de RDEB. No se prosiguió con el análisis de este lote de INXN-2002 mediante el ensayo IVIM.

G. FCS-007 transducidas con INXN-2002

Las células de fibroblastos dérmicos humanos utilizados para la fabricación de FCX-007 se derivan de una biopsia de piel viva. La biopsia se digiere usando Liberase® (Roche) para liberar las células de fibroblastos dérmicos y luego las células se expanden en cultivo usando técnicas de cultivo celular convencionales. Al finalizar la expansión del cultivo después de la transducción de INXN-2002, las células se recogen y se lavan, luego se formulan para que contengan 1.0 - 3.0 × 10^7 células/ml. Se analiza la pureza del DS y se confirma que contiene ≥ 98% de fibroblastos mediante tinción con CD90 con viabilidad celular de ≥ 85%.

Las células FCX-007 transducidas con LV INXN-2002 en la formulación del DS presentan morfologías típicas de fibroblastos cuando se cultivan en superficies de cultivo de tejidos. Específicamente, las células pueden presentar un aspecto alargado, fusiforme o forma de huso con extensiones delgadas, o las células pueden aparecer como células estrelladas aplanadas más grandes que pueden tener bordes de dirección citoplásmica. También se puede observar una mezcla de estas morfologías. La Figura 17 muestra una morfología y estructura celular típica del DS FCX-007 en cultivo.

Las células expresan proteínas características de los fibroblastos normales, incluido el marcador específico de fibroblastos, CD90 (Thy-1), una glicoproteína de superficie celular de 35 kDa, y las proteínas de la matriz extracelular, tal como varios tipos de colágeno.

H. FCX-007 derivadas del vector lentiviral INXN-2002: caracterización de la liberación del principio activo

El principio activo FCX-007 se caracteriza para la liberación en tres etapas durante la fabricación: durante el procedimiento, recolección a granel y después de la crioconservación (DS). La Tabla 4 proporciona una lista de los ensayos de caracterización y las especificaciones para la liberación del DS FCX-007 fabricado por PCT. Los resultados del ensayo de caracterización para el principio activo terminado se proporcionan en los CoT adjuntos para el experimento de entrenamiento 8 grupo A, grupo B y grupo C (control no transducido).

Tabla 4: Caracterización de la liberación del principio activo FCX-007

Etapa	Ensayo	Método de ensayo	SOP	Especificación
En procedimiento	Morfología	Evaluación microscópica	PCT SOP-0334	Pasar
	Confluencia celular	Evaluación microscópica	PCT SOP-0334	Pasar
Recolección a granel	Recuento de células	Hemocitómetro	PCT SOP-0329	≥1E9
	Viabilidad celular	Hemocitómetro	PCT SOP-0329	≥ 85%
Principio activo-criovial	Recuento de células	Hemocitómetro	PCT SOP-0329	1.0-2.7E7 células/ml
	Viabilidad celular	Hemocitómetro	PCT SOP-0329	>/= 85%
	Pureza	FACS	PCT SOP WI-1067	>/= 98% CD-90+
	Nº de copias del gen COL7A1	qPCR	BioReliance109011.BSV	Comunicar resultado
	Expresión de C7	ELISA	PCT SOP-0338	Comunicar resultado

I. Caracterización adicional de DS FCX-007 derivado de INXN-2002

Se ha realizado una caracterización adicional de FCX-007 en los experimentos de producción de entrenamiento para confirmar la expresión de C7 funcional. Las evaluaciones representativas que se muestran a continuación son del experimento de entrenamiento 8 (TR8), donde las células se transdujeron con una dosis alta (3.4 UI/célula) o una dosis baja (1.7 UI/célula) de LV-COL7, o se transdujeron de forma simulada. Estos grupos de transducción también se denominan grupo A, B y C, respectivamente.

J. DS FCX-007 transducidas con INXN-2002: nivel de expresión de C7

Se desarrolló un ensayo de inmunofluorescencia ligada a enzimas (ELISA) con el fin de cuantificar la expresión de C7 por FCX-007. Para este ensayo, los viales del principio activo de TR8 (transducidos en dosis alta, dosis baja y de forma simulada) se descongelaron y cultivaron durante 3 días y los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares acondicionados se recolectaron y se analizó el C7. Los resultados de la Figura 18 muestran la expresión de proteína dependiente de la dosis del virus que varía de 60 a 120 ng/ml de C7 en células transducidas con LV-COL7.

K. DS FCX-007 transducidas con INXN-2002: formación de trímero de C7

Las fibrillas de anclaje se forman a partir del ensamblaje de trímeros de C7. La expresión adecuada y la formación de trímeros de C7 por FCX-007 se pueden detectar por inmunoprecipitación de C7 seguida de análisis de SDS-PAGE no desnaturalizante/inmunotransferencia. Para la Figura 19, se inmunoprecipitó C7 de los líquidos sobrenadantes de cultivos de células FCX-007 en el pase 1 y el pase 2 después de la descongelación usando un anticuerpo específico de NC1 y se separó en SDS-PAGE no desnaturalizante y luego se visualizó mediante transferencia Western. El C7 producido por los fibroblastos de RDEB era predominantemente trimérico (flecha roja; ~870 kDa) expresando las células transducidas con LV-COL7 (grupos de transducción A y B) más C7 que las células transducidas de forma simulada (grupo C, asterisco). También se observaron formas monoméricas (290 kDa) y diméricas (580 kDa). Los controles del ensayo incluyeron inmunoprecipitación de C7 purificado (Pur COL7) e inmunoprecipitación sin anticuerpo ni muestra de ensayo (controles IP).

L. FCX-007 transducidas con INXN-2002: unión de C7 a Lam332

C7 interacciona con la Laminina-332 en la unión dérmica/epidérmica (DEJ). La interacción entre C7 y la Lammina-332 es importante para anclar la funcionalidad de las fibrillas (Chen 2002, Rousselle 1997, Waterman 2007). En Intrexon se desarrolló un ensayo de unión para la detección de esta interacción. Los viales del principio activo (transducido en dosis alta, dosis baja y de forma simulada) se descongelaron y cultivaron durante 2 días. Los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares acondicionados se recogieron y se incubaron con Lam332 o pocillos recubiertos con albúmina de suero bovino (BSA) y se detectó la unión de C7 usando un anticuerpo específico de NC1 de C7 y un anticuerpo secundario conjugado con HRP. La lectura del ensayo es la densidad óptica a 450 nm (OD450). Los resultados en la Figura 20 muestran la unión dependiente de la dosis del virus a Lam332 en comparación con un control de BSA.

M. FCX-007 derivadas de la evaluación de la migración de INXN-2002

Se desarrolló un ensayo de migración para evaluar la función de C7. Chen 2000 ha demostrado que las células de piel del paciente con RDEB migran más rápido que las células de piel normal hacia el margen de una herida artificial creada en los vasos de cultivo de tejidos, y que la aplicación de C7 puede restablecer la tasa de migración. Se descongelaron y cultivaron fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; Lonza) y células de viales de principio activo FCX-007. Las células se sembraron en placas de cultivo con un inserto para evitar la adherencia celular en una pequeña tira de la placa de cultivo. A continuación, se retiró la tira y se controló mediante microscopía la velocidad a

la que las células migraron a la zona abierta y se cuantificó utilizando el complemento de delineación de formas irregulares para el software ImageJ. Las Figuras 21A-21B muestran tanto el porcentaje de migración (A) como las imágenes de migración (B) para este ensayo. Los resultados muestran que los fibroblastos del paciente con RDEB transducidos de forma simulada migran a la zona abierta más rápido que los NHDF, y la transducción con LV-COL7 revierte las células del paciente a una tasa de migración similar a la de los NHDF. Estos resultados son consistentes con los descritos por Chen 2000.

Ejemplo 2: FCX-007 transducidas con vector lentiviral INXN-2004

FCX-007 es un producto de células de fibroblastos autólogos modificados genéticamente por el vector lentiviral INXN-2004 (LV-COL7) para expresar la proteína de colágeno 7 humana (C7). Los materiales utilizados para fabricar DS FCX-007/INXN-2004 que se describen a continuación son similares a los expuestos anteriormente en el Ejemplo 1, excepto que se utilizó el plásmido del vector LV-COL7 IGE-230 para la producción de INXN-2002. Se usó el plásmido del vector LV-COL7 IGE-308 para hacer el vector INXN-2004. Se usaron los mismos plásmidos auxiliares, pCMV-G, pCMV-Rev2 y pCgp para cotransfectar una línea celular 293 WCB.

Vector lentiviral INXN-2004

Plásmido de transferencia del vector LV-COL7 IGE308

El plásmido IGE308 se construyó utilizando métodos de clonación molecular convencionales. El procedimiento de construcción implicó la clonación del gen *COL7A1* humano e introducción del gen *COL7A1* clonado en un esqueleto de vector lentiviral (SIN), pFUGW, para producir el plásmido de transferencia del vector LV-COL7 IGE308.

Clonación del gen *COL7A1* humano

El gen *COL7A1* clonado en el plásmido de transferencia del vector LV-COL7 IGE308 es el mismo gen *COL7A1* clonado en INXN-2002 (plásmido de transferencia de vector IGE230).

Los cebadores se diseñaron y produjeron con la transcriptasa inversa Takara PrimeScript para amplificar el gen *COL7A1* del ADNc genómico humano. Se diseñaron cuatro pares de cebadores, como se muestra en la Tabla 5, cada uno para amplificar aproximadamente 2 kb del gen *COL7A1*.

Tabla 5: Conjuntos de cebadores utilizados para amplificar el gen *COL7A1* humano

Cebador directo	Secuencia de cebador	Cebador inverso	Secuencia de cebador	Tamaño de amplicón esperado (pb)
ColIF1 (SEQ ID NO: 3)	CGACTTGTGTTGGGACTGG CTAGCGCCACCATGACGCT GCGGCTTCTGGTGGC	ColIR3 (SEQ ID NO: 7)	CCCGCACAGTGTAGCTAA GCCC	1753
ColIF3 (SEQ ID NO: 4)	GGGCTTAGCTACACTGTGC GGG	ColIR2 (SEQ ID NO: 8)	CCTTTGGACAATACACTG GGCAGG	2059
ColIF2 (SEQ ID NO: 5)	CCTGCCCAGTGTATTGTCC AAAGG	ColIR4 (SEQ ID NO: 9)	CAGATGCCTTGATGCCAG CAG	2127
ColIF4 (SEQ ID NO: 6)	CTGCTGGCATCAAGGCATC TG	ColIR1 (SEQ ID NO: 10)	CGTGATTTCATTTGCTAC ACGTAATCGATTCAGTCC TGGGCAGTACCTGTCCC	2993

Los productos se amplificaron con dos pares de cebadores (ColIF2/ColIR4 y ColIF4/ColIR1) diseñados para amplificar los 3790 pares de bases (pb) del extremo 5' de *COL7A1* del ADNc genómico humano junto con un extremo saliente 5' para la clonación en el vector de expresión. Los dos productos de PCR de 5' (2127 pb y 2993 pb) se unieron mediante PCR de extensión por superposición para generar un producto final de 3790 pb.

Con el fin de clonar el resto del gen, se sintetizó un fragmento de ADN (341 pb, Col1A1-3, Tabla 6, que abarca los 322 pb finales del gen *COL7A1* con solapamientos con el fragmento de gen de 3790 pb 5' amplificado por PCR y el vector de clonación.

Tabla 6: Secuencia del fragmento Col1A1-3

Fragmento	Secuencia
Col1A1-3 (SEQ ID NO: 11)	CGCTCCCAGAACATCACCTACCACTGCAAGAACAGCGTGGCCTACATG GACCAGCAGACTGGCAACCTCAAGAAGGCCCTGCTCCTCCAGGGCTCC AACGAGATCGAGATCCGCGCCGAGGGCAACAGCCGCTTCACCTACAGC GTCACTGTCGATGGCTGCACGAGTCACACCGGAGCCTGGGGCAAGACA GTGATTGAATACAAAACCACCAAGACCTCCCGCCTGCGCATCATCGAT GTGGCCCCCTTGGACGTTGGTGCCCCAGACCAGGAATTCGGCTTCGAC GTTGGCCATGTCTGCTTCCTGTAAATCGATTACGTGTAGCAAATGAAAT CACG

Los dos fragmentos del gen *COL7A1* (3790 pb y Col1A1-3) se ensamblaron en un vector de expresión inducible (VVN-257673) que se había digerido previamente con NheI y ClaI utilizando el kit de clonación In-Fusion HD. Los clones bacterianos se cribaron por PCR con cebadores específicos del vector principal y secuencia de *COL7A1* para identificar candidatos para la secuenciación. Los clones positivos se confirmaron por digestión y secuenciación de fragmentos de ADN de *COL7A1*. El plásmido resultante se denominó VVN-4311835.

VVN-4311835 y un plásmido de expresión de *COL7A1* (SC300011) adquirido de Origene se digirieron con BstZ17I y SapI. Un fragmento de 6276 pb del gen *COL7A1* se clonó desde SC300011 en VVN-4311835. El plásmido resultante, VVN-4311835 (usaba el mismo número de plásmido), se secuenció completamente y se confirmó que la secuencia de *COL7A1* estaba completa y sin mutaciones.

El plásmido VVN-4311835 se digirió con NheI y ClaI, dos enzimas de restricción con sitios justo fuera de la secuencia codificante de *COL7A1*. El gen *COL7A1* escindido se clonó en un vector de expresión constitutivo, VVN-257231, que también se digirió con NheI y ClaI, para producir VVN-4319958. VVN-4319958 expresa el *COL7A1* humano de longitud completa bajo el control del promotor constitutivo de CMV.

La Figura 22 proporciona un esquema para la clonación del gen *COL7A1* humano.

Introducción del gen *COL7A1* clonado en un vector lentiviral (SIN)

El vector de expresión lentiviral pSMPUW (VPK-211, Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA) se seleccionó inicialmente para la construcción del vector lentiviral INXN-2002 que codifica el gen *COL7A1* basado en sus características de seguridad mejoradas y gran capacidad de clonación.

La Figura 7 compara el vector pSMPUW con un vector LV SIN de 3ª generación convencional. El vector pSMPUW codifica un sitio de clonación múltiple (MCS) seguido por el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). El gag residual (Δgag) y el elemento RRE se eliminaron de la construcción del vector pSMPUW. Además, la construcción del vector pSMPUW utilizó una deleción mayor de 400 pb en la región U3 de 3' LTR en lugar de la deleción de 133 pb comúnmente utilizada en un vector LV SIN de 3ª generación convencional.

Los detalles de la clonación del gen *COL7A1* en el vector de expresión lentiviral pSMPUW para la construcción del vector lentiviral INXN-2002 se describieron antes en el Ejemplo 1, y se describen además más adelante.

Se generó un inserto que contenía un promotor CMV seguido de una secuencia Kozak y una versión truncada del gen *COL7A1* con sitios de restricción BclI y SapI para usar para la introducción de la secuencia codificante completa. Este inserto se sintetizó en dos fragmentos, CColG y ColG2 (IDT) (Tabla 8). Estos dos fragmentos se ensamblaron con el vector pSMPUW digerido utilizando el kit de clonación In-Fusion HD. Los clones positivos se identificaron usando PCR de colonias con un cebador específico para el esqueleto del plásmido (63968-3R) y un cebador específico para el gen *COL7A1* (ColS14). Los plásmidos de clones positivos se purificaron y se confirmó la secuencia para generar IGE228. IGE228 se digirió con FspI y BamHI.

Los primeros intentos de clonar el gen *COL7A1* usando los sitios BclI y SapI no tuvieron éxito. Se ideó una estrategia alternativa utilizando un producto de PCR como un enlazador para circunvalar el sitio de restricción BclI. Se usaron los cebadores EPF5 y ColIR3 para generar un producto de PCR a partir de la plantilla de plásmido VVN-4319958. Este producto se digirió con BamHI, que corta 48 pb secuencia arriba del extremo 5' de *COL7A1,* y FspI, que corta 1630 pb en el extremo 5' de *COL7A1* para generar el enlazador 5'.

El gen *COL7A1* de tipo natural se cortó con FspI y SapI de VVN-4319958. Este fragmento se ligó al IGE228 digerido y al enlazador 5' para generar una construcción de lentivirus para la expresión de *COL7A1*, VVN-4580853 (también denominado IGE230). Los clones positivos se identificaron utilizando los cebadores ColS13, específicos para *COL7A1* y 63968-3R, específico del esqueleto lentiviral. El plásmido se secuenció desde el promotor CMV hasta el extremo 3' de *COL7A1.*

La Tabla 7 a continuación muestra las secuencias de genes sintéticas y los cebadores utilizados para la introducción del gen *COL7A1* en el vector de expresión lentiviral pSMPUW.

Tabla 7: Elementos de genes sintéticos y cebadores

Nombre del elemento génico/cebador	Secuencia
CColG (SEQ ID NO: 12)	TTCAAATTTTCGGGGGATCGCATTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGG TCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAA ATGGCCCGCCTGGTTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAA TGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGTAGTACATCAAGTGTATC ATACGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCT GGTATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT CTGCGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATC AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCC ATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCA AAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTA CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGC TAGCATTGTGTGCTTTTCGGGCCACCATGACGCTGCGGCTTCTGGTGGCCGC GCTCTGCGCCGGGATCCTGGCAGAGGCGCCCCGAGTGCGAGCCCAGCACA GGGAGAGAGTGAC
ColG2 (SEQ ID NO: 13)	AGTGCGAGCCCAGCACAGGGAGAGAGTGACCTGCACGCGCCTTTACGCCG CTGACATTGTGTTCTTACTGGATGGCTCCTCATCCATTGGCCGCAGCAATTT CCGCGAGGTCCGCAGCTTTCTCGAAGGGCTGGTGCTGCCTTTCTCTGGAGC AGCCAGTGCACAGGGTGTGCGCTTTGCCACAGTGCAGTACAGCGATGACCC ACGGACAGAGTTCGGCCTGGATGCACTTGGCTCTGGGGGTGATGTGATCCG CGCCATCCGTGAGCTTAGCTACAAGGGGGGCAACACTCGCACAGGGGCTG CAATTCTCCATGTGGCTGACCATGTCTTCCTGCCCCAGCTGGCCCGACCTGG TGTCCCCAAGGTCTGCATCCTGATCACGTCTCTCATGCAGAGGAGGAAGAG CGGGTACCCCCTGAGGATGATGAGTACTCTGAATACTCCGAGTATTCTGTG GAGGAGTACCAGGACCCTGAAGCTCCTTGGGATAGTGATGACCCCTGTTCC CTGCCACTGGATGAGGGCTCCTGCACTGCCTACACCCTGCGCTGGTACCAT CGGGCTGTGACAGGCAGCACAGAGGCCTGTCACCCTTTTGTCTATGGTGGC TGTGGAGGGAATGCCAACCGTTTTGGGACCCGTGAGGCCTGCGAGCGCCGC TGCCCACCCCGGGTGGTCCAGAGCCAGGGGACAGGTACTGCCCAGGACTG AGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAA
63968-3R (SEQ ID NO: 14)	ATGGAAAAACGCCAGCAACG
ColS14 (SEQ ID NO: 15)	CTGTCACCCTTTTGTCTATG
EPF5 (SEQ ID NO: 16)	GTTGCCGGACACTTCTTGTCCTCT
ColIR3 (SEQ ID NO: 17)	CCCGCACAGTGTAGCTAAGCCC
ColS13 (SEQ ID NO: 18)	AGAGGCCCCGAAGGACTTCA

La Figura 23 proporciona un esquema de la clonación del gen *COL7A1* en el vector de expresión pSMPUW para producir el plásmido de transferencia del vector lentiviral INXN-2002, IGE230.

Los resultados de continuar el desarrollo indicaron que la eliminación del elemento RRE y el uso de una eliminación grande de 400 pb en la región U3 de 3' LTR en la construcción del vector pSMPUW, combinados con el requisito de empaquetar un gen *COL7A1* grande (8.8 kpb), dio como resultado un impacto negativo en la producción del vector LV-COL7 (título infeccioso) y la posterior transducción y expresión de proteína C7 en células de fibroblastos de RDEB.

Se seleccionó un vector SIN de 3ª GEN, pFUGW (FUGW, plásmido n.º 14883, www.addgene.org) para construir un vector LV-COL7 de segunda generación, INXN-2004. INXN-2004 se construyó para mejorar el número de copias del vector. La figura 8 proporciona un esquema de los elementos genéticos en el vector de plásmido de expresión lentiviral pFUGW.

El vector pFUGW contiene un RRE, dos elementos cPPT, así como un elemento WPRE (elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota) para lograr una mejor producción de vectores lentivirales y expresión transgénica. El plásmido de transferencia de vector lentiviral IGE308 se construyó para maximizar la capacidad de clonación de transgenes para adaptarse a la inserción del gen *COL7A1* grande (8.8 kpb).

El elemento WPRE, el promotor hUBC y el gen indicador GFP se eliminaron mediante digestión del vector con PacI y XhoI. Se generó un inserto que contenía el extremo 5' del promotor CMV seguido de un fragmento pequeño del extremo 3' del gen *COL7A1*. Este inserto (ColCN) se sintetizó en IDT como un fragmento G-Block (secuencia en la Tabla 8). El fragmento se ensambló con el vector pFUGW digerido usando un método derivado de clonación de Gibson. Los clones

positivos se identificaron usando PCR de colonias con cebadores específicos del esqueleto del plásmido (FugwQCF y FugwQCR). Los plásmidos de clones positivos se purificaron y se confirmó la secuencia para generar IGE301.

A continuación, se digirió IGE301 con BaeI. IGE230 se digirió con AseI y SapI para crear un fragmento que contenía el extremo 3' del promotor CMV, la 5'UTR y la mayoría del gen *COL7A1*. El fragmento se transfirió al vector IGE301 digerido con BaeI usando un método derivado de la clonación de Gibson. Los clones positivos se identificaron utilizando los cebadores ColS13, específicos para *COL7A1* y FugwQCR, específico del esqueleto lentiviral. Se purificaron plásmidos de clones positivos y se confirmó la secuencia para generar IGE308.

La Tabla 8 a continuación proporciona las secuencias de genes sintéticos y los cebadores utilizados para la introducción del gen *COL7A1* en el vector de expresión lentiviral pFUGW.

Los plásmidos se prepararon con Maxi con el kit MaxiPrep de Qiagen según el protocolo del fabricante.

Tabla 8: Elementos génicos sintéticos y cebadores utilizados en las etapas finales de la creación de IGE308

Nombre del elemento génico/cebador	Secuencia
ColCN (G-block) (SEQ ID NO: 19)	Acagcagagatccagtttggttaattaagcattagttattaatagtaatcaattacggggtcattaagactcggcctta gaaccccagtatcagcagaaccgcgtctctcatgcagaggaggaagagcgggtacccccctgaggatgatgagt actctgaatactccgagtattctgtggaggagtaccaggaccctgaagctccttgggatagtgatgacccctgttcc ctgccactggatgagggctcctgcactgcctacaccctgcgctggtaccatcgggctgtgacaggcagcacaga ggcctgtcacccttttgtctatggtggctgtggagggaatgccaaccgttttgggacccgtgaggcctgcgagcgc cgctgcccacccccgggtggtccagagccaggggacaggtactgcccaggactgatcgataccgtcgacctcga gacctagaaaaacat
FugwQCF (SEQ ID NO: 20)	GTAGACATAATAGCAACAGAC
FugwQCR (SEQ ID NO: 21)	TATTGCTACTTGTGATTGCTC
ColS13 (SEQ ID NO: 22)	AGAGGCCCCGAAGGACTTCA

La figura 24 proporciona una representación esquemática de la construcción del plásmido de transferencia de vector lentiviral INXN-2004 (IGE308).

Producción del plásmido IGE-308

El plásmido IGE308 se produjo utilizando un procedimiento que consiste en cinco etapas: transformación, producción de reserva de glicerol, aumento de escala, captura, diafiltración y formulación.

Transformación: se proporcionó un banco de semillas del plásmido IGE308 a Aldevron para su transformación en *E. coli* competentes (DH10B). Las placas de transformación se almacenaron a 34°C, que es el estándar para construcciones lentivirales.

Producción de reserva de glicerol - se crearon cultivos de semillas seleccionando colonias aisladas de la placa de transformación. Cada cultivo se preparó con miniprep y el mejor cultivo de semillas, determinado mediante gel de agarosa, se usó para hacer las reservas de glicerol de trabajo. Aumento de escala - se cultivó un cultivo de 500 ml en cada uno de los siguientes tipos de medios: medio de crecimiento rápido y medio de rendimiento máximo (para un total de dos cultivos de 500 ml) con el fin de comparar los medios. Los cultivos se inocularon utilizando las reservas de glicerol creadas en la etapa dos y se llevó a cabo un panel completo de ensayos de control de calidad (QC) en cada preparación. Esto también permitió a Aldevron ensayar la estabilidad del plásmido en cada tipo de medio.

Basándose en los resultados iniciales del QC, se eligió el medio de crecimiento rápido para el crecimiento de *E. coli* transformada en matraces agitadores a 34°C. Se preparó un total de 8 L de cultivo.

Captura - Los 8 L de cultivo de *E. coli* se lisaron e inicialmente se purificaron usando cromatografía de intercambio aniónico DMAE que produjo un total de 833.8 mg de plásmido. Se llevó a cabo una etapa de purificación adicional usando cromatografía HIC (cromatografía de interacción hidrofóbica) sobre resina OS. Esta etapa produjo 663 mg de ADN purificado.

Concentración y formulación: el plásmido purificado se ajustó luego al tampón final y la concentración mediante diafiltración en serie. El tampón final utilizado fue TE.

Se envió un total de 200 mg de plásmido IGE308 en una concentración de 1.4 mg/ml. El plásmido IGE308 se analizó antes de seguir con la fabricación de INXN-2004.

Análisis de la secuencia del plásmido IGE308

El plásmido IGE308 utilizado para la fabricación de INXN-2004 se secuenció por completo en SeqWright en condiciones de GLP utilizando paseo con cebador y la síntesis de oligonucleótidos para producir una cobertura de secuencia bidireccional de 4 veces. El plásmido IGE308 tiene un tamaño de 16 777 pb. La secuencia mostró una coincidencia de 100% con la secuencia de referencia de construcción de IGE308 proporcionada a SeqWright. Los elementos génicos en el plásmido IGE308 se ilustran en las Figuras 25A-25B. La Tabla 9 proporciona una lista de elementos génicos con sus funciones correspondientes.

Tabla 9: Tamaño y funciones de los elementos génicos en el plásmido IGE308

Situación	Tamaño (pb)	Elemento	Función
1-238	238	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
239-815	577	promotor CMV	Promotor para impulsar la expresión del genoma proviral
239-1015	777	5' LTR	Empaquetado e integración del genoma proviral
835-894	60	Región R de 5' LTR	Repite la región en 5' y 3' LTR, sitio de inicio de la transcripción
895-1015	121	Región U5 de 5' LTR	La secuencia 5' única contiene el sitio de unión Tat y las secuencias de empaquetamiento del VIH
1016-1125	110	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
1126-1170	45	Señal de empaquetamiento Psi	Sitio objetivo del ARN para empaquetar el genoma del ARN viral en la cápside viral durante la replicación
1171-1679	509	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
1680-1913	234	RRE	Facilita la exportación del núcleo del transcrito de ARNm cuando se une a la proteína Rev
1914-2443	529	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
2444-2459	16	cPPT	Sitio de reconocimiento para la síntesis de ADN proviral, aumenta la eficiencia de transducción y la expresión transgénica
2460-2601	142	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
2602-3199	598	Promotor CMV	Promotor para impulsar la expresión del gen *COL7A1* dentro del vector LV-COL7
3200-3217	18	5UTR	Fragmento 5'UTR sintético para mejorar la traducción del *COL7A1* (derivado de *Rahnella aquatilis*, ATCC 33071)
3218-3223	6	Kozak	Mejora de la traducción
3224-12058	8835	ORF de colágeno 7A1 con codón de parada TGA	ORF de colágeno 7A1 que codifica la proteína de colágeno 7 de tipo natural humano
12059-12070	12	Relleno	Secuencia remanente resultado de la clonación de ADN.
12071-12762	692	3' LTR	Señal de poliadenilación y empaquetamiento e integración del genoma proviral
12071-12581	511	Región U3 de 3' LTR	Deleción SIN (133 pb) ubicada en esta región
12245-12260	16	cPPT	Sitio de reconocimiento para la síntesis de ADN proviral, aumenta la eficiencia de transducción y la expresión transgénica
12582-12641	60	Región R de 3' LTR	Repite la región en 5' y 3' LTR, sitio de inicio de la transcripción
12642-12762	121	Región U5 de 3' LTR	La secuencia 5' única contiene el sitio de unión de Tat y secuencias de empaquetamiento del VIH
12763-12790	28	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
12791-13018	228	Terminador bGHpA	Secuencia para detener la transcripción del ADN
13019-13080	62	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
13081-13387	307	Origen F1	Origen de replicación del fago F1
13388-13948	561	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
13949-14323	375	Gen de resistencia a la zeocina	Marcador de selección de mamíferos
14324-14455	132	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
14456-14575	120	Terminador SV40 pA	Secuencia de parada de transcripción del ADN
14576-15009	434	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
15010-15629	620	Origen pUC	Inicio de la replicación del ADN bacteriano
15630-15783	154	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto

Situación	Tamaño (pb)	Elemento	Función
15784-16644	861	Gen de resistencia a la ampicilina	Marcador de selección de plásmido
16645-16685	41	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto
16686-16714	29	Promotor de resistencia a la ampicilina	Promotor para impulsar la expresión del gen de resistencia a la ampicilina
16715-16777	63	Esqueleto de pFUGW	Elemento de esqueleto

La secuencia del gen *COL7A1* en el plásmido IGE308 (sin el codón de parada TGA) se comparó con la secuencia del colágeno tipo VII, alfa 1 (*COL7A1*) Homo sapiens, de GenBank (NM_000094.3). El alineamiento de la secuencia se proporciona en el Apéndice 4. Se identificaron tres mutaciones puntuales silenciosas como se citan en la Tabla 10 a continuación. No se identificó ningún hueco en la secuencia. Las tres mutaciones puntuales silenciosas no tienen impacto en la proteína C7 codificada.

Tabla 10: Comparación de secuencias de *COL7A1* en IGE308 y consenso de GenBank

Posición del nucleótido	*COL7A1* en IGE308	Consenso GenBank (NM_000094.3)	Impacto
6040	G	A	Mutación puntual silenciosa
8674	A	G	Mutación puntual silenciosa
8731	G	C	Mutación puntual silenciosa

Plásmidos auxiliares, pCMV-G, pCMV-Rev2 y pCgp

CoH proporcionó los tres plásmidos auxiliares utilizados para la producción del vector LV INXN-2004, pCMV-G, pCMV-Rev2 y pCgp.

Banco de células de trabajo 293T (WCB)

CoH proporcionó el WCB 293T utilizado para la producción del vector LV INXN-2004.

Otros materiales de partida para la fabricación de INXN-2004

CoH también proporcionó otros materiales de partida utilizados para la producción del vector LV INXN-2004.

Tejido de biopsia

Se recogen tres biopsias de piel en sacabocados (*punch*) de 3-4 mm (capas de dermis y epidermis) de una zona sin ampollas del cuerpo del sujeto con RDEB usando prácticas asépticas convencionales. Las biopsias son recogidas por el médico tratante, se ponen en un vial que contiene solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril, fría, y se envían al día siguiente en un contenedor refrigerado de transporte de sustancias infecciosas, que es apropiado para enviar tejido potencialmente biopeligroso y está diseñado para mantener una temperatura de 2-8°C.

a. Reactivos, disolventes y materiales auxiliares

i. Reactivos y disolventes

En el procedimiento de fabricación del principio activo FCX-007 se utilizan dos reactivos de origen animal: suero bovino fetal (FBS) y solución de tripsina-EDTA. Medio de crecimiento completo

El medio de crecimiento completo (CGM) se utiliza en la fabricación de FCX-007 durante todas las etapas de expansión del cultivo celular. El CGM se prepara mezclando 18 L de IMDM en una bolsa de 20 L con 2 L de FBS mediante transferencia aséptica. La bolsa de CGM formulada se almacena en un refrigerador a 5±3°C.

a. Medio de crecimiento de iniciación

El medio de crecimiento de iniciación (IGM) se utiliza en la fabricación de FCX-007 para la siembra inicial de fibroblastos después de la digestión de la biopsia en un matraz de cultivo de células T-75 en presencia de antibióticos. El medio de crecimiento de iniciación se prepara reciente mediante la adición de forma aséptica de 0.6 ml de la solución de antibiótico concentrada (GA) 100 veces dentro de una BSC ISO5 a 58.2 ml de CGM en una botella cuadrada de medios de 500 ml. Las concentraciones finales son gentamicina 0.4 mg/ml, anfotericina B 0.295 µg/ml. También se añade solución de GSH (1.2 ml de solución 50X) a la botella cuadrada de medios de 500 ml. Las botellas se cierran y se invierten 3-5 veces para mezclar. El IGM se calienta dentro de una incubadora a 37°C durante al menos 60 minutos

antes de su uso inmediato.

El medio de crecimiento de iniciación se prepara nuevo inmediatamente antes de su uso y, por lo tanto, no se aplica fecha de caducidad ni se realizan pruebas de liberación de control de calidad.

b. Medio de transducción

Se utiliza medio de transducción (TM) durante la transducción de INXN-2004 de células de fibroblastos. El medio de transducción se prepara reciente dentro de una BSC ISO5 añadiendo 40 ml de IMDM a un tubo de centrífuga de 250 ml que contiene 10 ml de CGM para diluir la concentración del FBS al 2% en el medio. El tubo de 250 ml se mezcla y se pone dentro de una incubadora a 37.0°C para que se caliente hasta que se necesite para la transducción de INXN-2004.

El medio de transducción se prepara nuevo inmediatamente antes de su uso y, por lo tanto, no se aplica fecha de caducidad ni se realizan pruebas de liberación de control de calidad.

c. Solución GSH

El GSH se complementa con el medio de crecimiento de iniciación (IGM) y CGM usado en los cultivos de células de fibroblastos T-75 y T-175 en la etapa previa para mejorar el crecimiento celular. Se prepara una solución madre de GSH 50X dentro de una BSC ISO5 disolviendo 51.1 g de GSH en 1 L de IMDM. La solución se filtra a través de 0.22 µm. La solución filtrada se divide en partes alícuotas en tubos de centrífuga de 50 ml con 20 ml por tubo y se almacena congelada a -80°C para su uso posterior.

d. Solución de RetroNectin™

RetroNectin™ se utiliza en el procedimiento de producción de FCX-007 para mejorar la eficiencia de transducción de INXN-2004 en células de fibroblastos. Dentro de una BSC ISO5, usando una jeringa de 5 ml y una aguja de 18 g, se transfieren asépticamente 2.5 ml de WFI a un vial de RetroNectin® de calidad clínica para reconstituir RetroNectin® a 1.0 mg/ml. RetroNectin® se disuelve completamente agitando suavemente. Todo el contenido del vial de RetroNectin® se extrae usando la jeringa de 5 ml adjunta. La aguja 18 g se reemplaza asépticamente con un filtro de jeringa de 0.22 µm en la jeringa, y el RetroNectin® reconstituido se filtra de forma estéril en un tubo de centrífuga de 250 ml. Usando una pipeta del tamaño adecuado, se transfieren 122.5 ml de PBS al RetroNectin® reconstituido en el tubo de centrífuga de 250 ml para diluir el RetroNectin® a 20 µg/ml, que luego se mezcla bien usando una pipeta. Usando una pipeta de tamaño adecuado, se añaden 6.3 ml de la solución de RetroNectin® diluida a cada uno de los matraces T-25 para recubrir la superficie con RetroNectin® a 5 µg/cm^2. Para la primera ronda de transducción de INXN-2004, se preparan matraces T-25 de 5x a 10x. Para la supertransducción de INXN-2004, se preparan matraces T-25 18x.

La solución de RetroNectin™ se prepara nueva inmediatamente antes de su uso y, por lo tanto, no se aplica fecha de caducidad ni se realizan pruebas de liberación de control de calidad.

Medio de crioconservación

El medio de crioconservación es una solución concentrada dos veces que se añade a los fibroblastos recolectados y lavados durante el procedimiento de fabricación de FCX-007 para formular el cultivo de reserva de células y el principio activo FCX-007 para su almacenamiento en nitrógeno líquido. El medio de crioconservación se prepara mezclando 0.85 volúmenes de ProFreeze™-CDM (2X) con 0.15 volúmenes de DMSO para obtener un volumen de medio de crioconservación.

El medio de crioconservación se prepara nuevo inmediatamente antes de su uso y, por lo tanto, no se aplica una fecha de caducidad ni se realizan pruebas de liberación de control de calidad.

Ejemplo 3: Experimento de entrenamiento 8, 9 y 10 y digestión enzimática de biopsia mejorada

Experimento de entrenamiento 8 y digestión enzimática de biopsia mejorada

En los TR anteriores, se sospechaba que el método de digestión de la biopsia no podía lograr una digestión eficaz del tejido de la biopsia de 3-4 mm de tamaño. En el TR8, se incorporó al procedimiento la aplicación de fuerza de cizallamiento adicional durante el proceso de digestión para mejorar la eficiencia general de la digestión. El proceso de digestión se modificó a lo siguiente: agitar con vórtice en pulsos el tubo de centrífuga al ajuste máximo durante 5 segundos, cada 15 ± 2 minutos durante la digestión, devolviendo el tubo de centrífuga al agitador orbital después de cada agitación con vórtice; al final de los 60 minutos de incubación, agitar con vórtice en pulsos el tubo de centrífuga en el ajuste máximo durante 10 segundos.

Se procesó y digirió una biopsia de un donante de RDEB utilizando el método de digestión mejorada. Las células de la digestión se sembraron en un matraz T-75 utilizando medio de cultivo complementado con GSH. Las células mostraron un buen crecimiento y alcanzaron una confluencia de 90% el día 14 para el pase. Para evaluar las condiciones de transducción de INXN-2002, las células recolectadas del matraz T-75 se sembraron en 3x matraces T-175, como control, grupo A y grupo B. Las células de los tres grupos se expandieron, se transdujeron con el vector LV-COL7 piloto 10 L en 1-CS (el grupo de control se transdujo de forma simulada) y luego se expandieron más en 2x

10-CS antes de recolectar para la crioconservación.

Tabla 11: Crecimiento celular y rendimiento celular en el experimento de entrenamiento 8

Actividad	Días de cultivo	Células viables	Viabilidad celular	Nota
Digestión de biopsia, siembra en un matraz T-75, con 35 ml de medio de cultivo, 37°C y 5% de CO_2	0	3.4 x10^5	99%	Se observó un buen crecimiento celular en el matraz T-75; aproximadamente 90% de confluencia el día 14.
Pase 1: a tres matraces T-175 con 50 ml de medio de cultivo, 37°C y 10% de CO_2	14	6.5 x10^6	97%	Matraz 1: control de transducción simulada Matraz 2: transducción de LV (Grupo A) Matraz 3: transducción de LV (Grupo B)
Pase 2: a 1-CS y transducción de LV				Las células se recogieron de cada matraz T-175 y se expandieron en la 1-CS correspondiente para la transducción de LV-COL7 (CoH LV-COL7 Piloto).
Control	20	1.4 x10^7	98%	
Grupo A	20	1.0 x10^7	97%	
Grupo B	20	1.0 x10^7	98%	
Pase 3: a 10-CS				Se recogieron células de cada grupo y se expandieron a una 10-CS correspondiente.
Control	26	6.1 x10^7	99%	
Grupo A	27	6.6 x10^7	99%	
Grupo B	26	6.4 x10^7	99%	
Pase 4: a 2x 10-CS				Se recogieron células de cada grupo y se expandieron a dos 10-CS correspondientes.
Control	35	4.0 x10^8	99%	
Grupo A	39	3.3 x10^8	98%	
Grupo B	38	3.8 x10^8	98%	
Recolección: 2x10-CS				Se recogieron células de cada uno de los 2x10-CS para crioconservación y análisis.
Control	45	6.9 x10^8	95%	
Grupo A	47	4.0 x10^8	98%	
Grupo B	46	5.3 x10^8	97%	

El número total de células recolectadas de la 10-CS se consideró adecuado para la producción adicional del producto farmacéutico FCX-007 para inyección. Las células recolectadas se analizaron para determinar el número de copias del gen COL7A1 (eficiencia de transducción), expresión de la proteína C7, viabilidad celular y pureza celular. La Tabla 12 proporciona los resultados del análisis de las células recolectadas de los tres grupos.

Tabla 12: Análisis de células recolectadas del experimento de entrenamiento 8

Condición	MOI de transducción de INXN-2002 (UI/célula)[1]	Copias de gen COL7A1/ célula[2]	Expresión de proteína C7[2] (ng/ml)	Pureza[2] (% $CD90^+$)	Viabilidad celular (%)	Endotoxina
Grupo A	3.4	0.021	59.4	100%	95%	Pasa
Grupo B	1.7	0.017	46.6	100%	93%	Pasa
Control	Simulado	BLQ[3]	BLQ[3]	100%	96%	Pasa

[1] Título de INXN-2002 UI: 9.2 × 10^6 UI/ml que se determinó en Intrexon utilizando un ensayo de título de infección de H1299 en etapa de desarrollo temprano.

[2] Los detalles de los ensayos se proporcionan en la Sección 3.2.S.4.

[3] BLQ: por debajo del límite de cuantificación

Se observó un aumento dependiente de la dosis de la multiplicidad de infección (MOI) en el número de copias del gen COL7A1 y la expresión de la proteína C7. Los detalles del desarrollo y la optimización de la transducción de INXN-2002 se describen a continuación. Aunque el título bajo de UI de INXN-2002 limitó la MOI de transducción y el posterior número de copias del gen COL7A1, se observó que la expresión de la proteína C7 era biológicamente relevante en el entorno preclínico, como lo demuestran los resultados in vitro e in vivo. En general, los resultados muestran que las células de fibroblastos de RDEB se pueden transducir con INXN-2002 y expresar la proteína C7 funcional.

El producto de células del grupo A del TR8 se utilizó para los estudios demostrativos preliminares y estudios de toxicología y biodistribución.

Experimento de entrenamiento 9

Se procesó y digirió una biopsia de un donante de RDEB utilizando el método de digestión mejorada. Las células de la digestión se sembraron en un matraz T-75 utilizando medio de cultivo complementado con GSH. Al igual que TR8, las células mostraron un buen crecimiento y alcanzaron una confluencia de 90% el día 19 para el pase. Para evaluar las condiciones de transducción de LV-COL7, las células recolectadas del matraz T-75 se sembraron en 3x matraces T-175, como Control, Grupo A y Grupo B. Las células de los tres grupos se expandieron, se transdujeron con el vector LV-HA-COL7 (que contiene un marcador HA en la construcción) en 1-CS (el grupo de control se transdujo de forma simulada), luego se expandieron más en 2x 10-CS antes de ser recolectadas. Las células recolectadas se analizaron para determinar el número de copias del gen COL7A1 (eficiencia de transducción), la expresión de la proteína C7 y la pureza celular. La Tabla 13 proporciona el crecimiento celular en TR9.

Tabla 13: Crecimiento celular y rendimientos celulares en el experimento de entrenamiento 9

Actividad	Días en cultivo	Células viables	Viabilidad celular	Nota
Digestión de biopsia, siembra en un matraz T-75, con 35 ml de medio de cultivo, 37°C y 5% de CO_2	0	NA	NA	Se observó un buen crecimiento celular en el matraz T-75; aproximadamente 90% de confluencia el día 19.
Pase 1: a tres matraces T-175 con 50 ml de medio de cultivo, 37°C y 10% de CO_2	19	4.5×10^6	99%	Matraz 1: control de transducción simulado Matraz 2: transducción de LV (Grupo A) Matraz 3: transducción de LV (Grupo B)
Pase 2: a 1-CS y transducción de LV Control Grupo A Grupo B	 26 25 25	 1.0×10^7 7.1×10^6 7.8×10^6	 99% 97% 98%	Se recolectaron las células de cada matraz T-175 y se expandieron en la 1-CS correspondiente para la transducción de LV-COL7 (CoH LV-HA-COL7 Piloto, un vector de investigación)[1].
Pase 3: a 10-CS Control Grupo A Grupo B	 33 32 31	 3.8×10^7 5.3×10^7 2.5×10^7	 99% 98% 97%	Se recolectaron las células de cada grupo y se expandieron a una 10-CS correspondiente.
Pase 4: a 2x10-CS Control Grupo A Grupo B	 46 42 45	 2.6×10^8 3.6×10^8 2.8×10^8	 97% 98% 97%	Se recolectaron las células de cada grupo y se expandieron a dos 10-CS correspondientes.[2]
Recolección: 2x10-CS Control Grupo A Grupo B	 61 53 60	 7.6×10^8 5.3×10^8 5.5×10^8	 100% 97% 98%	Se recolectaron las células de cada una de las 2x10-CS para crioconservación y ensayo.

[1] El vector LV-HA-COL7 es un vector de investigación que incorporaba un marcador HA a la secuencia de COL7A1 en el vector LV INXN-2002.

[2] El número total de células recolectadas de la 10-CS se considera adecuado para la producción adicional del producto farmacéutico FCX-007 para inyección.

La Tabla 14 proporciona los resultados del análisis de las células recolectadas de los tres grupos.

Tabla 14: Análisis de células recolectadas del experimento de entrenamiento 9

Condición	MOI de transducción de LV-HA-Col7 (UI/célula)[1]	Copias del gen Col7/célula[2]	Expresión de proteína Col7 (ng/ml)	Pureza[2] (% $CD90^+$)	Viabilidad celular (%)	Endotoxina
Grupo A	1.0	0.009	71.4	100%	92%	Pasa
Grupo B	1.9	0.021	91.6	99%	95%	Pasa
Control	Simulado	BLQ[3]	BLQ[3]	100%	92%	Pasa

[1] Título del vector LV-HA-Col7: 2.0×10^6 UI/ml que se determinó en Intrexon utilizando un ensayo de título de infección de H1299 en etapa de desarrollo temprano.

[2] Los detalles de los ensayos se proporcionan en la Sección 3.2.S.4.

[3] BLQ: por debajo del límite de cuantificación

Se observó de nuevo un aumento dependiente de la dosis de la MOI en el número de copias del gen COL7A1 y la expresión de la proteína C7. Una vez más, los resultados muestran que las células de fibroblastos de RDEB pueden cultivarse con éxito, transducirse con el vector LV-HA-COL7 y expresar la proteína C7.

Experimento de entrenamiento 10 y aumento de la escala a seis 10-CS

De acuerdo con el protocolo clínico propuesto (véase el Módulo 5), son necesarias 4×10^8 células del producto farmacéutico FCX-007 para una sola dosis de tratamiento, con la posibilidad de repetir la dosificación. Para cumplir con las necesidades proyectadas del producto FCX-007, es necesario aumentar la escala de la etapa final de expansión celular a seis 10-CS en función de los rendimientos de células alcanzados en el TR8 y TR9.

Se procesó y digirió una biopsia de un donante de RDEB utilizando el método de digestión mejorada. Las células de la digestión se sembraron en un matraz T-75 utilizando medio de cultivo complementado con GSH. Las células mostraron un buen crecimiento y alcanzaron una confluencia de 90% el día 19 para el pase. Las células recolectadas del matraz T-75 se sembraron en 2x matraces T-175, uno para la transducción de INXN-2002 y otro para el control del sustrato celular. Las células de un matraz se expandieron, se transdujeron con INXN-2002 en 1-CS y luego se expandieron más en 6x 10-CS antes de recolectarlas. La Tabla 15 proporciona el crecimiento celular en el TR10.

Tabla 15: Crecimiento celular y rendimientos celulares en el experimento de entrenamiento 10

Actividad	Días en cultivo	Células viables	Viabilidad celular	Nota
Digestión de biopsia, siembra en un matraz T-75, con 35 ml de medio de cultivo, 37°C y 5% de CO_2	0	NA	NA	Se observó un buen crecimiento celular en el matraz T-75; aproximadamente 90% de confluencia el día 19.
Pase 1: a dos matraces T-175 con 50 ml de medio de cultivo, 37°C y 10% de CO_2	19	3.5×10^6	98%	Matraz 1: transducción de LV Matraz 2: células de control para análisis
Pase 2: a 1-CS y transducción de LV	30	4.6×10^6	96%	Las células del matraz 1 se recolectaron y expandieron en 1-CS para la transducción de LV-COL7 (calidad GMP de INXN-2002).
Pase 3: a 10-CS	38	2.1×10^7	97%	Las células se recolectaron y se expandieron a una 10-CS.
Pase 4: a 6x 10-CS	60	1.9×10^8	95%	Las células se recolectaron y se expandieron a seis 10-CS.
Recolección: 6x 10-CS	75	5.8×10^8	99%	Se recolectaron células de las 6x10-CS para crioconservación y ensayo.

En relación con las células en el TR8 y TR9, las células en el TR10 crecieron más lentamente y produjeron menos células en cada etapa de pase, lo que indica una posible variabilidad entre los diferentes donantes de RDEB.

El número total de células recolectadas de las 6x 10-CS se considera adecuado para la producción de una dosis del producto farmacéutico FCX-007 para inyección.

La Tabla 16 proporciona los resultados del análisis de las células recolectadas.

Tabla 16: Análisis de células recolectadas de TR10

MOI de transducción de INXN-2002 (UI/célula)[1]	Copias del gen COL7/célula[2]	Expresión de proteína C7[2] (ng/ml)	Pureza[2] (% $CD90^+$)	Viabilidad celular (%)	Endotoxina
2.0	0.013	60.09	100%	92%	Pasa

[1] Título de INXN-2002 UI: 9.2×10^6 UI/ml que se determinó en Intrexon utilizando un ensayo de título de infección de H1299 en etapa de desarrollo temprano.

[2] Los detalles de los ensayos se proporcionan en la Sección 3.2.S.4.

Ejemplo 4

Desarrollo y optimización de la transducción de INXN-2002

La transducción lentiviral de células de fibroblastos dérmicos se desarrolló y optimizó inicialmente utilizando células de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; Lonza, CC-2511) cultivadas en placas de 96 pocillos con un modelo lentiviral GFP (GeneCopoeia, LP-EGFP-LV105-0205).

Utilizando el protocolo de transducción de LV de GeneCopoeia como punto de partida, la optimización inicial evaluó las condiciones, incluida la densidad celular en el momento de la transducción, el volumen del cultivo de transducción, el uso de RetroNectin™, sobreinfección (retransducción de células con virus en dos días consecutivos), tiempo de siembra de células (en el momento de la transducción frente a un día antes de la transducción) y contenido de suero en los medios de transducción. A continuación, se implementó el procedimiento de transducción óptimo en un entorno de producción GMP. Los detalles de los estudios se describen a continuación.

A. Efecto de las condiciones de siembra celular y recubrimiento de RetroNectin™ para transducción de LV

Los NHDF en fase de crecimiento exponencial se recolectaron y sembraron en placas de 96 pocillos en dos fechas diferentes en diferentes densidades de siembra. Un conjunto de placas de 96 pocillos no tratadas para cultivo de tejidos se recubrieron con RetroNectin™ según la recomendación del fabricante (la densidad del recubrimiento de RetroNectin™ fue de 20 $\mu g/cm^2$). Para las células sembradas un día antes de la transducción de LV (Día -1), se retira el medio gastado y se añade medio nuevo (100 µl) con el vector de LV a los pocillos el Día 0 para la transducción. Para el día de las condiciones de transducción (Día 0), se añaden simultáneamente a los pocillos las células y el vector LV en 100 µl de medio nuevo. La MOI utilizada fue de 2000 pv/célula para todas las condiciones. Después de una incubación durante la noche, se eliminó el medio y las células se alimentaron con 100 µl de medio nuevo para cultivo adicional. Noventa y seis horas después de la transducción, las células se recolectaron para el análisis de la eficiencia de la transducción mediante el análisis FACS de la señal de GFP en un BD LSRII y se analizaron con el software FlowJo (v.10). La Tabla 17 proporciona las eficiencias de transducción de LV en las diferentes condiciones.

Tabla 17: Efecto de las condiciones de siembra celular y recubrimiento de RetroNectin™ en la transducción de LV de células de fibroblastos (% de células positivas para GFP)

Densidad de siembra celular (Células/pocillo; Células/cm^2)[1]	Sin recubrimiento de RetroNectin™		Con recubrimiento de RetroNectin™	
	Siembra de células el Día -1	Siembra de células el Día 0	Siembra de células el Día -1	Siembra de células el Día 0
3000; 9375	6.8%	11.2%	NR	22.6%
1500; 4688	3.3%	7.2%	NR	18.2%

[1] Área superficial para una placa de 96 pocillos: 0.32 cm^2

NR = No realizado

Los resultados demuestran que no es necesario sembrar previamente las células el día anterior a la transducción de LV. Las células y el vector LV se pueden añadir simultáneamente en el momento de la transducción, lo cual es conveniente para las operaciones de fabricación GMP. El recubrimiento de la superficie de cultivo con RetroNectin™ antes de la transducción de LV aumentó significativamente la eficiencia de la transducción del LV. Se desea la mayor densidad de siembra celular de aproximadamente 1×10^4 células/cm^2 durante la transducción de LV, ya que la menor densidad de siembra de células dio como resultado una menor eficiencia de transducción de LV.

B. Efecto de la MOI y supertransducción en la eficiencia de transducción de LV

En este estudio, se examinaron los efectos de la MOI y la supertransducción en la transducción del LV de células de fibroblastos.

Un conjunto de placas de 96 pocillos no tratadas para cultivo de tejidos se cubrió previamente con RetroNectin™ (20 $\mu g/cm^2$) antes de utilizarlas para la transducción. En el momento de la transducción, se añadieron a un pocillo 3000 células con el vector LV en un volumen de 100 µl. Después de una incubación durante una noche, se eliminó el medio y se alimentaron las células con 100 µl de medio nuevo para el cultivo adicional. Para la supertransducción, se retiró el medio de cultivo de los pocillos un día después de la transducción inicial (aproximadamente 24 horas) y se añadió

a los pocillos la misma cantidad de vector LV en 100 µl de medio nuevo. Después de 3 horas de transducción, se eliminó el medio y las células se alimentaron con 100 µl de medio nuevo para cultivo adicional. Noventa y seis horas después de la transducción, las células se recolectaron para el análisis de eficiencia de transducción mediante análisis FACS de la señal GFP en un BD LSRII y se analizaron utilizando el software FlowJo (v.10). La Tabla 18 proporciona las eficiencias de transducción de LV en las diferentes condiciones.

Tabla 18: Efecto de la MOI y supertransducción en la transducción de LV de células de fibroblastos (% de células positivas para GFP)

MOI (pv/célula)	Sin supertransducción	Con supertransducción
0	1.6%	2.0%
200	4.3%	5.8%
500	7.7%	10.0%
1000	15.3%	16.3%
2000	22.6%	27.5%

Una MOI cada vez más alta dio como resultado mayores eficiencias de transducción con y sin supertransducción. La supertransducción dio como resultado un aumento gradual en la eficiencia de transducción de LV. Sin embargo, el aumento no se consideró significativo y no se implementó en el entorno de producción GMP.

C. Volumen de cultivo de la transducción de LV y concentración de FBS

Las partículas del vector lentiviral primero necesitan hacer contacto con las células de fibroblastos en cultivo con el fin de lograr la transducción. Al igual que otras partículas virales, las partículas LV en solución siguen un movimiento browniano y una transducción productiva es generalmente un suceso aleatorio. Se ha demostrado que la reducción de la profundidad del medio de cultivo a un volumen mínimo o el uso de espinotransducción mejora la transducción del vector viral en las células diana (Nyberg-Hoffman 1997). Se evaluó el efecto del volumen de transducción/profundidad de cultivo y la concentración media de FBS en la transducción con LV de células de fibroblastos.

Un conjunto de placas de 96 pocillos no tratadas para cultivo de tejidos se cubrió previamente con RetroNectin™ (20 µg/cm^2) antes de utilizarlas para la transducción. En el momento de la transducción, se añadieron a los pocillos 3000 células con el vector LV en un volumen de 100 µl o 50 µl de medio con FBS al 10%. Se repitieron las mismas condiciones de transducción en medio con FBS al 2%. Después de una incubación durante la noche, se retiró el medio y todas las células se alimentaron con 100 µl de medio nuevo con FBS al 10% para cultivo adicional. La MOI utilizada fue de 2000 pv/célula para todas las condiciones. Noventa y seis horas después de la transducción, las células se recolectaron para el análisis de la eficiencia de la transducción mediante el análisis FACS de la señal de GFP en un BD LSRII y se analizaron con el software FlowJo. La Tabla 19 proporciona las eficiencias de transducción de LV en las diferentes condiciones.

Tabla 19: Efecto del volumen de cultivo (profundidad) y FBS en la transducción de LV (% de células positivas para GFP)

Volumen de medio de transducción en placa de 96 pocillos (µl)	Profundidad de medio de transducción (mm)	% FBS del medio de transducción	
		2%	10%
50	1.6	46.7%	46.2%
100	3.1	31.8%	27%

Como era de esperar, la reducción del volumen del medio de transducción (profundidad) dio como resultado un aumento notable en la eficiencia de transducción de LV. Además, los resultados indican que el uso de un medio de transducción con FBS al 2% es beneficioso para la transducción de LV. Basándose en estos resultados, se incorporó un medio de transducción con FBS al 2% en el procedimiento de fabricación GMP, manteniendo el volumen del medio de transducción al mínimo, aproximadamente 60 ml en 1-CS. En el procedimiento de fabricación GMP para FCX-007, se utilizará una CellSTACK® de 1 capa con una superficie de 636 cm^2 para la transducción de LV de células de fibroblastos. Se determinó que es factible utilizar un volumen de transducción de 60 ml (0.9 mm de profundidad) sin causar un efecto perjudicial (p. ej., secado) en las células durante el período de transducción de 3 horas.

D. Evaluaciones del recubrimiento de RetroNectin™ y tipo de superficie de cultivo

El recubrimiento de RetroNectin™ de la superficie de cultivo aumentó significativamente la transducción de LV de las células de fibroblastos. El fabricante de RetroNectin™ recomienda una cantidad de recubrimiento de RetroNectin™ en el intervalo de 4 µg/cm^2 a 20 µg/cm^2. Para minimizar la cantidad de RetroNectin™ utilizada sin afectar negativamente a la transducción del LV de las células de fibroblastos, se evaluó la cantidad de RetroNectin™ utilizada para el recubrimiento.

Además, el fabricante de RetroNectin™ recomienda el uso de una superficie de plástico no tratada para cultivo de

tejidos para el recubrimiento de RetroNectin™. Sin embargo, los matraces de cultivo y las CellSTACK® utilizados para el cultivo celular de fibroblastos están todos tratados para cultivo de tejidos. Tanto las placas de 96 pocillos tratadas para cultivo de tejidos como las no tratadas para cultivo de tejidos se recubrieron con diferentes cantidades de RetroNectin™ y se evaluó la transducción con LV de células de fibroblastos.

Tanto las placas de 96 pocillos tratadas para cultivo de tejidos como las no tratadas para cultivo de tejidos se recubrieron previamente con diferentes cantidades de RetroNectin™ (20 µg/cm^2 10 µg/cm^2 y 5 µg/cm^2) antes utilizarlas para la transducción. En el momento de la transducción se añadieron a cada pocillo 3000 células con vector LV en un volumen de 50 µl de medio de transducción con FBS al 2%. Después de 3 horas de transducción, se retiró el medio y todas las células se alimentaron con 100 µl de medio nuevo con FBS al 10% para el cultivo adicional. La MOI utilizada fue de 2000 pv/célula para todas las condiciones. Noventa y seis horas después de la transducción, las células se recolectaron para el análisis de la eficiencia de la transducción mediante el análisis FACS de la señal de GFP en un BD LSRII y se analizaron con el software FlowJo. La Tabla 20 proporciona las eficiencias de transducción de LV en las diferentes condiciones.

Tabla 20: Efecto de la cantidad de RetroNectin™ y tipo de superficie de cultivo en la transducción con LV de células de fibroblastos (% de células positivas para GFP)

Tipo de superficie de cultivo	Cantidad de RetroNectin™ utilizada para recubrimiento (µg/cm^2)		
	5	10	20
Tratada para cultivo de tejidos	27.8%	25.8%	28.1%
No tratada para cultivo de tejidos	38.2%	38.8%	38.5%

Se observaron eficiencias comparables de transducción de LV de los fibroblastos para las tres dosis de RetroNectin™ utilizadas para el recubrimiento. Como resultado, se seleccionó una densidad de recubrimiento de RetroNectin™ de 5 µg/cm^2 para usar en el procedimiento de producción de FCX-007. Aunque se observó una menor eficiencia de transducción de LV en la superficie tratada para cultivo de tejidos, la diferencia no se considera lo suficientemente significativa para evitar el uso de matraces tratados para cultivo de tejidos en la etapa de transducción de INXN-2002 del procedimiento de fabricación de FCX-007.

Resumen del desarrollo y optimización de la transducción con LV de fibroblastos

Basándose en los resultados del estudio descritos anteriormente utilizando el vector modelo LV-GFP para la transducción de células de fibroblastos, se seleccionó el siguiente protocolo de transducción de LV para la transducción con INXN-2002 de células de fibroblastos derivadas de donante de RDEB:

Recubrir previamente la superficie de cultivo con RetroNectin™ a 5 µg/cm^2. Los matraces tratados para cultivo de tejidos se pueden utilizar para el recubrimiento con RetroNectin™.

Añadir las células y vector LV simultáneamente en el momento de la transducción, con una densidad de siembra celular de aproximadamente 1 × 10^4 células/cm^2.

Utilizar una MOI alta que no cause efectos tóxicos en las células para lograr una alta eficiencia de transducción (10 ml de vector de LV-Col7 INXN-2002 por transducción).

Transducir durante 3 horas a 37°C en un medio de transducción con FBS al 2% y luego cambiar o alimentar las células con un medio que contenga FBS al 10%.

Utilizar un volumen de medio de transducción bajo, 50 µl/pocillo para una placa de 96 pocillos o 60 ml para una CellSTACK® de 1 capa, para una alta eficiencia de transducción.

No se requiere supertransducción.

F. Transducción con el LV INXN-2002 de células de fibroblastos

Basándose en el protocolo de transducción de LV desarrollado anteriormente, se utilizó INXN-2002 para transducir células de fibroblastos humanos normales (NHDF, Lonza, CC-2511) en una placa de 96 pocillos. Teniendo en cuenta el título relativamente bajo de INXN-2002, se utilizaron tres dosis de INXN-2002 para la transducción, 12.5 µl (dilución 1:4), 3.1 µl (dilución 1:16) y 0.8 µl (dilución 1:64). Las células transducidas se sometieron a pases tres veces para asegurar la integración estable del vector LV-COL7 en el genoma celular transducido. En el pase 3, se extrajo el ADN genómico de las células y se analizó por qPCR utilizando un cebador específico para la secuencia del vector LV-COL7. La eficiencia de transducción se cuantificó como número de copias del gen por célula. La Tabla 21 proporciona la eficiencia de transducción medida por el número de copias del gen por célula.

Tabla 21: Transducción con INXN-2002 de células de fibroblastos

Dosificación del vector INXN-2002[1]			Número de copias del gen por célula[2]
Factor de dilución	Volumen de vector por pocillo de placa de 96 pocillos (µl)	MOI calculada (UI/célula)	
1/4	12.5	40	0.08
1/16	3.1	10	0.86
1/64	0.8	2.5	0.11

[1] Título de INXN-2002 UI: 9.2×10^6 UI/ml que se determinó en Intrexon utilizando un ensayo de título de infección de H1299 en etapa de desarrollo temprano.

[2] El número de copias del gen por célula se determinó en Intrexon utilizando un ensayo de qPCR en etapa de desarrollo temprano, lo que dio como resultado un número de copias del gen aproximadamente 10 veces mayor en comparación con el ensayo completamente desarrollado que se transfirió a BioReliance para el análisis del producto FCX-007. La diferencia se debió al uso de un conjunto de cebadores de qPCR y patrones de plásmidos circulares diferentes en el ensayo de la etapa de desarrollo inicial.

En la dosis más alta del vector INXN-2002, ¼ de dilución (MOI= 40), se observó un efecto tóxico significativo en las células: la mayoría de las células no se recuperaron de la etapa de transducción, lo que produjo un número mínimo de copias de genes por célula al final de la expansión celular. La MOI óptima de INXN-2002 fue de aproximadamente 10 UI/célula, lo que daba como resultado un número de copias del gen de 0.86.

Transducción del LV INXN-2002 en experimentos de entrenamiento

Siguiendo el protocolo de transducción de LV (Sección [0260]) y los resultados de dosificación/MOI del vector de transducción INXN-2002 de los estudios de 96 pocillos, la transducción de INXN-2002 de células de fibroblastos de RDEB se realizó a escala en TR8, TR9 y TR10. La CellSTACK® de 1 capa utilizada para la transducción de INXN-2002 se recubrió previamente con RetroNectin™ a 5 µg/cm^2. En el momento de la transducción, se añadieron las células e INXN-2002 simultáneamente en 60 ml de medio de transducción con FBS al 2% a la CellSTACK® de 1 capa. Después de 3 horas en la incubadora a 37°C, las células se alimentaron con 130 ml de medio de crecimiento completo con FBS al 10%. Las células transducidas se sometieron a pases dos veces, primero a una CellSTACK® de 10 capas y luego a dos o seis CellSTACK® de 10 capas para la recolección de células. Los números de copias del gen en las células recolectadas se analizaron por qPCR. La Tabla 22 proporciona los resultados de transducción de INXN-2002 de los experimentos de entrenamiento ejecutados.

Tabla 22: Resumen de la transducción de LV-COL7 en experimentos de entrenamiento

Experimento de entrena-miento	Vector LV-COL7	Título del vector LV-COL7 (UI/ml)	Grupo	Cantidad de vector utilizado para la transducción (ml) (factor de dilución)	Número de células para la transducción	MOI[1] (UI/célula)	Copias de gen por célula[2]
8	LV-COL7 INXN-2002 (Piloto)	$9.2x10^6$	A	3.75 (1/16)	$1.0 x10^7$	3.4	0.021
			B	1.88 (1/32)	$1.0 x10^7$	1.7	0.017
			Control	0	$1.4 x10^7$	0	BLQ_1
9	LV-HA-COL7 (Piloto)	$2.0x10^6$	A	3.75 (1/16)	$7.1 x10^6$	1.0	0.009
			B	7.5 (1/8)	$7.4 x10^6$	1.9	0.021
			Control	0	$1.0 x10^7$	0	BLQ[3]
10	LV-COL7 INXN-2002 (GMP)	$2.3x10^6$	TR10	4 (1/15)	$4.6 x10^6$	2.0	0.013

[1] La MOI se determinó basándose en el título en IU del vector LV-Col7 INXN-2002 determinado en Intrexon usando un ensayo de título de infección de H1299 en etapa de desarrollo temprano, que dio como resultado un valor de título aproximadamente 10 veces mayor en comparación con el ensayo completamente desarrollado que se transfirió a BioReliance para el análisis del producto FCX-007. La diferencia se debió al uso de un conjunto de cebadores de qPCR y patrones de plásmidos circulares diferentes en el ensayo de la etapa de desarrollo temprano.

[2] Las copias del gen por célula se cuantificaron utilizando el ensayo de qPCR completamente desarrollado, que se transfirió a BioReliance para el análisis del producto FCX-007

[3] BLQ: Por debajo del límite de cuantificación

Siguiendo el protocolo de transducción de LV desarrollado con placas de 96 pocillos a pequeña escala, se logró la transducción exitosa con INXN-2002 de células de fibroblastos de RDEB a escala para la fabricación de FCX-007. El número de copias de gen en las células transducidas aumentó con una mayor MOI de transducción. Debido al título bajo de INXN-2002, el número de copias del gen en el producto de células recolectadas transducidas fue relativamente bajo. Con el fin de producir el producto de células FCX-007 con un número de copias de gen alto factible, se seleccionaron 10 ml de INXN-2002 para la transducción en la producción GMP, ya que causaba efectos tóxicos mínimos en las células durante la transducción.

Experimento genotecnológico (ER)

En la preparación para la fabricación GMP de FCX-007 y la finalización de los registros de lotes maestros (MBR) de producción, se realizó un experimento genotecnológico utilizando una biopsia de un donante de RDEB con registros de lotes de producción aprobados. El vector LV INXN-2002 de calidad GMP se usó para la transducción. La Tabla 23 proporciona cifras de crecimiento celular del experimento de ingeniería.

Tabla 23: Crecimiento celular y rendimientos celulares en el experimento genotecnológico

Actividad	Días en cultivo	Células viables	Viabilidad celular	Nota
Digestión de biopsia, siembra en un matraz T-75, con 35 ml de medio de cultivo, 37°C y 5% de CO_2	0	9.6 x10^5	92%	Buen crecimiento celular en el matraz T-75, alcanzó aproximadamente 90% de confluencia el día 19
Pase 1: a un matraz T-175 y un matraz T-25, 37°C y 10% de CO_2	20	3.5 x10^6	99%	Matraz T-175: transducción con LV Matraz T-25: células de control para análisis
Pase 2: a 1-CS y transducción con LV	29	9.9 x10^6	98%	Se recolectaron células del matraz T-175 y se expandieron en 1-CS para la transducción con LV-COL7 (INXN-2002 calidad GMP)
Pase 3: a 10-CS	38	3.3 x10^7	98%	Las células se recolectaron y se expandieron a una 10-CS.
Pase 4: a 6x 10-CS	49	3.1 x10^8	96%	Las células se recolectaron y se expandieron a seis 10-CS.
Cosecha: 6x 10-CS	60	9.6 x10^8	97%	Las células se recolectaron de las 6x10-CS para la crioconservación y ensayos.

El crecimiento celular y los rendimientos del ER son comparables a los del TR8 y TR9, y son notablemente más rápidos y más altos en relación con el TR10, lo que indica la variabilidad del crecimiento celular entre diferentes donantes con RDEB. Las células recolectadas se cargaron y crioconservaron como se muestra en la Tabla 24.

Tabla 24: Viales del principio activo FCX-007 llenados en el experimento genotecnológico

Viales	Volumen de llenado (ml)	Número de viales llenados	Objetivo
criovial de 2 ml	1.2	10	Principio activo a granel
criovial de 5 ml	4.5	6	Principio activo a granel
criovial de 2 ml	1.2	2	Ensayo de esterilidad
criovial de 2 ml	0.6	4	Ensayo de QC
criovial de 2 ml	0.6	6	Ensayo de estabilidad del principio activo a granel

El número total de células recolectadas de las 6x 10-CS se considera adecuado para la producción de dos dosis del producto farmacéutico FCX-007 para inyección.

Las células recolectadas se analizaron de acuerdo con las especificaciones del principio activo FCX-007 propuestas. La Tabla 25 proporciona los resultados del análisis para las células recolectadas.

Tabla 25: Análisis del experimento genotecnológico del principio activo FCX-007

Ensayo[1]	Método de ensayo	Laboratorio	SOP	Especificaciones	Resultado del ensayo
Micoplasma	USP<63>	BioReliance	102063GMP.BSV	Negativo	Negativo
Lentivirus competente para replicación	Célula C8166	BioReliance	009130GMP.BUK	No se detectó RCL	ND[4]
Esterilidad	USP<71>	BioReliance	510120GMP.BSV	Sin crecimiento	Sin crecimiento
Endotoxina	Endosafe	PCT	SOP-0249	≤ 5.0 UE/ml	< 2.00 UE/ml
Recuento de células	Hemocitómetro	PCT	SOP-0329	1.0 - 3.0x10^7 células/ml	1.6x10^7 células/ml
Viabilidad celular	Hemocitómetro	PCT	SOP-0329	≥ 85% viabilidad	94%
Pureza	FACS Calibur	PCT	SOP-1067	≥ 98% CD 90^+	100%

Ensayo[1]	Método de ensayo	Laboratorio	SOP	Especificaciones	Resultado del ensayo
Proteína VSV-G residual	ELISA de VSV-G	Intrexón[2]	ELISA VSV-G	Informe de resultados	BLQ
Número de copias del gen COL7A	qPCR	Intrexón[2]	Número de copias del gen COL7A	Informe de resultados	0.025 copias/célula
Expresión del gen COL7A	ELISA de Col7	Intrexón[3]	Expresión del gen COL7A	Informe de resultados	66.4 ng/ml

[1] Los detalles de los ensayos se proporcionan en la Sección 3.2.S.4.2.

[2] Ensayo interno de Intrexon. Los ensayos se están transfiriendo a BioReliance para el ensayo de liberación de GMP

[3] Ensayo interno de Intrexon. Los ensayos se están transfiriendo a PCT para el ensayo de liberación de GMP

[4] El ensayo de RCL no se realizó en el material del producto celular ya que el material no se usó para estudios adicionales

Ejemplo 5 - Descripción del desarrollo del procedimiento de fabricación para mejorar la eficiencia de transducción con LV-Col7

Los productos celulares FCX-007 fabricados usando el procedimiento descrito anteriormente tenían niveles bajos de eficacia de modificación génica, como indica el bajo número de copias del gen y niveles de expresión de C7 cuando se utilizó el vector INXN-2002 para la transducción celular. Se siguieron dos enfoques para aumentar la eficiencia de transducción de LV-Col7 en células de fibroblastos de RDEB: 1) desarrollo de un nuevo vector lentiviral LV-Col7 (INXN-2004) que ofrece un mejor título de vector y una expresión transgénica estable mejorada (colágeno VII) en las células de fibroblastos transducidas, y 2) mayor optimización del procedimiento de transducción con LV-Col7 en células de fibroblastos. Los detalles del desarrollo del nuevo vector INXN-2004 se describen en la Sección 3.2.S.2.3. A continuación se describen los estudios de la optimización adicional del procedimiento de transducción con LV-Col7, así como los procedimientos de expansión celular.

Transducción por centrifugación (espinoculación)

La transducción por centrifugación implica la centrifugación de vectores virales sobre las células diana en un entorno de fuerza g. Se ha descrito en la bibliografía que la transducción por centrifugación (espinoculación) aumenta la eficiencia de la transducción del vector retroviral en las células diana (*J Virol Methods*. agosto de 1995; 54 (2-3): 131-43. “Centrifugal enhancement of retroviral mediated gene transfer”. Bahnson AB1, Dunigan JT, Baysal BE, Mohney T, Atchison RW, Nimgaonkar MT, Ball ED, Barranger JA. y *Hum Gene Ther*. enero 1994; 5 (1): 19-28. “Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy”. Kotani H1, Newton PB 3º, Zhang S, Chiang YL, Otto E, Weaver L, Blaese RM, Anderson WF, McGarrity GJ.).

Se cultivaron células de fibroblastos de RDEB del TR8 anterior. Las células en fase de crecimiento exponencial se recolectaron y utilizaron para este estudio. Los lotes de vector INXN-2002 anteriores se utilizaron para la transducción. Para la transducción por centrifugación, se añadieron 1×10^3 células con diferentes MOI de INXN-2002 en 50 µl de medio de transducción (IMDM + FBS al 2%) a cada pocillo de placas recubiertas para cultivo de tejidos de 96 pocillos que se recubrieron previamente con RetroNectin (5 µg/cm^2). Las placas que contenían células más el vector INXN-2002 se centrifugaron a 1300 g, 4°C durante 1.5 horas. Después de la centrifugación, las placas se pusieron en una incubadora a 37°C para permitir que las células se recuperaran y crecieran durante 3 horas. Después de lo cual, se añadieron a cada pocillo 100 µl de medio de cultivo completo (IMDM +10FBS+GSH). Las placas se devolvieron a la incubadora para el cultivo adicional. La transducción convencional sin centrifugación descrita anteriormente se usó como control. Después de la transducción, las células se sometieron a pases tres veces, 3-5 días de cultivo entre cada pase celular. En el último pase, se recolectaron los líquidos sobrenadantes del cultivo para evaluar los niveles de expresión de la proteína C7, mientras que las células se recolectaron para el análisis del número de copias del gen por célula. La Tabla 26 muestra los niveles de expresión de Col7 para las diferentes condiciones de transducción.

Tabla 26: Nivel de expresión de C7

INXN-2002	MOI (UI/célula)	Dilución del vector utilizada para la transducción	Método de transducción	
			Transducción por centrifugación	Transducción sin centrifugación
Lote GMP	6.31		257.4±62.17	311.75±70.89
	1.60		539.50±70.49	251.27±22.41
	0.4		243.94±3.40	207.51±25.26
Lote piloto	30		327.76±21.69	238.56±27.93
	15		391.59±42.82	208.39±16.80
	7.5		269.07±25.51	214.23±16.83

La Tabla 27 proporciona el número de copias del vector por célula de las células recolectadas.

Tabla 27: Número de copias de vector por célula

INXN-2002	MOI (UI/célula)	Dilución del vector utilizada para la transducción	Método de transducción	
			Transducción por centrifugación	Transducción sin centrifugación
lote GMP	6.31		0.11±0.02	0.10±0.02
	1.60		0.11±0.01	0.06±0.00
	0.4		0.10±0.03	0.04±0.01
lote piloto	30		0.09±0.01	0.06±0.02
	15		0.09±0.02	0.05±0.01
	7.5		0.05±0.03	0.07±0.02

INXN-2002, título UI: 2.36 × 10 UI/ml (determinado en Intrexon)

INXN-2002, título UI: 2.36 × 10^6 UI/ml (determinado en Intrexon)

Los resultados muestran un aumento modesto tanto en los niveles de producción de Col7 como en el número de copias del vector por célula usando el método de transducción por centrifugación, especialmente a las MOI más bajas y en las diluciones del vector INXN-2002 ensayadas.

Optimización de los parámetros de transducción por centrifugación

Se evaluaron los parámetros de transducción por centrifugación, incluidos el tiempo de centrifugación, la velocidad y la temperatura, con el objetivo de aumentar aún más la eficiencia de transducción de INXN-2002. En este estudio se utilizaron las mismas condiciones de cultivo celular descrita anteriormente. En el experimento inicial, se examinó la temperatura de centrifugación. Se centrifugaron placas de 96 pocillos que contenían células más el vector INXN-2002 a 4°C o 25°C (TA) durante 1.5 horas a 1300 g. A esto le siguió otro experimento donde se centrifugaron placas de 96 pocillos que contenían células más el vector INXN-2002 a 4°C o 25°C (TA) durante 1 o 2 horas, a una velocidad alta de 1300 g o a una velocidad baja de 300 g, para examinar el efecto de la velocidad de centrifugación en la eficiencia de transducción de INXN-2002. En ambos experimentos, las células se devolvieron a una incubadora a 37°C para la incubación posterior a la centrifugación. Tres horas más tarde, se añadieron a cada pocillo 100 µl de medio de cultivo completo. Las células se sometieron a pases tres veces antes de ser recolectadas para el análisis de la expresión de Col7 en el líquido sobrenadante del cultivo y el análisis del número de copias del vector por célula en las células recolectadas.

La Tabla 28 proporciona el efecto de la temperatura de transducción por centrifugación sobre los niveles de expresión de Col7 y el número de copias del vector por célula. La transducción convencional sin centrifugación se incluyó como un control.

Nuevamente, se demostró una mayor transducción de INXN-2002, como lo indica la expresión de proteína C7 y el número de copias de vector por célula más altos, usando transducción por centrifugación en comparación con la transducción sin centrifugación convencional. La temperatura de transducción por centrifugación no demostró impacto en la eficiencia de transducción general.

La Tabla 29 a continuación proporciona el efecto de la velocidad de centrifugación, así como de la temperatura y el tiempo en la eficiencia de transducción del INXN-2002.

Tabla 28: El efecto de la temperatura de transducción por centrifugación en la eficiencia de transducción del INXN-2002

MOI INXN-2002	Expresión de C7 (ng de C7/día/E6 células)			Número de copias de vector por célula		
	Sin centrifugación	Transducción por centrifugación		Sin centrifugación	Transducción por centrifugación	
		4°C	TA		4°C	TA
18	105.84±11.69	177.36±24.98	313.59±39.13	0.07±0.04	0.07±0.02	0.08±0.03
6	117.82±14.79	196.26±23.75	143.61±19.01	0.02±0.01	0.08±0.03	0.05±0.00
2	50.05±13.60	136.55±6.82	105.57±17.90	0.01±0.00	0.02±0.00	0.03±0.02

Título de INXN-2002 UI: 2.36 × 10^6 UI/ml (determinado en Intrexon)

Tabla 29: Efecto de la temperatura, tiempo y velocidad de la transducción por centrifugación en la eficiencia de transducción del INXN-2002

MOI INXN-2002	Expresión de C7 (ng de C7/día/E6 células)								Número de copias de vector por célula							
Temp.	4°C				TA				4°C				TA			
Velocidad (x g)	1300		300		1300		300		1300		300		1300		300	
Tiempo (h)	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
3.8	208.88 ±13.61	247.03 ±10.09	221.49±4.08	310.93 ±0.41	359.47 ±3.85	201.06±5.37	168.98 ±3.34	201.82 ±9.41	0.08 ±0.01	0.07 ±0.01	0.06 ±0.01	0.09 ±0.03	0.11 ±0.01	0.06 ±0.01	0.07 ±0.01	0.07 ±0.02
1.9	180.34 ±12.33	265.44 ±1.33	213.83±058	301.82 ±11.54	240.61 ±2.68	180.36±3.10	212.76 ±3.19	177.16 ±5.92	0.06 ±0.02	0.10 ±0.02	0.05 ±0.00	0.06 ±0.01	0.10 ±0.02	0.07 ±0.02	0.06 ±0.01	0.05 ±0.01

Título de INXN-2002 UI: 2.36×10^6 UI/ml (determinado en Intrexon)

Los resultados indican una modesta mejora en la eficiencia de transducción de INXN-2002, indicado por la expresión de la proteína C7 y el número de copias del vector, cuando la transducción por centrifugación se realizó a TA, 1300 g, durante 1 hora. Se desconoce la significación de la mejora y se seleccionaron los parámetros de transducción por centrifugación desarrollados inicialmente (centrifugación a 1300 g durante 1.5 horas a 4°C) para uso en estudios futuros.

Supertransducción para aumentar más la eficiencia de la transducción del INXN-2002

La supertransducción (una segunda transducción) se evaluó en el desarrollo temprano de la transducción de INXN-2002, que se describe anteriormente. La supertransducción se evaluó nuevamente en combinación con la transducción por centrifugación para aumentar aún más la eficiencia de transducción de INXN-2002 en células de fibroblastos. A diferencia del método anterior, en el estudio actual, la supertransducción se realizó en las células un pase después de la transducción por centrifugación inicial. Se espera que la inclusión de un pase de células permita que las células se recuperen de la transducción por centrifugación inicial y se vuelvan más receptivas a la 2ª supertransducción.

De manera similar, se recolectaron y usaron para este estudio células de fibroblastos de RDEB del TR8 anterior en fase de crecimiento exponencial. Para la transducción del INXN-2002 se utilizó el método de transducción por centrifugación optimizado descrito anteriormente, centrifugación a 1300 g durante 1.5 horas a 4°C. Las células transducidas se sometieron a pase una vez a las 72-96 horas después de la transducción por centrifugación inicial. Después de 72-96 horas de cultivo en el segundo pase, las células se recogieron y se volvieron a transducir utilizando las mismas condiciones de transducción por centrifugación. Después de la supertransducción por centrifugación, las células se sometieron a pase tres veces adicionales antes de recolectarlas para el análisis de la expresión de Col7 en el líquido sobrenadante del cultivo y el análisis del número de copias del vector por célula en las células recolectadas. Para el estudio se utilizó el vector INXN-2002. La Tabla 30 proporciona el efecto de la supertransducción por centrifugación en la eficiencia de transducción del INXN-2002.

Tabla 30: Efecto de la supertransducción por centrifugación

MOI INXN-2002	Expresión de proteína C7		Número de copias de vector por célula	
	Una ronda de transducción por centrifugación	Supertransducción por centrifugación	Una ronda de transducción por centrifugación	Supertransducción por centrifugación
1.9	257.8±3.37	431.9±95.5	0.07±0.03	0.22±0.07

Título de INXN-2002 UI: 2.36×10^6 UI/ml (determinado en Intrexon)

La supertransducción por centrifugación dio como resultado un aumento significativo en la eficiencia de transducción de INXN-2002 en células de fibroblastos de RDEB. La expresión de la proteína C7 aumentó aproximadamente 1.7 veces y el número de copias del vector por célula aumentó aproximadamente 3 veces.

Los datos demuestran un aumento de 40% en la expresión de Col7 y un aumento de 60% en el número de copias por célula con la transducción adicional. Debido a este aumento, se añadió la superinfección al protocolo de producción.

Transducción con el vector INXN-2004

Simultáneamente con el desarrollo del método de transducción mejorado, también se desarrolló un nuevo vector LV-Col7 (al que se hace referencia como "INXN-2004") basado en un esqueleto de vector lentiviral diferente (es decir, pFUGW).

Transducción por una sola centrifugación de INXN-2004

Las células de fibroblastos de RDEB del TR8 anterior en fase de crecimiento exponencial se recolectaron y usaron para este estudio. En el primer estudio, se llevó a cabo una sola ronda de transducción por centrifugación, como se describe anteriormente, utilizando un lote piloto del vector INXN-2004. La transducción convencional sin centrifugación se incluyó en el estudio como control. Las células se sometieron a pases tres veces antes de recolectarlas para el análisis de la expresión de Col7 en el líquido sobrenadante del cultivo y el análisis del número de copias del vector por célula en las células recolectadas. La Tabla 31 proporciona los niveles de expresión de Col7 y el número de copias del vector por célula utilizando la transducción del vector INXN-2004.

Tabla 31: Expresión de la proteína C7 y número de copias del vector por célula usando la transducción de INXN-2004

INXN-2004 MOI	Expresión de proteína C7		Número de copias de vector por célula	
	Sin transducción por centrifugación	Transducción por centrifugación	Sin transducción por centrifugación	Transducción por centrifugación
17	2312.46±0.03	3960.58±0.02	0.16±0.03	0.05±0.02
4.25	1668.46±0.06	3602.10±0.06	0.21±0.06	0.27±0.06
1.06	724.12±0.03	2566.88±0.10	0.06±0.03	0.21±0.10
0.27	168.61±0.00	1936.72±0.00	0.02±0.00	0.13±0.00

Título de INXN-2004 UI: 2.36×10^6 UI/ml (determinado en Intrexon)

Respecto al vector INXN-2002, se logró una mejora significativa en la eficiencia de transducción con el uso de INXN-2004 en combinación con el método de transducción por centrifugación. Además, el vector INXN-2004 parece ser significativamente más activo en la transducción de células de fibroblastos de RDEB incluso en condiciones de transducción sin centrifugación, como lo indica la expresión de proteína C7 aproximadamente 10 veces mayor y el número de copias del vector por célula. Los resultados apoyan el uso de la base pFUGW para la construcción del nuevo vector INXN-2004.

De acuerdo con lo descrito anteriormente, la transducción por centrifugación parece exacerbar el efecto tóxico del vector INXN-2004 en las células de fibroblastos en condiciones de MOI más altas, como lo indican los niveles más bajos de expresión de C7 y el número de copias del vector a la MOI17. Esto no afecta a la fabricación de FCX-007 ya que se ha demostrado que el uso de una MOI más baja es igual de efectiva.

Supertransducción por centrifugación de INXN-2004

En el segundo estudio, se utilizó la supertransducción por centrifugación (como se describe anteriormente) para la transducción de INXN-2004. La escala de transducción se aumentó de una placa de 96 pocillos a un matraz T-25. Los parámetros de transducción permanecieron sin cambios, incluido la misma densidad de recubrimiento de RetroNectin™ de 5 µg/cm2, y la misma densidad celular en la transducción de 1×10^4 células/cm^2. El volumen de transducción en el matraz T-25 fue de 4.2 ml. Para la transducción, el matraz T-25 que contenía las células y el virus se centrifugó a 4°C, durante 1.5 horas a 1300 g. Las células se devolvieron a una incubadora a 37°C y se incubaron durante tres horas. Después de la incubación inicial, se añadieron 4.2 ml de medio de cultivo completo al matraz para la incubación adicional. Las células se sometieron a pases tres veces antes de recolectarlas para el análisis de la expresión de Col7 en el líquido sobrenadante del cultivo y el análisis del número de copias del vector por célula en las células recolectadas. La Tabla 32 proporciona el efecto de la supertransducción por centrifugación en la eficiencia de transducción del vector INXN-2004. Se utilizó un lote piloto del vector INXN-2004 para el estudio.

Tabla 32: Efecto de la supertransducción por centrifugación para el vector INXN-2004

INXN-2004 MOI	Expresión de proteína C7		Número de copia de vector por célula	
	Transducción por una sola centrifugación	Supertransducción por centrifugación	Transducción por una sola centrifugación	Supertransducción por centrifugación
0.11	3178±20.53	4029±59.67	0.12±0.007	0.57±0.134

Título de INXN-2004 UI: 2.36×10^6 UI/ml (determinado en Intrexon)

Como se observó para el vector INXN-2002 anterior, la supertransducción por centrifugación dio como resultado un aumento significativo, aproximadamente 5 veces, en el número de copias del vector por célula en las células de transducción, a pesar de un aumento relativamente modesto en el nivel de expresión de la proteína Col7, bajo unas condiciones de transducción de MOI baja.

Resumen de desarrollo y optimización de la transducción

Se lograron mejoras significativas en la eficiencia de transducción de LV-Col7 en células de fibroblastos de RDEB en el desarrollo continuo del procedimiento, tanto con el vector INXN-2002 anterior como con el nuevo INXN-2004. Las mejoras son para permitir la fabricación de un producto celular FCX-007 biológicamente potente. Basándose en los resultados del estudio de desarrollo del procedimiento de fabricación, se eligió el siguiente procedimiento de transducción para la fabricación de FCX-007 utilizando el vector INXN-2004 para la transducción.

Recubrir previamente la superficie de cultivo con RetroNectin a 5 µg/cm^2. Se utilizan matraces tratados para cultivo de tejidos para el recubrimiento con RetroNectin™.

Añadir células y el vector INXN-2004 simultáneamente en el momento de la transducción. La densidad de siembra celular es de aproximadamente 1×10^4 células/cm^2.

Centrifugar la mezcla de transducción de células y vector INXN-2004 en el recipiente de transducción a 4°C, durante 1.5 horas a 1300 g.

Incubar las células durante 1.5 a 2.0 horas a 37°C después de la transducción en medio de transducción con FBS al 2% y luego cambio o alimentación de las células con medio de cultivo completo con FBS al 10%.

Usar un volumen de medio de transducción bajo (50 µl/pocillo para una placa de 96 pocillos o 0.35 ml/cm^2).

Llevar a cabo una supertransducción en las células después de un pase posterior a la transducción inicial.

Ejemplo 6 - Análisis de fibroblastos dérmicos humanos modificados genéticamente de RDEB transducidos por INXN-2002

Se analizaron fibroblastos dérmicos humanos modificados genéticamente de RDEB (GM-HDF) derivados del vector lentiviral INXN-2002 con el fin de:

Evaluar la localización de la expresión de COL7 en injertos de piel humanos compuestos establecidos (preparados en dermis porcina) compuestos por queratinocitos de RDEB mediante inyección ID.

Evaluar la potencial carcinogenicidad/tumorigenicidad en piel humana de RDEB compuesta injertada (preparada en dermis porcina) en ratones SCID tratados con GM-HDF de RDEB

Un intento inicial de evaluar la función de GM-HDF (derivados de INXN-2002) mediante la siembra de fibroblastos en el lado reticular de cultivos de injertos compuestos no tuvo éxito, posiblemente debido a la migración inadecuada de los GM-HDF a la dermis porcina desvitalizada o al tiempo insuficiente para la difusión adecuada y depósito de rC7 el día 19. Se utilizó un enfoque alternativo para evaluar la función mediante inyección ID directa de injertos existentes en seis animales de respaldo en el estudio. Los injertos compuestos de RDEB preparados en dermis porcina parecen ser más robustos de lo previsto, lo que hace posible la inyección directa en injertos de piel de RDEB establecida. Este enfoque imita más de cerca la enfermedad y la vía de administración clínica.

Este informe de estudio presenta datos de una evaluación inicial de la inyección ID de GM-HDF en injertos de RDEB establecidos. Se planean estudios adicionales para lograr objetivos a largo plazo para la farmacología in vivo.

A. Materiales de estudio

A.1 Artículo(s) de ensayo

Se preparó el artículo de ensayo y se ensayaron las especificaciones de liberación del principio activo antes del envío. El artículo de ensayo para inyección de injerto de piel se preparó un día antes de cada día de tratamiento programado. El GM-HDF se descongeló, se lavó, se resuspendió en DMEM y se evaluó frente a las especificaciones de liberación. El GM-HDF se envió para entrega al día siguiente y se administró dentro de las 48 horas. Se aisló y expandió el HDF de RDEB no corregido (transducido de forma simulada) del mismo paciente que el GM-HDF mediante los mismos métodos.

El artículo de ensayo y las células que se utilizarán para la preparación de injertos de piel compuestos se enviaron congelados. Las células utilizadas para la preparación de injertos de piel se descongelarán y se cultivarán para el ensayo.

El número de lote TR8 (Control no transducido) se utilizó como control negativo de RDEB-HDF. El número de lote TR8 Grupo A (GM-HDF-LV-COL7) se utilizó como artículo de ensayo de GM-HDF.

El análisis del artículo de ensayo se realizó en las instalaciones de fabricación antes del envío. El artículo de ensayo restante se almacenará a -70°C durante 1 año. El artículo de ensayo se almacenará en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM).

A.2. Otros productos químicos y materiales

Se proporciona una lista de otros materiales a continuación en la Tabla 33.

Tabla 33: Otros materiales del estudio

Descripción	Fuente
Piel porcina normal	Cadáver porcino
Queratinocitos de RDEB	Biopsia de piel humana
Fibroblastos de RDEB	Biopsia de piel humana
Queratinocitos normales	Biopsia de piel humana
Fibroblastos normales	Biopsia de piel humana

Células del grupo 1 (control negativo): las células de RDEB no transducidas del donante del experimento de entrenamiento 8 se descongelaron y se pasaron una vez antes de la transfección. Dos días después del pase de las células, las células se recogieron y se transfectaron 1.2×10^6 células en un tubo cónico de 50 ml en medio de crecimiento de bajo contenido de suero (ATCC PCS-201-030 y PCS-201-041) utilizando el agente de transfección basado en lípidos Transfex (ATCC) con el plásmido COL7 VVN 4317513. Después de una incubación de 10 minutos con complejo Transfex, ADN y Optimem (LifeTech), 1×10^6 células transfectadas se transfirieron a un matraz T150, y 2×10^5 células se pusieron en un T25 y se pusieron en una incubadora a 37°C 5% de CO2 durante 16 horas, momento en el que se retiró el medio y se reemplazó con medio de crecimiento completo (IMDM (Sigma), L-glutatión reducido 920 mg/l (Sigma) FBS inactivado por calor al 10% (Atlantic Biologicals) y 1XGlutamax (LifeTech)). A continuación, las células se devolvieron a la incubadora a 37°C 5% de CO2 hasta el momento del envío. En el momento del envío, todos los matraces de células se llenaron hasta su capacidad máxima, de forma que todas las partes del matraz estuvieran en contacto con el medio independientemente de la orientación del matraz.

B. Diseño del estudio

B.1. Aleatorización

Debido a las altas tasas de fracaso de los injertos de piel humana de RDEB, los ratones de estos grupos de animales no se aleatorizan.

B.2. Justificación de la especie y número en el estudio

El ratón NOD. CB.17-PRKDC scid/scid es la especie convencional para usar en estudios de eficacia/toxicología preclínica demostrativos preliminares y es una especie de roedor de elección para dichas evaluaciones utilizando modelos de xenoinjerto humano. Este estudio se diseñó para minimizar el número de animales en estudio que proporcionarían datos suficientes para evaluar los artículos de ensayo.

B.3. Vía de administración

Los fibroblastos se administrarán por inyección intradérmica para injertos de piel normales. A los injertos compuestos se les administrarán células mediante siembra antes del injerto.

B.4. Administración de dosis

Las inyecciones de células intradérmicas de GM-HDF de RDEB transducidos con lentivirus (corregidos por COL7A1) (usando INXN-2002) y controles negativos (vehículo o RDEB-HDF) se realizarán con una aguja de calibre 30. La inyección se realizará perforando primero la piel y luego dirigiendo la aguja lo más superficialmente posible hacia arriba hacia atrás, hacia la superficie.

A los injertos compuestos se les administrarán células mediante siembra antes del injerto de acuerdo con el protocolo descrito en el estudio in vitro con la distinción de que el sistema de cultivo compuesto no se elevará a la interfase aire-líquido antes del injerto.

B.4.1. Preparación de fibroblastos para inyección (injertos compuestos)

Los fibroblastos se retiraron del almacenamiento en nitrógeno líquido una semana antes de la inyección, se descongelaron en un baño de agua a 37°C hasta que quedó un pequeño cristal de hielo, luego se desinfectaron y se transfirieron a BSC. Los viales se resuspendieron en 10 ml de volumen de lavado de PBS y se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 RPM. El líquido sobrenadante se descartó y las células se lavaron en DMEM + FBS al 10% 1x medio antibiótico y se volvieron a centrifugar durante 10 minutos a 1000 RPM. El sedimento se resuspendió en el volumen apropiado y se sembró en placas TC de 15 cm. Los medios se cambiaron cada dos días y se sometieron a pases a confluencia del 80% hasta que los injertos estaban listos para inyectar. El día de la inyección, los fibroblastos se tripsinizaron, se neutralizaron en DMEM+ FBS al 10% y se centrifugaron durante 10 min a 10000 RPM, el sedimento de células se resuspendió y se tomó una parte alícuota de células, las células se contaron con tinción de azul de tripano para determinar la viabilidad. Las células se resuspendieron de tal manera que se extraen en la jeringa 1.0×10^6 células en un volumen de 50 ul. Se colocó una aguja de 30 g y se puso a 4°C hasta que el ratón estuvo listo para ser inyectado.

Tabla 34: Injertos de piel compuestos (siembra de fibroblastos)

Grupo	N	Sexo	Injerto de piel compuesto		Número de células		Recogida de muestras
			Queratinocitos	Fibroblastos	Queratinocitos	Fibroblastos	
1	3	M	WT	WT	1×10^6	1×10^6	Día 15
2	3	M	Queratinocitos de RDEB	RDEB HDF	1×10^6	1×10^6	Día 15
3	3	M	Queratinocitos de RDEB	RDEB-GM-HDF	1×10^6	1×10^6	Día 15
4	3	M	Queratinocitos de RDEB	RDEB-GM-HDF	1×10^6	5×10^5	Día 15
5	3	M	Queratinocitos de RDEB	RDEB-GM-HDF	1×10^6	2.5×10^5	Día 15
6	3	M	Queratinocitos de RDEB	RDEB-GM-HDF	1×10^6	1.25×10^5	Día 15

Tabla 35: Injertos de piel compuestos (inyecciones intradérmicas de fibroblastos)

Grupo	N	Sexo	Artículo de ensayo	Dosis	Inyección	Descripción del injerto
1.	2.	M..	RDEB-HDF	1 x10^6	Injerto compuesto	1 millón de GM-HDF de RDEB, 1 millón de KC de RDEB
2.	4.	M..	RDEB-GM-HDF	1 x10^6	Injerto compuesto	0.125 millones de GM-HDF de RDEB, 1 millón de KC de RDEB

Tabla 36: Grupos de estudio para la evaluación de xenoinjertos inyectados por vía ID

Condición	Condiciones de preparación previas a la siembra del injerto		Fibroblastos Inyectados	Fecha de recolección
Grupos de control	Queratinocitos	Fibroblastos		
Normal	KC normales	FB normales	N/A	Día 19 post-injerto
FDEB	RDEB	RDEB	N/A	Día 19 post-injerto
Grupos experimentales				
1A	RDEB	TR8/A 1 millón	TR8 no transducidos	10 días post-inyección
1B	RDEB	TR8/A 1 millón	TR8 no transducidos	10 días post-inyección
2A	RDEB	TR8/A 0.125 millones	TR8/GrupoA	10 días post-inyección
2B	RDEB	TR8/A 0.125 millones	TR8/GrupoA	10 días post-inyección
2C	RDEB	TR8/A 0.125 millones	TR8/GrupoA	10 días post-inyección
2D	RDEB	TR8/A 0.125 millones	TR8/GrupoA	10 días post-inyección

C. Injertos de piel

C.1 Injertos de piel humana con RDEB

C.1.1 Fibroblastos

Los fibroblastos humanos modificados genéticamente (GM-HDF de RDEB) producidos por transferencia de genes lentivirales, que incluyen el vector lentiviral INXN-2002, junto con fibroblastos normales y fibroblastos de RDEB no corregidos como controles, son los tipos de células utilizados para infundir inicialmente la dermis de piel. Las células se cultivan sobre dermis desvitalizada para formar equivalentes de piel de aproximadamente 2 cm cuadrados. Los compuestos de piel regenerada consisten en queratinocitos humanos cultivados sobre dermis humana desvitalizada infundida con fibroblastos.

Aislamiento y cultivo de queratinocitos primarios.

Las células de queratinocitos de tipo natural se aíslan de prepucio neonatal, mientras que los queratinocitos de RDEB primarios se aíslan de muestras de piel de pacientes. Estos últimos se obtienen como una biopsia en sacabocados de 6 mm sumergida en 15 ml de medio de crecimiento de queratinocitos 50/50V en un tubo de centrífuga de 15 ml enviado en hielo húmedo. No puede haber burbujas en las muestras enviadas. El medio 50/50V contiene 50% de medio 154 (Invitrogen) complementado con HKGS (extracto de hipófisis bovina al 0.2% [BPE], insulina bovina [5 mg/ml], hidrocortisona [0.18 mg/ml], transferrina bovina [5 mg/ml], factor de crecimiento epidérmico humano [0.2 ng/ml]) y 50% de SFM de queratinocitos (KSFM; Invitrogen) complementado con EGF1-53 BPE humano recombinante. Se añaden antibióticos AV100 (amikacina/vancomicina) para reducir la contaminación bacteriana.

Se separa la dermis y la epidermis por tratamiento con dispasa 25 U/ml (Becton Dickinson) durante la noche a 4°C. La epidermis se despega entonces de la dermis y se pone en un tubo de centrífuga de 15 ml con 5 ml de TrypLE 10x. El "despegado" epidérmico se incuba en un baño de agua a 37°C durante 15-30 min con agitación suave cada 5 min. TrypLE se neutraliza con igual volumen de DTI (inhibidor de tripsina definido) o DMEM+FBS al 10%. Las células se sedimentan a 1200 rpm y se siembran en 12 ml 50/50 V en matraces miméticos con colágeno 1 T75 Purecoat™ de Corning® . En el caso de que no esté disponible el matraz PureCoat™ del fabricante, en su lugar se puede utilizar 1 ml de solución de recubrimiento de colágeno 1 por placa de plástico de 10 cm durante 15 minutos a 37°C. El recubrimiento de colágeno 1 es una solución filtrada 0.2 uM de colágeno Vitrogen 100 (1 ml), HEPES (2 ml), BSA (100 ul de 100 mg/ml) y 1x HBSS (100 ml). El exceso de recubrimiento de colágeno se aspira antes de la siembra celular. Los matraces se agitan con movimientos circulares para garantizar una distribución uniforme de las células y se ponen en una incubadora humidificada a 37°C 5% de CO_2 durante al menos una noche antes de cualquier manipulación u

observación. Se permite que las células se adapten a las condiciones de cultivo de tejidos durante 3 días. Después de la adaptación, el medio se cambia una vez cada 2 días o según sea necesario. Los queratinocitos se pasan sobre plástico de cultivo tisular normal cuando están aproximadamente al 70% de confluencia.

En el medio 50/50V, los queratinocitos crecen bien durante cinco pases. Los queratinocitos se utilizan en los primeros cuatro pases.

Preparación de dermis desvitalizada porcina

Obtener láminas de piel porcina de espesor dividido. Esto se puede preparar de manera similar a la dermis humana desvitalizada (como antes) a partir de piel porcina extraída mediante dermatomo. Lavar la dermis porcina 3x en PBS estéril que contiene 1x penicilina/estreptomicina/anfotericina/gentamicina e incubar en PBS con NaCl 1 M y 2x antibióticos a 37°C durante 72 horas. Separar la epidermis y descartar, lavar 3 veces con 1XPBS que contiene antibióticos para eliminar el exceso de sal y gentamicina en solución.

Confirmar la esterilidad cultivando un trozo de dermis porcina en 50/50V o KGM durante 4 días. La dermis se puede almacenar a 4°C en solución antibiótica, cambiando el PBS semanalmente. La dermis no debe almacenarse durante más de unos pocos meses antes de su uso.

Fibroblastos de siembra de cultivos organotípicos

Cortar la dermis desvitalizada en piezas cuadradas de 2 cm. Poner la membrana basal de la dermis hacia abajo en placas de cultivo de 6 pocillos y dejar que la dermis se seque ligeramente.

Sembrar fibroblastos en cada pocillo, centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos y volver a 37°C con 5% de CO_2 humidificado durante 3-4 días, cambiando el medio todos los días. Durante este tiempo, los fibroblastos se adhieren a la dermis y comienzan a migrar al tejido.

Siembra de queratinocitos

Después de que los fibroblastos hayan migrado a través de la dermis, despegar cuidadosamente la dermis y transferirla al soporte dérmico anular (ADS). Añadir una capa delgada de Matrigel para sellar y asegurar la dermis en el dispositivo. Añadir 5 ml de KGM al compartimento estromal del ADS. KGM es una mezcla 3:1 de DMEM:F12 de Ham complementado con FBS (10%), adenina (1.8 × 10-4 M), hidrocortisona (0.4 µg/ml), insulina (5 µg/ml), toxina del cólera (1 × 10-10 M), EGF (10 ng/ml), transferrina (5 µg/ml) y triyodo-L-tironina (1.36 ng/ml). Tripsinizar, contar y sembrar queratinocitos en un volumen total de 100 µl de KGM por ADS. Devolver el conjunto de ADS a la incubadora. No perturbar el ADS durante al menos 24 h. Los queratinocitos en la parte superior de la dermis deben permanecer en la interfase aire-líquido. Cambiar el KGM en la cámara inferior todos los días. El cultivo organotípico continuará durante 1-2 semanas.

Cultivo organotípico de injerto

Los cultivos organotípicos estarán listos para injertar después de 7-10 días. El injerto se llevará a cabo como se describe anteriormente para injertos de piel humana normal. Los vendajes y las suturas se retirarán después de 7 a 10 días y el animal se envolverá de nuevo con vendajes nuevos durante otra semana. A partir de entonces, el injerto se expondrá al aire para que madure.

Recolección de injertos y seccionamiento

Sacrificar humanamente los ratones y recoger cuidadosamente el injerto. Bisecar el injerto y cortar un corte adicional de 1 mm. Recortar el corte hasta un cuadrado de 1 mm y enviarlo para microscopía inmunoelectrónica (IEM). Congelar las mitades restantes en OCT en hielo seco mientras se detecta el borde central. El seccionamiento comenzará en este borde. Una mitad se seccionará para su análisis inmediato y la mitad restante se almacenará para un análisis posterior. Cortar diez secciones de 8 µm a partir del borde central y etiquetar secuencialmente. Descartar las siguientes cuarenta secciones. Repetir hasta llegar al final del injerto. Secar al aire y fijar con acetona/metanol 50/50 helado.

Inyección de injertos compuestos de RDEB establecidos

Los fibroblastos se inyectarán por vía intradérmica directamente en la piel después del injerto establecido. Las inyecciones no superarán los 50 µl en volumen.

Las inyecciones se realizaron en ratones a los que se injertaron previamente injertos compuestos como se describe en el presente documento: se sembró dermis porcina desvitalizada mediante centrifugación con dosis variable de GM-HDF de RDEB y se cultivó en cultivo de tejidos durante 1 semana. Posteriormente, se dio la vuelta a la dermis y se sembraron 1 millón de queratinocitos de RDEB y se dejaron crecer en cultivo durante una semana más. Después de este período de dos semanas en cultivo tisular como se describe anteriormente, los injertos se pusieron en ratones SCID y se suturaron en el sitio, se vendaron durante 13 días. Los apósitos se retiraron en ese momento, y a los 38-41 días después del injerto, se inyectó en los injertos un volumen de 50 ul de fibroblastos.

D. Procedimientos experimentales

D. 1. Localización de COL7

Se utilizó microscopía de inmunofluorescencia para evaluar la expresión de colágeno tipo VII. Para el análisis de inmunofluorescencia (IF) de cultivos de piel con anticuerpo NP185 específico anti-C7 humano.

D.1.2. Métodos para la microscopía de inmunofluorescencia de anticuerpos NP 185

Los injertos compuestos se recolectaron de ratones SCID inmediatamente después de llevar a cabo la eutanasia con CO_2. Los injertos se bisecaron en dos y se colocaron en bloques de OCT. Los bloques congelados de tejido se seccionaron en un criostato Leica CM1850 a un espesor de 8 µM a -21ºC y se fijaron en metanol al 50%/acetona al 50% helado. Los portaobjetos se rehidrataron y lavaron en 1XPBS tres veces, se incubaron en anticuerpo primario (NP185 10 ug/ml; anti-Colágeno VII humano de ratón) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron y se incubaron en anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con Alexa 488 (1:400, 1 hora, temperatura ambiente, Life Technologies) y una contratinción nuclear con Hoescht 33342 (Life Technologies). Las muestras se lavaron tres veces en 1xPBS, se montaron usando Fluoromount antes de la formación de imágenes. Las imágenes se tomaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Observer.Z1 con un aumento de 20X.

Los injertos recogidos el día 19 se incluyeron como grupos de control positivo y negativo. Los grupos experimentales se inyectaron el día 38, 39 o 41 y se recogieron los días 48, 49 o 51 (Tabla 37).

Tabla 37: Días de Injerto, Inyección y recolección

Grupo de estudio	N	Día de Injerto	Día de inyección	Día de recolección
Grupos de control				
Positivo (queratinocitos normales, fibroblastos normales)	1	0	N/A	19
Negativo (queratinocitos de RDEB, fibroblastos de RDEB)	1	0	N/A	19
Grupos experimentales				
Fibroblastos de RDEB no transducidos	2	0	41	51
GM-HDF	4	0	38 (n=3) o 39 (n=1)	48 (n=3) o 49 (n=1)

E. Análisis de datos

Las imágenes de IF se prepararon y proporcionaron al PI con enmascaramiento. Los datos fueron analizados e interpretados por el PI antes del desenmascaramiento.

F. Resultados

Los resultados representativos del análisis de IF del tejido del injerto recogido se presentan en la Figura 26.

La tinción de C7 en la DEJ se visualizó en todas las condiciones de tinción de NP185, excepto el control negativo (imagen de "RDEB sin corregir" - véanse las flechas en la DEJ para la comparación con base negativa). Con respecto a los controles positivos, se observó una tinción de la DEJ intensa en la DEJ de injertos sembrados de queratinocitos/fibroblastos normales. Se observó un pequeño foco de tinción positiva en el grupo 1 al que se inyectó fibroblastos no corregidos (Imagen 1b) en una pequeña sección que podría representar fibroblastos corregidos previamente sembrados, sin embargo, el resto de los injertos con inyección de fibroblastos no corregidos en ambos ratones parecen ser menos intensos (como se representa en la imagen 1a). Se observó tinción de C7 en la DEJ en las imágenes representativas de cuatro injertos de ratón a los que se inyectaron fibroblastos corregidos (4a-d) incluso después de solo 10 días post-inyección.

No se observaron tumores en ningún injerto durante el transcurso del estudio.

G. Conclusiones

Los GM-HDF de RDEB del TR8 inyectados por vía intradérmica a la dosis clínica aproximada propuesta produjeron C7 que se localizaba en la DEJ *in vivo* en injertos compuestos de queratinocitos de RDEB en dermis de cerdo desvitalizada. Además, los resultados de la siembra de GM-HDF en injertos compuestos antes del injerto indican que los GM-HDF podrían persistir en la expresión de C7 que se localiza en la DEJ. Este modelo se puede utilizar para caracterizar la localización, durabilidad, persistencia y corrección de fenotipo aproximando el efecto de los GM-HDF predictivo de la dosis clínica.

Los resultados de estos estudios muestran las inyecciones intradérmicas de GM-HDF autólogos como un tratamiento eficaz de la RDEB en pacientes.

Ejemplo 7 - Caracterización de células GM-HDF *in vitro* sin GLP y evaluaciones demostrativas preliminares

Los objetivos de este estudio son los siguientes: (a) caracterizar los GM-HDF producidos utilizando el método de producción de GMP a escala previsto para usar para el tratamiento de pacientes con RDEB; (b) evaluar el número de copias de LV integradas y los niveles de expresión de C7; y (c) confirmar la funcionalidad de C7 expresada por los GM-HDF

A. Materiales del estudio

A.1. Artículo(s) de ensayo

Se caracterizaron los GM-HDF de los experimentos de entrenamiento 8, 9 y 10 y el experimento genotecnológico (como se describe anteriormente).

Tabla 38: Información general de producción para TR8, TR9, TR10 y ER1

Experimento de producción	Grupo	MOI (UI/célula)	Título LV-COL7 y TU	Escala de producción
TR8	A	3.4	INXN-2002 (Piloto) $9.2x10^6$ UI/ml	2 x CellSTACK de 10 capas®
	B	1.7		
	Control[1]	0		
TR9	A	1.0	LV-HA-COL7 (Piloto) 2.0×10^6 UI/ml	2 x CellSTACK de 10 capas®
	B	1.9		
	Control[1]	0		
TR10[2]	A	2.0	INXN-2002 (GMP) $2.3x10^6$ UI/ml	6 x CellSTACK de 10 capas®
	Control[1]	0		
ER1[2]	A	2.6	INXN-2002 (GMP) $2.3x10^6$ UI/ml	6 x CellSTACK de 10 capas®

[1]Las células del grupo de control se transdujeron de forma simulada

[2]Solo se generó un grupo de transducción de LV-COL7 para TR10 y para ER1

B. Secuencias de cebador y sonda utilizadas en análisis de qPCR

Tabla 39: Secuencias de cebadores y sondas utilizadas para ensayos de qPCR

Nombre	Secuencia[1]	Ensayo
PR13843 directo[2]	ACCTGAAAGCGAAAGGGAAAC (SEQ ID NO:25)	Número de copias de LV-COL7
PR13843 inverso[2]	CACCCATCTCTCTCCTTCTAGCC (SEQ ID NO: 26)	Número de copias de LV-COL7
PR13843 sonda[2]	6-FAM-AGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGC-3'IB FQ (SEQ ID NO: 27)	Número de copias de LV-COL7
PR13653 directo	CACTCCCAACGAAGACAAGAT (SEQ ID NO: 28)	Expresión de ARNm de COL7A1
PR13653 inverso	GTCTAACCAGAGAGACCCAGTA (SEQ ID NO: 29)	Expresión de ARNm de COL7A1
PR13653 sonda	6-FAM TTTGTAAACCGGTGCAGCTGCTTT 3'IB FQ (SEQ ID NO: 30)	Expresión de ARNm de COL7A1

[1]Cebadores/sondas adquiridos de IDT.

[2]Secuencias de cebador/sonda específicas de LV derivadas de Greenberg et al. (2006).

C. Procedimientos experimentales

C.1 Número de copias de LV-COL7

El aislamiento de ácidos nucleicos se realizó utilizando el kit AllPrep de Qiagen según las instrucciones del fabricante. El ADNg aislado de 3×10^5 células GM-HDF se normalizó a 12.5 ng/µl. Se usaron 8 µl del ADNg normalizado en un ensayo de 20 µl (10 µl de Taqman® Gene Express, 1.8 µl de agua exenta de nucleasas, 0.06 µl de cebador directo 100 µM, 0.06 µl de cebador inverso 100 µM, 0.04 µl de sonda Taqman® 100 µM). También se analizó una curva de calibración de vector lanzadera lentiviral C7 linealizado diluido en serie (1e6 copias/reacción a 5 copias/reacción), más

4 µl de ADNg humano (1.5e4 células/reacción) en el ensayo de 20 µl mencionado anteriormente. El ensayo de Taqman® utilizado fue PR13843. También se llevó a cabo una curva de calibración adicional de 8 µl de ADNg humano comercial (Clontech) (1.5e4 células/reacción a 2e2 células/reacción) en un ensayo de 20 µl (10 µl de Taqman® Gene Express, 1.0 L de agua exenta de nucleasas, 1 µl de 20X conjunto de cebador/sonda ACTB). Todas las muestras se procesaron en un ABI7900 utilizando los siguientes parámetros de ciclo: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

C.2 RT-qPCR de COL7A1

Se descongelaron viales de células GM-HDF y se aislaron el ADNg y ARN utilizando el kit AllPrep de Qiagen. Se usó ARN (800 µg) para generar ADNc usando qScript™ de Quanta según las instrucciones del fabricante. Luego, el ADNc y el ADNg se ensayaron usando el ensayo de Taqman® PR13653 como se describe anteriormente. Los datos se normalizaron respecto al gen de mantenimiento ACTB (dCT) y luego se compararon con los datos de control (ddCT). El ddCT resultante se convierte en el cambio usando la fórmula 2^-(ddCT).

C.3 Inmunofluorescencia de C7

Para el análisis de inmunofluorescencia, se permitió que 1.2×10^4 HDF-GM se adhirieran a cubreobjetos recubiertos con PDL/Lamina en placas de 24 pocillos durante la noche y luego se fijaron y permeabilizaron con una mezcla al 50%/50% de metanol/acetona. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS 1X y luego se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados adicionales con PBS, los cubreobjetos se incubaron con 1.25 µg/ml de anticuerpo fNC1 en suero de cabra al 1%/PBS, seguido de 3 lavados adicionales con PBS e incubación con 5 µg/ml de anti-IgG de conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor® 555 en suero de cabra al 1%/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se tiñeron con reactivo NucBlue® Live Cell Stain Ready Probes antes de montarlo en los portaobjetos. Las imágenes se adquirieron en un microscopio Zeiss Axio Observer con un aumento de 20X utilizando un tiempo de exposición de 290 ms. Se fijaron NHDF o GM-HDF, se permeabilizaron y tiñeron con tinción celular NucBlueLive® para visualizar núcleos (azul) o con el anticuerpo fNC1 y anti-IgG de conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor® 555 (5 µg/ml) para visualizar la expresión de C7 (rojo). Las imágenes se adquirieron con un aumento de 20X utilizando un tiempo de exposición de 290 ms.

C.4 ELISA de la proteína C7

Brevemente, una curva de calibración del fragmento His-NC1 purificado (9.8 - 625 ng/ml) o líquidos sobrenadantes recogidos que contenían proteína C7 (de GM-HDF en cultivo durante tres a cinco días) se inmovilizaron en una placa de 96 pocillos Nunc MaxiSorp® durante la noche a 4°C. Los patrones y las muestras se analizaron en la misma matriz de muestra (medio acondicionado de fibroblastos de RDEB al 20%). Los pocillos recubiertos se lavaron con PBST y se bloquearon con BSA al 3%/PBS durante 1 hora a 37°C. La detección se realizó utilizando un anticuerpo anti-NC1 policlonal (fNC1, 0.5 µg/ml) seguido de incubación con el anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo HRP (Jackson ImmunoResearch, 0.08 µg/ml). Los anticuerpos unidos se detectaron mediante desarrollo colorimétrico con solución de sustrato TMB. Después de inactivar la reacción, se midió la absorbancia a 450 nm en el SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices).

C.5 Inmunoprecipitación de trímeros de C7

En primer lugar, las perlas magnéticas de Proteína G se lavaron con 1 X PBS-T. Las perlas se unieron al imán durante un mínimo de 2 minutos antes de retirar el líquido sobrenadante y en todas las etapas posteriores. Después de los lavados, las perlas se recubrieron con 5 µg del anti-C7 fNC1 y se incubaron durante 10 minutos con rotación (Glas-Col, ajuste a 30 ~ 14 rpm a temperatura ambiente). Las perlas se unieron al imán para separar el líquido sobrenadante y se lavaron con tampón de unión a Ab/lavado. Se recogieron los líquidos sobrenadantes de los GM-HDF en cultivo durante tres a cinco días. El líquido sobrenadante que contenía C7 se añadió a la mezcla de perlas/líquido sobrenadante de C7 y se incubó durante la noche a 4ºC con rotación (ajuste a 30 ~ 14 rpm). Al día siguiente, las perlas se unieron al imán y se lavaron tres veces usando tampón de lavado. El antígeno diana se eluyó en 20 µl de tampón de elución (glicina 50 mM, pH 2.8 y 10 µl de colorante de carga 4X). Las muestras se desnaturalizaron a 70°C durante 10 minutos. A continuación, se cargaron (por pocillo) 12 µl de un total de 30 µl (la muestra restante se almacenó a 4ºC) en un gel de acetato de Tris al 3-8% de 12 pocillos y se procesó durante 4 horas a 150 voltios. El gel se retiró del casete y se empapó en tampón de transferencia que contenía metanol al 10% durante 20 minutos. Se realizó la transferencia húmeda durante la noche del gel a una membrana de nitrocelulosa a 15 voltios a 4°C. Al día siguiente, se aumentó el voltaje a 50 voltios durante 30 min en hielo. Una vez completada la transferencia, la transferencia se bloqueó usando leche al 5% en TBS-T con agitación (Labnet ProBlot™ Rocker 25, ajuste a 60 rpm) durante 2 horas a temperatura ambiente e incubado con anti-C7 LH7.2 (0.25 µg/ml) disponible comercialmente con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. La transferencia se lavó 3 veces con 1X TBS-T (5 min cada una) con agitación antes de detectarla con anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (0.1 µg/ml) con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. La transferencia se desarrolló usando el sustrato Lumiglo Ultra™Chemiluminescent y Fujifilm LAS 3000 Imaging System.

C.6 Unión a Lam332

Las placas de 96 pocillos MaxiSorp™ se recubrieron con 1 µg de Lam332 o BSA en tampón de carbonato 100 mM, pH

9.3 durante la noche a 4°C. Las placas se enjuagaron cinco veces con PBS-T y luego se bloquearon con BSA al 1% en PBS-T a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos recubiertos se enjuagaron cinco veces con PBS-T y se incubaron con los líquidos sobrenadantes de las células transducidas durante la noche a 4°C. Después de tres lavados más con PBS-T, el C7 unido se incubó con el anticuerpo fNC1 (0.5 µg/ml, PBS-T) a temperatura ambiente durante 3 horas, seguido de incubación con anti-IgG de conejo de burro conjugado con HRP (0.8 µg/ ml concentración final en PBS-T) a temperatura ambiente durante 2 h. La detección de los anticuerpos unidos a C7 se hizo mediante una reacción colorimétrica con TMB y se midió leyendo la absorbancia del producto a 450 nm en un lector de placas SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices). Todas las incubaciones se llevaron a cabo en un agitador orbital (GeneMate) a un ajuste de velocidad de 2.

C.7. Ensayo de migración celular

Se usó un kit de ensayo de curación de heridas de 24 pocillos CytoSelect™ de Cell Biolabs, Inc. para el ensayo de migración celular. Los GM-HDF (0.8×10^5) se sembraron en presencia de un inserto de herida en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante 48 horas. A continuación, se retiró el inserto de herida y las células se cultivaron adicionalmente en medio de suero reducido (1%) que contenía 15 µg/ml de colágeno tipo I (COL1) durante 8 horas. Se adquirieron imágenes de campo claro de las heridas 0, 2, 4, 6 y 8 horas después de retirar el inserto de herida usando el sistema de citometría de imágenes Celigo® (Cyntellect). El área superficial de la herida en cada momento se midió utilizando ImageJ (Institutos Nacionales de Salud). Los datos se dieron como el porcentaje de migración (% de migración) que cubre el área de la herida.

C.7. Análisis de datos

La qPCR se realizó utilizando un instrumento ABI 7900 utilizando el software SDS2.3. Los datos experimentales se visualizaron y exportaron en el software SDS 2.4. Se usó el software ImagJ para cuantificar el porcentaje de migración celular para el ensayo descrito anteriormente. ImageJ es un programa de procesamiento de imágenes de código abierto desarrollado por el Instituto Nacional de Salud y diseñado para imágenes científicas multidimensionales.

D. Resultados

D.1. Caracterización de la expresión de C7

D.1.1. Número de copias de LV-COL7 y niveles de transcripción

Se diseñaron ensayos Taqman® contra varias regiones del vector lanzadera viral. De los ensayos Taqman® probados, los diseños dirigidos a la secuencia codificante de C7 demostraron niveles inaceptables de amplificación de fondo. El ensayo Taqman® seleccionado, PR13843, se dirigió a una secuencia que se encuentra en el extremo 5' del esqueleto del LV como se describe en Greenberg et al. (2006).

Se obtuvieron células del experimento de entrenamiento de GM-HDF, se lavaron con dPBS y se resuspendieron en tampón RLT. Se utilizó el kit AllPrep de Qiagen para aislar el ADN (para el número de copias) y el ARN (para el nivel de transcripción de ARNm) de los viales de principio activo de cada grupo de cada experimento de entrenamiento. Luego, el ADN y el ARN aislados se sometieron a ensayos de qPCR y RT-qPCR como se describe anteriormente en la Sección C.1 y C.2, respectivamente. La Tabla 40 muestra el número de copias/célula de las experimentos de entrenamiento 8, 9 y 10 (TR8, TR9 y TR10) y el experimento genotecnológico (ER1). Los datos demuestran que el número de copias del transgén integradas en cada célula puede ser modulado por la dosis de virus administrada a las células durante la producción y es inferior a 1 copia/célula. De manera similar, los niveles de transcrito LV-COL7, que se muestran en la Figura 40, también se correlacionan con la dosis de virus y el número de copias, expresando los grupos A y B de los experimentos de entrenamiento los niveles más altos (3 a 5 LOG) de la secuencia lentiviral de C7 en comparación con las células de control.

Tabla 40: Número de copias de LV-COL7 en células del experimento de producción de GM-HDF

Experimento de producción	LV-COL7 Usado	Grupo	MOI (UI/célula)	Copias de gen por célula
TR8	INXN-2002 (Piloto)	A	3.4	0.021±0.007
		B	1.7	0.017±0.007
		Control[1]	0	BLQ[2]
TR9	LV-HA-COL7 (Piloto)	A	1.0	0.009±0.002
		B	1.9	0.021±0.002
		Control[1]	0	BLQ[2]
TR10[3]	INXN-2002 (GMP)	A (3)	2.0	0.013±0.002
		Control[1]	0	BLQ[2]
ER1[3]	INXN-2002 (GMP)	A (3)	2.6	0.025±0.005
		Control[1]	0	BLQ[2]

[1] Los grupos de control se transdujeron de forma simulada y no se expusieron a LV-COL7

[2] BLQ: por debajo del límite de cuantificación

[3] Solo se generó un solo grupo de transducción para TR10 y para ER1

D.1.2. Expresión de proteína C7

Se usó inmunofluorescencia indirecta (IF) para examinar la expresión de proteína C7 por células GM-HDF usando un anticuerpo específico para C7. Se usaron fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) como control positivo para este ensayo y los grupos de control de los experimentos de entrenamiento se usaron como controles negativos. En las imágenes representativas que se muestran en la Figura 28 a continuación, un pequeño porcentaje (<10%) de fibroblastos de RDEB transducidos con INXN-2002 y LV-HA-COL7 muestran tinción de C7, lo que es consistente con el número de copias de LV integradas (Tabla 18). La señal de los GM-HDF que son positivos para C7 es más brillante que la señal de los NHDF, lo que indica una mayor cantidad de C7 producida por los GM-HDF.

Intrexon desarrolló un ELISA directo para medir el C7 secretado por los GM-HDF en los medios de cultivo celular. Este ensayo, como se describe anteriormente en la Sección C.4, utilizó un anticuerpo policlonal específico de la región NC1. Los resultados del ensayo ELISA de los GM-HDF de las tres series de experimentos muestran que la expresión de C7 depende de la dosis de LV con niveles de expresión que varían de 45-90 ng/ml de líquidos sobrenadantes de las células (Figura 29).

D.2. Evaluación funcional de C7 expresado por GM-HDF 9.2.1. Formación de trímeros de C7

La formación de trímeros de C7 es importante en el ensamblaje de las fibrillas de anclaje. Para verificar que el C7 expresado por los GM-HDF será capaz de formar fibrillas de anclaje, se evaluó si el C7 expresado formaba o no trímeros usando inmunoprecipitación (IP) con un anticuerpo específico anti-C7 (fNC1) para la captura selectiva, luego la concentración de C7 de los líquidos sobrenadantes de cultivo para la detección por SDS-PAGE/inmunotransferencia.

Las condiciones óptimas para la inmunoprecipitación se establecieron ensayando un anticuerpo de C7 comercial y el anticuerpo de C7 fNC1. El recubrimiento de perlas de proteína G con fNC1 dio como resultado niveles más altos de unión a C7 en comparación con el recubrimiento con el anticuerpo disponible comercialmente. Los controles utilizados en este ensayo incluyen un control sin anticuerpo para descartar la unión no específica de C7 a las perlas, así como perlas recubiertas de anticuerpo incubadas con y sin C7 purificado enriquecido en medios acondicionados como controles para la especificidad de C7 aislado de líquidos sobrenadantes de cultivos de GM-HDF.

Los resultados de inmunoprecipitación para TR8 y para TR10 y ER1 mostraron que el C7 producido por los GM-HDF era predominantemente trimérico (Figura 10 y Figura 11, respectivamente). También se observaron algunas especies de menor peso molecular que mostraban inmunorreactividad, e incluían las formas dimérica y monomérica de 290 kDa. La IP de C7 de los GM-HDF del TR9 se detectó en la inmunotransferencia en niveles bajos tanto por un anticuerpo anti-C7 (panel izquierdo, Figura 11B) como por un anticuerpo específico para el marcador HA incorporado en la proteína C7 (panel derecho, Figura 11B).

D.2.2. Unión de Lam332 por C7 expresado de los GM-HDF

Se ha demostrado que C7 se une a componentes de la matriz extracelular (ECM) inmovilizada, incluida la fibronectina, Laminina-332 (Lam332), COL1 y COL4 (Chen, et al., 2002a). La interacción entre C7 y Lam332 se produce a través del dominio NC1 NH2-terminal de C7 y depende de la conformación nativa tanto de Lam332 como de NC1 de C7 (Rousselle, et al., 1997). La asociación entre C7 y Lam332 es importante para establecer la arquitectura correcta de Lam332 en la unión dermoepidérmica. Tal organización es importante para las interacciones con ligandos extracelulares y receptores de superficie celular, y para la señalización celular (Waterman, et al., 2007). Intrexon desarrolló un ELISA utilizando un anticuerpo contra el dominio NC1 de C7 para detectar la unión de C7 a Lam332 purificada. Aunque ya se ha descrito en la bibliografía un ELISA de unión C7/Lam332 (Chen, et al., 2002a), hasta donde saben los autores de la invención, nunca se ha utilizado para analizar la presencia de C7 en los líquidos sobrenadantes de las células transducidas. Los resultados en la Figura 12 muestran la unión dependiente de la dosis a Lam332 por C7 expresado por los GM-HDF de los experimentos de entrenamiento y genotecnológicos.

D.2.3. Ensayo de migración celular

Estudios previos han mostrado que los fibroblastos y queratinocitos de RDEB muestran un aumento en la motilidad en relación con sus homólogos normales, y que la motilidad normal se puede restablecer mediante la expresión de C7 (Chen, et al., 2000; Chen, et al., 2002b; Cogan, et al., 2014; Baldeschi et al., 2003). La mayoría de estos estudios emplearon el ensayo de migración de sal de oro coloidal para medir la migración de fibroblastos y queratinocitos, o un ensayo de cicatrización de heridas para medir la migración de queratinocitos. Aquí se usó el kit de ensayo de cicatrización de heridas de 24 pocillos CytoSelect™ (Cell Biolabs, Inc.) para medir la motilidad de los NHDF y GM-HDF.

La tinción inmunofluorescente para C7 puso de manifiesto que solo un pequeño porcentaje (<10%) de las células transducidas expresaban niveles altos de la proteína, lo que planteaba la cuestión de si un pequeño número de células productoras de C7 podría tener un efecto global sobre la migración celular. Para determinar si la presencia de C7 en

los medios de cultivo es suficiente para revertir el fenotipo de hipermotilidad de la RDEB, el ensayo de cicatrización de herida se llevó a cabo en los GM-HDF de los tres experimentos de entrenamiento, con NHDF como control positivo y los grupos de control transducidos de forma simulada (RDEB) como control negativo.

Los fibroblastos de control del TR8, TR10 y ER1 presentan un fenotipo de hipermotilidad que se invierte con la expresión de C7 (Figura 30). Sin embargo, los fibroblastos de control del TR9 no presentan un fenotipo de hipermotilidad significativo, lo que dificulta la investigación de la funcionalidad de C7 marcado con HA en este ensayo.

Conclusiones

El número de copias del transgén integradas por célula en los GM-HDF dependía de la dosis de virus que variaba de 0.009 a 0.03 copias del transgén por célula.

La expresión de C7 dependiente de la dosis de las células GM-HDF se confirmó mediante qRT-PCR, tinción de inmunofluorescencia y ELISA.

Se confirmó que la estructura del C7 expresado por las células GM-HDF era predominantemente trimérica por inmunoprecipitación/SDS-PAGE/análisis de inmunotransferencia para TR8, TR10 y ER1. TR9 mostró una formación mínima de trímeros.

Se demostró que el C7 producido a partir de las células GM-HDF del TR8 es funcional mediante la unión a Laminina-332 en un ensayo de unión in vitro y mediante la corrección del fenotipo de hipermotilidad de las células de control de RDEB en un ensayo de migración in vitro. TR9 mostró unión a Laminina-332, sin embargo, los resultados del ensayo de migración eran equívocos. Los HA-GM-HDF del TR9 generados a partir de la transducción con LV-HA-COL7 mostraron niveles bajos de trímero, menos unión a Lam332 y falta de una corrección clara de la hipermotilidad.

Debido a la falta de confirmación de la funcionalidad in vitro de HA-C7 expresado por los HA-GM-HDF del TR9, se eligieron células del TR8 para evaluaciones de farmacología/toxicología híbridas in vitro e in vivo. Esto eliminó la capacidad de evaluar la expresión, localización y persistencia en injertos compuestos de piel humana normal o de RDEB preparados con piel humana desvitalizada. Finalmente, para estos estudios se utilizaron injertos compuestos preparados con dermis porcina desvitalizada. Se usó inmunotinción con anticuerpo anti-C7 específico humano para distinguir rC7 de C7 nativo en este enfoque.

Ejemplo 8 - Producto farmacéutico

El producto farmacéutico FCX-007 consiste en una suspensión estéril de las propias células fibroblastos autólogas vivas de cada paciente, que se modifican genéticamente utilizando INXN-2004 LV-COL7 para codificar el gen *COL7A1* de tipo natural humano, formulado en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin rojo fenol.

Desarrollo de formulaciones

El desarrollo de la formulación FCX-007 y la dosificación de células se basó en la experiencia de fabricación de Fibrocell con azficel-T (LAVIV®); un producto de células vivas de fibroblastos autólogos para inyección. Las células de fibroblastos se han formulado con éxito en DMEM en un intervalo de concentración celular de 0.5 - 3.0 × 10^7 células/ml sin problemas de viscosidad (azficel-T BLA n.º 125348). Los datos sugieren que la viscosidad se convierte en un problema para la inyección del producto cuando la concentración celular alcanza 5.8 × 10^7 células/ml. Como resultado, se seleccionó DMEM a una concentración celular de 1.0-3.0 × 10^7 células/ml como la formulación para el DP (producto farmacéutico, por sus siglas en inglés *Drug Product*) FCX-007.

Exceso

Se envían hasta diez viales de DP FCX-007 a la clínica como una dosis para la inyección de tratamiento. En el momento de la administración, el vial de DP se invierte suavemente tres veces y luego se extrae asépticamente 1 ml de cada vial en una jeringa estéril de 1 ml con una aguja de calibre 21. A continuación, la aguja de calibre 21 se reemplaza por una aguja de calibre 30 para la administración intradérmica. El procedimiento se repite para los 9 viales de producto restantes.

Los viales de DP FCX-007 se llenan con 1.2 ml de la suspensión de células de fibroblastos en un vial de 2.0 ml de capacidad para un volumen recuperable de 1.0 ml. El exceso de 0.2 ml está destinado a garantizar que se pueda obtener 1.0 ml del vial en el momento de la administración en la clínica.

a. Propiedades fisicoquímicas y biológicas

i. Propiedades fisicoquímicas

El DP FCX-007 se presenta como una suspensión de células de fibroblastos autólogos modificados genéticamente en DMEM sin rojo fenol con una carga de 1.2 ml en un criovial de 2 ml. Los ensayos demuestran que las células son un cultivo vivo. La Tabla 41 muestra las propiedades fisicoquímicas de DP FCX-007.

Tabla 41: Propiedades fisicoquímicas de DP FCX-007

Propiedad fisicoquímica	Valor
Recuento de células	1.0-3.0 x10^7 células
Viabilidad celular	≥ 70%

Propiedades biológicas

FCX-007 es un producto de células de fibroblastos autólogos estériles que están modificados genéticamente para expresar la proteína de colágeno 7 humana (C7). El número de copias del vector INXN-2004 por célula y la expresión de la proteína C7 son propiedades biológicas únicas del DP FCX-007. El DP FCX-007 es un producto de suspensión de células vivas que se produce a partir del DS FCX-007 lavando las células del DS FCX-007 descongeladas en tampones PBS y DMEM. Se analizan el número de copias del vector INXN-2004 por célula y la expresión de la proteína C7 en el DS FCX-007 antes de su liberación para fabricar el DP FCX-007. La Tabla 42 muestra las propiedades biológicas del DP FCX-007.

Tabla 42: Propiedades biológicas del DP FCX-007

Propiedad biológica	Valor	Etapa medida
Tipo de célula Pureza / Identidad (fibroblasto)	≥ 98% CD 90+	Principio activo
Número de copias del vector INXN-2002	0.1 - 5.0	Principio activo
Expresión de la proteína C7	≥ 500 ng/día/células E6	Principio activo
Esterilidad	Sin crecimiento (estéril)	Producto farmacéutico

Fórmula del lote

Para preparar el producto farmacéutico FCX-007, los viales del principio activo FCX-007 se extraen de la fase de vapor del almacenamiento congelado de nitrógeno líquido, se descongelan y se mezclan dentro de una BSC ISO 5. Las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido de un lavado con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin rojo fenol antes de suspenderse en DMEM sin rojo fenol a una concentración objetivo de 1.0 - 3.0 × 10^7 células/ml. Luego, las células formuladas se introducen en crioviales de 2 ml con 1.2 ml/vial. El material del producto farmacéutico preparado para cada tratamiento de inyección se define como un lote. El tamaño del lote de tratamiento propuesto es de hasta diez (10) viales de 2 ml que contienen 1.2 ml de suspensión celular.

La Tabla 43 proporciona una lista de todos los componentes utilizados en el procedimiento de fabricación del producto farmacéutico.

Tabla 43: Composición y cantidad del lote del producto farmacéutico FCX-007

Componente	Función	Norma de calidad	Cantidad por vial de DP[1]	Cantidad por lote (10 viales por lote)
FCX-007DS	Principio activo	Certificado de análisis del producto farmacéutico	1.2-3.6 x10^7 células	1.2 - 3.6x10^8 células
PBS	Diluyente utilizado para lavar las células del principio activo	Certificado de análisis del fabricante	Cantidad en trazas residual mínima[2]	Cantidad en trazas residual mínima[2]
DMEM sin rojo fenol	Tampón para suspensión celular	Certificado de análisis del fabricante	1.2 ml	12 ml

[1] El vial contiene 1.2 ml de suspensión de células FCX-007

[2] El residuo de lavado de PBS se diluye con DMEM sin rojo fenol, de modo que es posible que haya cantidades en trazas de PBS, pero no cuantificables.

Descripción del procedimiento de fabricación y controles del procedimiento

b. Diagrama de flujo del procedimiento de fabricación

La fabricación del producto farmacéutico FCX-007 comienza cuando los viales del principio activo FCX-007 se retiran del almacenamiento en nitrógeno líquido y se descongelan usando un ThermoMixer®. En una BSC ISO5, las células DS FCX-007 descongeladas se mezclan en un tubo de centrífuga de 250 ml que contiene >5x el volumen aparente de solución salina tamponada con fosfato (PBS) para la resuspensión. Las células se centrifugan a 1000 rpm durante 10 minutos a 5 ± 3°C y se separa el tampón de lavado PBS. A esto le sigue un lavado con > 5x el volumen aparente de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) mediante resuspensión y centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos a 5 ± 3°C. Se separa el tampón de lavado DMEM. Las células lavadas se vuelven a suspender en DMEM sin rojo fenol hasta una concentración objetivo de 2.0 × 10^7 células/ml. La suspensión celular se carga manualmente en

crioviales estériles de 2.0 ml en una BSC ISO5 hasta un volumen de 1.2 ml por vial para producir los viales de DP FCX-007. Los viales del producto farmacéutico se almacenan a 2-8°C hasta que el control de calidad los libera para su envío en un transportador Credo Cube™ al centro clínico.

Descripción del procedimiento de fabricación

El producto farmacéutico FCX-007 se fabrica como se indicó anteriormente. INXN-2002 es un nombre sinónimo de FCX-007.

Etapa 1: Retirada de viales de principio activo FCX-007 del almacenamiento en nitrógeno líquido y verificación de lotes

El principio activo FCX-007, que se almacena en un congelador de nitrógeno líquido, se solicita a Gestión de materiales. Luego, los viales de principio activo FCX-007 se extraen para este lote de producción de producto farmacéutico FCX-007 antes de transferirlos a la sala limpia.

Etapa 2: Descongelación de los crioviales

El despeje de línea de la sala limpia se lleva a cabo por la QA (garantía de calidad) despeje de línea de producción GMP/limpieza de línea GTP por SOP-0099 GMP, con el fin de liberar la sala para su uso de procesamiento. Los operadores inician el monitoreo ambiental (EM) de la sala, el personal y la BSC según el SOP-0129 (Monitoreo ambiental y del personal en procedimiento) antes del procesamiento y el muestreo de EM no viable en la BSC durante el procesamiento.

Los crioviales de DS FCX-007 se desinfectan y descongelan en un ThermoMixer® equilibrado a 37°C hasta que la suspensión de células se descongela casi por completo y queda un trocito de cristales de hielo. Los viales descongelados se transfieren a una BSC.

Etapa 3: Lavado con PBS

Dentro de la BSC, con una pipeta, transfiera aproximadamente 150 ml de PBS (> 5 volúmenes de la suspensión de células DS FCX-007) a un tubo de centrífuga de 250 ml. El contenido de los crioviales descongelados se transfiere al tubo de centrífuga de 250 ml. Utilice la suspensión celular diluida para enjuagar la pipeta. Utilice una pipeta para transferir 3.0 ml de PBS nuevo a cada criovial como enjuague. Transfiera el enjuague a un tubo de centrífuga de 250 ml. Agite con movimientos circulares el tubo suavemente para mezclar la suspensión de células. Transfiera el tubo de centrífuga a una centrífuga y centrifugue las células a 1000 RPM durante 10 minutos a 5 ± 3°C. Después de la centrifugación, retire el líquido sobrenadante de lavado con PBS del tubo.

i. Etapa 4: Lavado con DMEM

Usando una pipeta, añada aproximadamente 200 ml de DMEM sin rojo fenol (> 5 volúmenes de la suspensión de células de DS FCX-007) al tubo para volver a suspender el sedimento celular. Agite con movimientos circulares el tubo suavemente para mezclar la suspensión de células. Transfiera el tubo de centrífuga a una centrífuga y centrifugue las células a 1000 RPM durante 10 minutos a 5 ± 3°C. Después de la centrifugación, usando una pipeta, transfiera 0.9 ml del líquido sobrenadante del frasco de la centrífuga a cada uno de los 2 crioviales de 2 ml separados (1.8 ml en total) etiquetados como "Lote, QC-Esterilidad". Deje los crioviales etiquetados para esterilidad a un lado en la BSC. Aspire el líquido sobrenadante de lavado con DMEM restante del tubo de centrífuga.

Etapa 5: Resuspensión de sedimentos celulares en DMEM

El volumen de DMEM utilizado para volver a suspender el sedimento celular se calcula como:

Volumen de suspensión de células DS FCX-007 descongeladas dividido por 1.5

El factor de volumen de 1/1.5 compensa la posible pérdida de células durante las etapas de lavado con el fin de dar como resultado una concentración de células en el intervalo especificado de 1.0-3.0 × 10^7 células/ml después de la resuspensión.

Utilice una pipeta para transferir la cantidad calculada de DMEM para volver a suspender el sedimento celular en el tubo de centrífuga. Utilice una pipeta para transferir 0.1 ml de la suspensión celular a un criovial de 2 ml con la etiqueta "Lote, QC-Recuento y viabilidad" y envíe el criovial al QC para el recuento de células. Utilice una pipeta para medir el volumen restante de la suspensión celular total y ponga la suspensión celular en un refrigerador a 2-8°C para usar para el llenado final posterior.

Etapa 5a: Redilución (si es necesario)

Si la concentración de células en el QC es superior a 3.0 × 10^7 células/ml, realice una dilución adicional usando DMEM nuevo para alcanzar una concentración de células de 2.0 × 10^7 células/ml. Vuelva a enviar una muestra de suspensión celular al QC para el recuento de células y confirmar la concentración celular final.

Etapa 6: Llenado final

Recupere las células del refrigerador y transfiera las células a la BSC para el llenado final. Use una pipeta para llenar manualmente con la suspensión celular bien mezclada crioviales de 2 ml en el siguiente orden:

Llene con 0.1 ml de suspensión celular el primer vial de muestra de esterilidad (añadido a la muestra retenida de la etapa 4)

Llene los viales con el producto a 1.2 ml por vial

Llene con 0.1 ml de suspensión celular el segundo vial de muestra de esterilidad (añadido a la muestra retenida de la etapa 4)

Llene el vial de QC a ≤1.8 ml por vial

Envíe los viales de esterilidad y QC para su análisis.

Etapa 7: Almacene los viales de DP para su liberación y envío

Mantenga los viales de DP a 5 ± 3°C para liberarlos y enviarlos al centro clínico.

Descripción de los controles en el procedimiento

Controles Ambientales

Todas las manipulaciones de cultivos celulares se llevan a cabo en cabinas de seguridad biológica (BSC) con certificado ISO 5 dentro de un entorno ambiental de ISO7 utilizando técnicas asépticas. Los recipientes de crioviales de 2 ml del producto farmacéutico final se compran preesterilizados a Corning. Los operadores que realizan el llenado final están calificados para operaciones de llenado aséptico.

Controles y ensayos en el procedimiento

Los controles y ensayos del procedimiento realizados para la liberación del producto farmacéutico FCX-007 se describen a continuación.

Etapa 1

La QA verifica el lote correcto del principio activo FCX-007 antes de utilizarlo en la fabricación del DP FCX-007.

Etapa 2

La temperatura del ThermoMixer® utilizado para descongelar los viales del principio activo FCX-007 se controla a 37°C. El contenido de cada vial se descongela hasta que queda un trozo de hielo en el vial para evitar el sobrecalentamiento.

Etapa 3

El volumen de lavado con PBS se controla a ≥ 5 volúmenes de la mezcla de células DS FCX-007 para garantizar el lavado adecuado de las células. Las condiciones de centrifugación se controlan a 1000 rpm, 10 minutos y 5±3°C para garantizar una sedimentación celular suficiente.

Etapa 4

De manera similar a la etapa de lavado con PBS, el volumen de lavado con DMEM se controla a ≥ 5 volúmenes de la mezcla de células DS FCX-007 para garantizar el lavado adecuado de las células. Las condiciones de centrifugación se controlan a 1000 rpm, 10 minutos y 5±3°C para garantizar una sedimentación celular suficiente. Se toman dos partes alícuotas de 900 µl de líquido sobrenadante de lavado con DMEM para usar en el ensayo de esterilidad del producto final.

Etapa 5 y 5(a) (si son necesarias)

La concentración de células resuspendidas se controla a 1.0 -3.0 × 10^7 células/ml y viabilidad ≥ 70%.

Etapa 6

El volumen de llenado de los viales con DP FCX-007 se controla a 1.2 ml de llenado por vial. Se realiza un recuento final de células y una medición de viabilidad, así como una tinción de Gram en el vial de QC lleno. Los dos viales de esterilidad se someten a ensayos de esterilidad. Los resultados de este ensayo de esterilidad no se reciben hasta después de la liberación del producto farmacéutico, por lo que la liberación del DP se realiza basándose en una tinción de Gram negativa. El uso de un ensayo microbiano rápido en esta situación se indica en la Guía para revisores y patrocinadores

de la FDA "Contenido y revisión de la información química, de fabricación y de control (CMC) para la investigación de aplicaciones de nuevos medicamentos (IND) de terapia con células somáticas humanas" de abril de 2008.

ii. Control de materiales

El procedimiento de fabricación del producto farmacéutico FCX-007 utiliza productos desechables de un solo uso que entrarán en contacto con las materias primas (p. ej., pipetas, tubos de centrífuga y crioviales) para eliminar las consideraciones de problemas de limpieza y transferencia. Las materias primas seleccionadas para su uso en el procedimiento de fabricación son aceptables para el procesamiento farmacéutico cumpliendo con la USP VI. Todos los artículos desechables se compran preesterilizados por radiación gamma. Los tampones de lavado PBS y DMEM se compran estériles a proveedores comerciales. Las etapas del procedimiento tienen los parámetros del procedimiento apropiados identificados, tales como el tiempo y la temperatura.

Ejemplo 9 - Caracterización in vitro de GM-HDF optimizados

Este ejemplo describe la caracterización de los GM-HDF generados usando un procedimiento de transducción de LV mejorado, la construcción de LV-COL7 INXN-2004. Se ejecutaron tres experimentos de entrenamiento (TR11, TR12.1 y TR13) para generar células para los análisis a escala de GMP. TR11 se transdujo con el vector de LV-COL7 INXN-2002 y se usó para evaluar un procedimiento de transducción del LV mejorado por centrifugación (espinoculación) con y sin una segunda etapa de transducción (supertransducción). TR12.1 y TR13 se transdujeron con el vector de LV-COL7 INXN-2004 utilizando procedimientos de transducción mejorados determinados mediante la evaluación de TR11.

Los GM-HDF de cada experimento de entrenamiento se caracterizaron usando ensayos para evaluar resultados tales como el número de copias de LV-COL7 integradas, la expresión de proteína de C7 y la funcionalidad del C7 expresado por los GM-HDF.

Los niveles de integración del LV y expresión de C7 aumentaron primero con la adición de la etapa de supertransducción y aumentaron aún más con el uso del LV-COL7 INXN-2004. El C7 se expresó a partir de los GM-HDF de los tres experimentos de entrenamiento ensamblado en la forma trimérica y se unió a la Laminina-332, que es importante en la formación de fibrillas de anclaje. La expresión de C7 por los GM-HDF pudo revertir la hipermotilidad observada en los fibroblastos de RDEB. Se seleccionaron los GM-HDF de TR12.1 y 13 para usar en estudios de toxicología GLP *in vivo*.

Los objetivos de este estudio eran (a) demostrar la mejora en el número de copias del LV integradas y la expresión de C7 como resultado de 1) un procedimiento de transducción mejorado incorporado en el método de producción GMP a escala y 2) la adopción de la construcción de LV-COL7 INXN-2004 y (b) confirmar la funcionalidad de C7 expresada por los GM-HDF

1. Materiales de estudio

1.1. Artículo(s) de ensayo

Se caracterizaron los GM-HDF de los experimentos de entrenamiento (TR) 11, 12.1 y 13.

Tabla 44: Información general de producción para TR11, TR12.1 y TR13

Experimento de producción	Título de LV-COL7 y TU	Grupo	MOI (UI/célula)	Super-transducción	Escala de producción
TR11	INXN-2002 (GMP) $1.2x10^5$ UI/ml	A	0.77	Sí	2 x CellSTACK® de 10 capas
		B	0.77	No	
		Control[1]	0	n/a	
TR12.1	INXN-2004 (GMP) $1.4x10^5$ UI/ml	A	0.12	Sí	2 x CellSTACK® de 10 capas
		B	0.12	No	T-175[2]
TR13	INXN-2004 (GMP) $1.4x10^5$ UI/ml	A	0.12	Sí	2 x CellSTACK® de 10 capas
		B	0.12	No	T-175[2]

[1] Las células del grupo de control se transdujeron de forma simulada

[2] El grupo B de TR12.1 y TR13 fue solo para investigación. El pase de estos grupos terminó temprano y, por lo tanto, no completaron el procedimiento de producción a gran escala.

1.2. Secuencias de cebadores y sonda

Tabla 45: Secuencias de cebadores y sonda utilizadas para ensayos de qPCR

Nombre	Secuencia[1]	Ensayo
PR13843 directo[2]	ACCTGAAAGCGAAAGGGAAAC (SEQ ID NO: 31)	Número de copias de LV-COL7
PR13843 inverso[2]	CACCCATCTCTCTCCTTCTAGCC (SEQ ID NO: 32)	Número de copias de LV-COL7
PR13843 sonda[2]	6-FAM-AGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGC-3'IBFQ (SEQ ID NO: 33)	Número de copias de LV-COL7

[1] Cebadores/sonda adquiridos de IDT.

[2] Secuencias de cebadores/sonda específicas de LV derivadas de Greenberg et al. (2006).

2. Procedimientos experimentales

2.1. Número de copias de LV-COL7

El aislamiento de ácidos nucleicos se realizó utilizando el kit AllPrep de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNg se aisló de 6.7 × 10^5 células GM-HDF y se usaron 8 µl de ADNg en un ensayo de 20 µl (10 µl de Taqman® Gene Express, 1.8 µl de agua exenta de nucleasas, 0.06 µl de cebador directo 100 µM, 0.06 µl de cebador inverso 100 µM, 0.04 µl de sonda Taqman® 100 µM). También se analizó una curva de calibración del vector lanzadera lentiviral LV-COL7 linealizado diluido en serie (1e6 copias/reacción a 5 copias/reacción), más 4 µl de ADNg humano (1.5e4 células/reacción) en el ensayo de 20 µl mencionado anteriormente. El ensayo Taqman® utilizado fue PR13843. También se realizó una curva de calibración adicional de 8 µl de ADNg humano comercial (Clontech) (1.5e4 células/reacción a 2e2 células/reacción) en un ensayo de 20 µl (10 µl de Taqman® Gene Express, 1.0 L de agua exenta de nucleasas, 1 µl de 20X conjunto de cebador/sonda ACTB). Todas las muestras se analizaron por triplicado en un ABI7900HT utilizando los siguientes parámetros de ciclo: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

2.2. Inmunofluorescencia de C7

Para el análisis de inmunofluorescencia, se permitió que 1.2 × 10^4 GM-HDF se adhirieran a cubreobjetos recubiertos con PDL/Lamin en placas de 24 pocillos durante la noche y luego se fijaron y permeabilizaron con una mezcla al 50%/50% de metanol/acetona. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con 1X PBS y luego se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados adicionales con PBS, los cubreobjetos se incubaron con 1.25 µg/ml de un anticuerpo policlonal fNC1 (α-fNC1) en suero de cabra al 1%/PBS, seguido de 3 lavados adicionales con PBS e incubación con 5 µg/ml de anti-IgG de conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor® 555 en suero de cabra al 1%/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se tiñeron con reactivo NucBlue® Live Cell Stain Ready Probes antes de montarlo en los portaobjetos. Las imágenes se adquirieron en un microscopio Zeiss Axio Observer con un aumento 20X utilizando un tiempo de exposición de 290 ms. Los NHDF o GM-HDF se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con NucBlue® Live Cell Stain para visualizar los núcleos (azul) o con el anticuerpo fNC1 y anti-IgG de conejo de cabra conjugado con Alexa Fluor® 555 (5 µg/ml) para visualizar la expresión de C7 (rojo). Las imágenes se adquirieron a aumentos de 20X y 5X utilizando un tiempo de exposición de 290 ms.

2.3. Citometría de flujo de C7

Se recolectaron los GM-HDF (~500 000 células) en cada pocillo de una placa con fondo en V de 96 pocillos, se concentraron por centrifugación (1500 rpm, 5 min, temperatura ambiente) y se separaron los líquidos sobrenadantes del medio de cultivo. A continuación, las células se resuspendieron en 200 µl de CytoFix, se transfirieron a una placa con fondo en V de 96 pocillos y se incubaron durante 30 min a 4°C. Después de la fijación, el fijador se separa por centrifugación (1500 rpm, 5 min, 4°C) y las células se permeabilizan con 200 µl de metanol al 100% helado durante 30 min sobre hielo. A continuación, las células se mantuvieron a -20°C antes del procedimiento de tinción. Para la tinción, las células permeabilizadas se lavaron dos veces con 200 µl de tampón de incubación (0.5 g de BSA en 100 ml de PBS), con centrifugación (300 rpm, 5 min, temperatura ambiente) entre lavados para eliminar el tampón. Las células lavadas se resuspendieron en 100 µl de tampón de incubación que contenía α-fNC1 diluido 1:400 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron dos veces como se describe anteriormente y se resuspendieron en 100 µl de tampón de incubación que contenía el anticuerpo secundario de IgG de conejo-AlexaFluor 555 diluido 1:2000 y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron dos veces como se describe anteriormente y se resuspendieron en 100 µl de PBS. Las células que expresan C7 se contaron por citometría de flujo utilizando el software BD LSRII y BD FACSDiva (V6.2) con los siguientes parámetros: voltaje FSC = 484, voltaje SSC = 209, PE = 500.

2.4. ELISA de proteína C7

Brevemente, una curva de calibración del fragmento His-NC1 purificado (9.8 - 625 ng/ml) o los líquidos sobrenadantes

recolectados que contenían proteína C7 (de GM-HDF en cultivo durante tres a cinco días) se inmovilizaron en una placa de 96 pocillos Nunc MaxiSorp® durante la noche a 4°C. Los patrones y las muestras se analizaron en la misma matriz de muestra (10% de medio acondicionado con fibroblastos de RDEB). Los pocillos recubiertos se lavaron con PBST y se bloquearon con BSA al 3%/PBS durante 1 hora a 37°C. La detección se realizó utilizando Ab α-fNC1 (0.5 µg/ml) seguido de incubación con anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo HRP (Jackson ImmunoResearch, 0.08 µg/ml). Los anticuerpos unidos se detectaron mediante desarrollo colorimétrico con solución de sustrato TMB. Después de inactivar la reacción, se midió la absorbancia a 450 nm en el SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices).

2.5. Inmunoprecipitación de trímeros de C7

En primer lugar, las perlas magnéticas de Proteína G se lavaron con 1 X PBS-T. Las perlas se unieron al imán durante un mínimo de 2 minutos antes de separar el líquido sobrenadante y en todas las etapas posteriores. Después de los lavados, las perlas se recubrieron con 5 µg de α-fNC1 y se incubaron durante 10 minutos con rotación (Glas-Col, configurando 30 ~ 14 rpm a temperatura ambiente). Las perlas se unieron al imán para separar el líquido sobrenadante y se lavaron con tampón de lavado/unión de Ab. Se recogieron los líquidos sobrenadantes de los GM-HDF en cultivo durante tres a cinco días. Se añadió el líquido sobrenadante que contenía C7 a la mezcla de perlas/líquido sobrenadante de C7 y se incubó durante la noche a 4ºC con rotación (ajuste a 30 ~ 14 rpm). Al día siguiente, las perlas se unieron al imán y se lavaron tres veces usando tampón de lavado. El antígeno diana se eluyó en 20 µl de tampón de elución (glicina 50 mM, pH 2.8 y 10 µl de colorante de carga 4X). Las muestras se desnaturalizaron a 70°C durante 10 minutos. A continuación, se cargaron (por pocillo) 12 µl de un total de 30 µl (la muestra restante se almacenó a 4°C) en un gel de acetato de Tris al 3-8% de 12 pocillos y se procesó durante 4 horas a 150 voltios. El gel se retiró del casete y se sumergió en tampón de transferencia que contenía metanol al 10% durante 20 minutos. Se realizó la transferencia húmeda durante la noche del gel a una membrana de nitrocelulosa a 15 voltios a 4°C. Al día siguiente, se aumentó el voltaje a 50 voltios durante 30 min sobre hielo. Una vez completada la transferencia, la transferencia se bloqueó usando leche al 5% en TBS-T con agitación (Labnet ProBlot™ Rocker 25, ajuste a 60 rpm) durante 2 horas a temperatura ambiente y se incubó con anti-C7 LH7.2 (0.25 µg/ml) disponible comercialmente con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. La transferencia se lavó 3 veces con 1X TBS-T (5 min cada una) con agitación antes de detección con anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (0.1 µg/ml) con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. La transferencia se desarrolló usando el sustrato quimioluminiscente Lumiglo Ultra™ y Fujifilm LAS 3000 Imaging System.

2.6. Unión de Lam332

Las placas de 96 pocillos MaxiSorp™ se recubrieron con 1 µg de Lam332 o BSA en tampón de carbonato 100 mM, pH 9.3 durante la noche a 4°C. Las placas se enjuagaron cinco veces con PBS-T y luego se bloquearon con BSA al 1% en PBS-T a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos recubiertos se enjuagaron cinco veces con PBS-T y se incubaron con los líquidos sobrenadantes de las células transducidas durante la noche a 4°C. Después de tres lavados más con PBS-T, el C7 unido se incubó con α-fNC1 (0.5 µg/ml, PBS-T) a temperatura ambiente durante 3 horas, seguido de incubación con anti-IgG de conejo de burro conjugado con HRP (concentración final en PBS-T 0.8 µg /ml) a temperatura ambiente durante 2 h. La detección de los anticuerpos unidos a C7 se realizó mediante una reacción colorimétrica con TMB y se midió leyendo la absorbancia del producto a 450 nm en un lector de placas SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices). Todas las incubaciones se llevaron a cabo en un agitador orbital (GeneMate) a un ajuste de velocidad de 2.

2.7. Ensayo de migración celular

Se usó el kit de ensayo de curación de heridas de 24 pocillos CytoSelect™ de Cell Biolabs, Inc. para el ensayo de migración celular. Los GM-HDF (0.8×10^5) se sembraron en presencia de un inserto de herida en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante 48 horas. A continuación, se retiró el inserto de herida y las células se cultivaron adicionalmente en medio de suero reducido (1%) que contenía 15 µg/ml de colágeno tipo I (COL1) durante 8 horas. Se adquirieron imágenes de campo claro de las heridas 0, 2, 4, 6 y 8 horas después de retirar el inserto de herida con el sistema de citometría de imagenes Celigo® (Cyntellect). El área superficial de la herida en cada momento se midió utilizando ImageJ (Institutos Nacionales de Salud). Los datos se dan como el porcentaje de migración (% de migración) que cubre el área de la herida.

3. Análisis de datos

La qPCR se realizó utilizando un instrumento ABI 7900 utilizando el software SDS2.3. Los datos experimentales se visualizaron y exportaron en el software SDS 2.4. Se utilizó el software FlowJo V10 para analizar los datos de citometría de flujo. Se utilizó el software ImagJ para cuantificar el porcentaje de migración celular para el ensayo descrito en la Sección 2.7. ImageJ es un programa de procesamiento de imágenes de código abierto desarrollado por el Instituto Nacional de Salud y diseñado para imágenes científicas multidimensionales.

4. Resultados

4.1. Caracterización de la expresión de C7

Los objetivos generales de esta evaluación eran aumentar el número de copias y la expresión de proteína mediante una comparación de métodos de transducción y vectores LV. Los objetivos específicos eran:

1. Evaluar el efecto de la supertransducción en el número de copias integradas

2. Evaluar el efecto de la espinoculación en el número de copias integradas

3. Compare los valores del número de copias entre INXN-2002 e INXN-2004 en condiciones supertransducidas y espinoculadas.

Se usaron dos lotes GMP de construcciones de LV-COL7 para estos estudios: el INXN-2002 y la construcción INXN-2004 como se describe en este ejemplo.

4.1.1. Número de copias de LV-COL7

Se obtuvieron células del experimento de entrenamiento de GM-HDF y se determinó el número de copias como se describe anteriormente en la Sección 2.1. La Tabla 46 a continuación proporciona el número de copias/célula de los experimentos de entrenamiento que utilizan los nuevos métodos de transducción. La optimización inicial implementó la adición de centrifugación durante el etapa de transducción ("espinoculación"). La transducción convencional se había utilizado anteriormente con INXN-2002 y dio como resultado un número de copias integradas que variaban de 0.013 a 0.025. La adición de solo la etapa de espinoculación para la transducción con INXN-2002 dio como resultado un aumento de ≥2 veces en el número de copias integradas a 0.05 por célula (TR11 Grupo B, Tabla 46) en comparación con los resultados de TR8 de estudios anteriores.

Para mejorar aún más el número de copias integradas, se añadió una segunda transducción ("supertransducción") al procedimiento de producción de GM-HDF. La adición de la supertransducción, utilizando también espinoculación, aumentó aún más el número de copias integradas de INXN-2002 en aproximadamente 2 veces (TR11 Grupo A, Tabla 46).

Los estudios de investigación a pequeña escala (no mostrados) demostraron que una construcción de LV-COL7 INXN-2004 de segunda generación, que utiliza un esqueleto de LV autoinactivante de 3ª generación alternativo, tenía el potencial de lograr un mayor número de copias integradas, lo que daba como resultado niveles de expresión más altos, al mismo tiempo que utilizaba una multiplicidad de infección (MOI) más baja que la utilizada para INXN-2002. Cuando se usó a escala de GMP con el procedimiento de transducción optimizado (espinoculaciones con supertransducción), INXN-2004 mejoró aún más el número de copias integradas de LV de aproximadamente 4 a 8 veces más que la construcción INXN-2002 para lograr un número de copias promedio de 0.41. a 0.74 (TR12.1 y TR13, respectivamente, Tabla 46).

Cabe destacar que los grupos B de TR12.1 y TR13 no se ensayaron respecto al número de copias ya que no pasaron por todo el procedimiento de producción (Tabla 44). Las evaluaciones precisas del número de copias requieren células que se hayan sometido a pases varias veces después de la transducción para garantizar que ya no queden copias episomales de LV, que pueden inflar artificialmente los números de copias medidos.

Tabla 46: Número de copias de LV-COL7 en células del experimento de producción de GM-HDF

Experimento de producción	LV-COL7 Usado	Grupo	MOI (UI/célula)	Super-transducción[1]	Copias de gen por célula
TR8[2]	INXN-2002 (piloto)	A	3.4	No	0.021 ±0.005
TR11	INXN-2002 (GMP)	A	0.77	Sí	0.09±0.03
		B	0.77	No	0.05±0.01
		Control[3]	n/a	No	BLQ[4]
TR12.1[5]	INXN-2004 (GMP)	A	0.12	Sí	0.41±0.19
TR13[5]	INXN-2004 (GMP)	A	0.12	Sí	0.74±0.10

[1] Solo los grupos indicados fueron supertransducidos; todos los grupos de TR11, TR12.1 y TR13 fueron espinoculados

[2] Los datos del grupo A de TR8 se presentan como un comparador para los resultados anteriores presentados en RDEB-ADSO-2

[3] El grupo de control se transdujo de forma simulada y no se expuso a LV-COL7

[4] BLQ: por debajo del límite inferior de cuantificación

[5] El grupo B tanto para TR12.1 como TR13 no se continuó durante todo el procedimiento de producción y no se ensayó respecto a los números de copias de LV-COL7

4.1.2. Expresión de proteína C7

Se usó inmunofluorescencia indirecta (IF) para examinar la expresión de proteína C7 por células GM-HDF usando un anticuerpo específico para C7. Los grupos A y B de TR11, y solo el grupo A de TR12.1 y TR13 se analizaron por IF. Se usaron fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) como control positivo y el grupo de control de TR11 se usó como control negativo. A continuación, en la Figura 31, se muestran imágenes representativas con dos aumentos,

20x y 5x. También se incluyen como comparación para el procedimiento original imágenes de IF de células del grupo A de TR8 que tenían números de copias de LV-COL7 integradas de 0.015 por célula. De acuerdo con el número de copias de LV integradas presentado en la Tabla 46 anterior, solo se visualizó un pequeño número de GM-HDF de TR11 con anticuerpos para C7, aunque aún mayor que el número de células positivas para C7 de TR8. Además, los números de copias más altos medidos de los GM-HDF de TR12.1 y TR13 se correlacionan con números más altos de células positivas para la detección de C7. Cabe destacar que la señal de los GM-HDF que son positivos para C7 es más brillante que la señal de los NHDF, lo que sugiere mayores cantidades de C7 producidas por los GM-HDF por célula.

A continuación, se cuantificó el número específico de células que expresaban C7 utilizando un ensayo de citometría de flujo. Como se describe en la Sección 2.3, este ensayo utilizó un anticuerpo policlonal específico de la región NC1. Para este experimento, se incluyeron células del grupo B de TR12.1 y TR13 para comparar el procedimiento de transducción único (Grupo B) con el procedimiento de supertransducción (Grupo A) utilizando la construcción de LV-COL7 de segunda generación (INXN-2004). Como se muestra en la Figura 32 a continuación, el porcentaje de células positivas para C7 (C7+) para cada grupo de experimento de entrenamiento es consistente con el número cualitativo de células que expresan C7 detectado por IF (Figura 32) y se correlaciona con el número de copias medido (Tabla 46). La comparación de células C7+ entre el grupo A y el grupo B para TR12.1 y TR13 confirma la casi duplicación de los niveles de expresión que se predecirían mediante la adición de una segunda transducción.

Se usó un ELISA directo para medir el C7 secretado por los GM-HDF en los medios de cultivo celular. Este ensayo, como se describe en la Sección 2.4, también utilizó el anticuerpo policlonal específico de la región NC1. Los resultados del ensayo ELISA de los GM-HDF de los tres experimentos de entrenamiento muestran que la expresión de C7 depende del nivel de número de copias de LV integradas alcanzando los niveles de expresión aproximadamente 2300 ng/día/1e6 células (Figura 33). En comparación con el grupo A de TR8 como resultado representativo de estudios previos (RDEB-ADSO-2), esto representa un aumento de >200 veces en la expresión de C7 (Figura 33).

4.2. Evaluación funcional de C7 expresado por GM-HDF

4.2.1. Formación de trímeros de C7

La formación de trímeros C7 es fundamental en el ensamblaje de las fibrillas de anclaje (Bruckner-Tuderman, 1999). Para verificar que el C7 expresado por los GM-HDF será capaz de formar fibrillas de anclaje, se evaluó la formación de trímeros de C7 en los GM-HDF por inmunoprecipitación (IP) con un anticuerpo específico anti-C7 (fNC1) para captura selectiva, y después la concentración de C7 de los líquidos sobrenadantes de cultivo para detección por SDS-PAGE/inmunotransferencia. Se usó C7 recombinante purificado como control positivo y la etapa de captura sin anticuerpo específico de C7 se usó como control negativo. Los resultados de la IP para los tres experimentos de entrenamiento mostraron que el C7 producido por los HDF-GM era predominantemente trimérico (Figura 34) con algunas especies de menor peso molecular presentes que mostraban inmunorreactividad, probablemente las formas dimérica y monomérica de C7.

4.2.2. Unión de Lam332 por C7 expresado de los GM-HDF

Se ha mostrado que C7 se une a los componentes de la matriz extracelular (ECM) inmovilizada, incluida la fibronectina, Laminina-332 (Lam332), COL1 y COL4 (Chen, et al., 2002a). La interacción entre C7 y Lam332 se produce a través del dominio NC1 NH2-terminal de C7 y depende de la conformación nativa tanto de Lam332 como de NC1 de C7 (Rousselle, et al., 1997). La asociación entre C7 y Lam332 es importante para establecer la arquitectura correcta de Lam332 en la unión dermoepidérmica. Tal organización es fundamental para las interacciones con ligandos extracelulares y receptores de superficie celular, y para la señalización celular (Waterman, et al., 2007). Intrexon desarrolló un ELISA utilizando un anticuerpo contra el dominio NC1 de C7 para detectar la unión de C7 a Lam332 purificado. Los resultados de dos experimentos, presentados en la Figura 35, muestran la unión dependiente del número de copias a Lam332 por C7 expresado por los GM-HDF de los tres experimentos de entrenamiento. Se utilizaron células de control de TR11 como control negativo en ambos experimentos.

4.2.3. Ensayo de migración celular

Estudios previos han mostrado que los fibroblastos y queratinocitos de RDEB muestran un aumento en la motilidad en relación con sus homólogos normales, y que la motilidad normal se puede restablecer mediante la expresión de C7 (Chen, et al., 2000; Chen, et al., 2002b; Cogan, et al., 2014; Baldeschi et al., 2003). La mayoría de estos estudios emplearon el ensayo de migración de sal de oro coloidal para medir la migración de fibroblastos y queratinocitos, o un ensayo de cicatrización de heridas para medir la migración de queratinocitos. En este ejemplo, se usó un kit de ensayo de cicatrización de heridas de 24 pocillos CytoSelect™ (Cell Biolabs, Inc.) para medir la motilidad de los NHDF y GM-HDF.

Para determinar si la presencia de C7 en el medio de cultivo es suficiente para revertir el fenotipo de hipermotilidad de la RDEB, el ensayo de cicatrización de heridas se llevó a cabo en GM-HDF de los tres experimentos de entrenamiento, con NHDF como control positivo y los grupos de control de transducción simulada (RDEB) como control negativo. Los fibroblastos de control del grupo C de TR11 (RDEB) presentaban un fenotipo de hipermotilidad que se invierte con la expresión de C7 (Figura 36). Curiosamente, los niveles de reversión del fenotipo no dependían del número de copias integradas/niveles de expresión de C7, lo que sugiere que incluso los niveles bajos de expresión de C7 son suficientes para revertir el fenotipo de hipermotilidad.

5. Conclusiones

El número de copias del transgén integradas por célula en los GM-HDF se mejoró mediante la adición de métodos de transducción mejorados (espinoculación y supertransducción) y un cambio a la construcción de LV-COL7 INXN-2004, con niveles logrado tan altos como 0.74 copias por célula. El número de veces de mejora lograda con cada cambio de procedimiento es el siguiente:

- La adición de espinoculación: ≥2 veces

- La adición de supertransducción (con espinoculación): ~2 veces

- El cambio de INXN-2002 a INXN-2004: >4 veces

- El cambio acumulado total desde el procedimiento original: promedio de >27 veces (TR12.1 y TR13 en comparación con TR8 utilizado en los estudios originales)

La expresión de C7 dependiente del número de copias integradas de las células GM-HDF se confirmó mediante tinción de inmunofluorescencia, citometría de flujo y ELISA. Se logró una mejora de >200 veces en la expresión de C7 en relación con los resultados de TR8 presentados en la presentación IND 16582 Serie 0000.

Se confirmó que la estructura del C7 expresado por las células GM-HDF era predominantemente trimérica por inmunoprecipitación/SDS-PAGE/análisis de inmunotransferencia.

Además, se confirmó que el C7 producido de las células GM-HDF era funcional con la unión a Laminina-332 *in vitro* y por la corrección del fenotipo de hipermotilidad de las células RDEB de control en un ensayo de migración *in vitro*

Apéndice 4

```
COL7A1          ATGACGCTGCGGCTTCTGGTGGCCGCGCTCTGCGCCGGGATCCTGGCAGAGGCGCCCCGA 60
Genbank         ATGACGCTGCGGCTTCTGGTGGCCGCGCTCTGCGCCGGGATCCTGGCAGAGGCGCCCCGA 60
                ************************************************************

COL7A1          GTGCGAGCCCAGCACAGGGAGAGAGTGACCTGCACGCGCCTTTACGCCGCTGACATTGTG 120
Genbank         GTGCGAGCCCAGCACAGGGAGAGAGTGACCTGCACGCGCCTTTACGCCGCTGACATTGTG 120
                ************************************************************

COL7A1          TTCTTACTGGATGGCTCCTCATCCATTGGCCGCAGCAATTTCCGCGAGGTCCGCAGCTTT 180
Genbank         TTCTTACTGGATGGCTCCTCATCCATTGGCCGCAGCAATTTCCGCGAGGTCCGCAGCTTT 180
                ************************************************************

COL7A1          CTCGAAGGGCTGGTGCTGCCTTTCTCTGGAGCAGCCAGTGCACAGGGTGTGCGCTTTGCC 240
Genbank         CTCGAAGGGCTGGTGCTGCCTTTCTCTGGAGCAGCCAGTGCACAGGGTGTGCGCTTTGCC 240
                ************************************************************

COL7A1          ACAGTGCAGTACAGCGATGACCCACGGACAGAGTTCGGCCTGGATGCACTTGGCTCTGGG 300
Genbank         ACAGTGCAGTACAGCGATGACCCACGGACAGAGTTCGGCCTGGATGCACTTGGCTCTGGG 300
                ************************************************************

COL7A1          GGTGATGTGATCCGCGCCATCCGTGAGCTTAGCTACAAGGGGGGCAACACTCGCACAGGG 360
Genbank         GGTGATGTGATCCGCGCCATCCGTGAGCTTAGCTACAAGGGGGGCAACACTCGCACAGGG 360
                ************************************************************

COL7A1          GCTGCAATTCTCCATGTGGCTGACCATGTCTTCCTGCCCCAGCTGGCCCGACCTGGTGTC 420
Genbank         GCTGCAATTCTCCATGTGGCTGACCATGTCTTCCTGCCCCAGCTGGCCCGACCTGGTGTC 420
                ************************************************************

COL7A1          CCCAAGGTCTGCATCCTGATCACAGACGGGAAGTCCCAGGACCTGGTGGACACAGCTGCC 480
Genbank         CCCAAGGTCTGCATCCTGATCACAGACGGGAAGTCCCAGGACCTGGTGGACACAGCTGCC 480
                ************************************************************

COL7A1          CAAAGGCTGAAGGGGCAGGGGGTCAAGCTATTTGCTGTGGGGATCAAGAATGCTGACCCT 540
Genbank         CAAAGGCTGAAGGGGCAGGGGGTCAAGCTATTTGCTGTGGGGATCAAGAATGCTGACCCT 540
                ************************************************************

COL7A1          GAGGAGCTGAAGCGAGTTGCCTCACAGCCCACCAGTGACTTCTTCTTCTTCGTCAATGAC 600
Genbank         GAGGAGCTGAAGCGAGTTGCCTCACAGCCCACCAGTGACTTCTTCTTCTTCGTCAATGAC 600
                ************************************************************

COL7A1          TTCAGCATCTTGAGGACACTACTGCCCCTCGTTTCCCGGAGAGTGTGCACGACTGCTGGT 660
Genbank         TTCAGCATCTTGAGGACACTACTGCCCCTCGTTTCCCGGAGAGTGTGCACGACTGCTGGT 660
                ************************************************************

COL7A1          GGCGTGCCTGTGACCCGACCTCCGGATGACTCGACCTCTGCTCCACGAGACCTGGTGCTG 720
Genbank         GGCGTGCCTGTGACCCGACCTCCGGATGACTCGACCTCTGCTCCACGAGACCTGGTGCTG 720
                ************************************************************

COL7A1          TCTGAGCCAAGCAGCCAATCCTTGAGAGTACAGTGGACAGCGGCCAGTGGCCCTGTGACT 780
Genbank         TCTGAGCCAAGCAGCCAATCCTTGAGAGTACAGTGGACAGCGGCCAGTGGCCCTGTGACT 780
                ************************************************************

COL7A1          GGCTACAAGGTCCAGTACACTCCTCTGACGGGGCTGGGACAGCCACTGCCGAGTGAGCGG 840
Genbank         GGCTACAAGGTCCAGTACACTCCTCTGACGGGGCTGGGACAGCCACTGCCGAGTGAGCGG 840
                ************************************************************

COL7A1          CAGGAGGTGAACGTCCCAGCTGGTGAGACCAGTGTGCGGCTGCGGGGTCTCCGGCCACTG 900
Genbank         CAGGAGGTGAACGTCCCAGCTGGTGAGACCAGTGTGCGGCTGCGGGGTCTCCGGCCACTG 900
                ************************************************************
```

```
COL7A1          ACCGAGTACCAAGTGACTGTGATTGCCCTCTACGCCAACAGCATCGGGGAGGCTGTGAGC 960
Genbank         ACCGAGTACCAAGTGACTGTGATTGCCCTCTACGCCAACAGCATCGGGGAGGCTGTGAGC 960
                ************************************************************

COL7A1          GGGACAGCTCGGACCACTGCCCTAGAAGGGCCGGAACTGACCATCCAGAATACCACAGCC 1020
Genbank         GGGACAGCTCGGACCACTGCCCTAGAAGGGCCGGAACTGACCATCCAGAATACCACAGCC 1020
                ************************************************************

COL7A1          CACAGCCTCCTGGTGGCCTGGCGGAGTGTGCCAGGTGCCACTGGCTACCGTGTGACATGG 1080
Genbank         CACAGCCTCCTGGTGGCCTGGCGGAGTGTGCCAGGTGCCACTGGCTACCGTGTGACATGG 1080
                ************************************************************

COL7A1          CGGGTCCTCAGTGGTGGGCCCACACAGCAGCAGGAGCTGGGCCCTGGGCAGGGTTCAGTG 1140
Genbank         CGGGTCCTCAGTGGTGGGCCCACACAGCAGCAGGAGCTGGGCCCTGGGCAGGGTTCAGTG 1140
                ************************************************************

COL7A1          TTGCTGCGTGACTTGGAGCCTGGCACGGACTATGAGGTGACCGTGAGCACCCTATTTGGC 1200
Genbank         TTGCTGCGTGACTTGGAGCCTGGCACGGACTATGAGGTGACCGTGAGCACCCTATTTGGC 1200
                ************************************************************

COL7A1          CGCAGTGTGGGGCCCGCCACTTCCCTGATGGCTCGCACTGACGCTTCTGTTGAGCAGACC 1260
Genbank         CGCAGTGTGGGGCCCGCCACTTCCCTGATGGCTCGCACTGACGCTTCTGTTGAGCAGACC 1260
                ************************************************************

COL7A1          CTGCGCCCGGTCATCCTGGGCCCCACATCCATCCTCCTTTCCTGGAACTTGGTGCCTGAG 1320
Genbank         CTGCGCCCGGTCATCCTGGGCCCCACATCCATCCTCCTTTCCTGGAACTTGGTGCCTGAG 1320
                ************************************************************

COL7A1          GCCCGTGGCTACCGGTTGGAATGGCGGCGTGAGACTGGCTTGGAGCCACCGCAGAAGGTG 1380
Genbank         GCCCGTGGCTACCGGTTGGAATGGCGGCGTGAGACTGGCTTGGAGCCACCGCAGAAGGTG 1380
                ************************************************************

COL7A1          GTACTGCCCTCTGATGTGACCCGCTACCAGTTGGATGGGCTGCAGCCGGGCACTGAGTAC 1440
Genbank         GTACTGCCCTCTGATGTGACCCGCTACCAGTTGGATGGGCTGCAGCCGGGCACTGAGTAC 1440
                ************************************************************

COL7A1          CGCCTCACACTCTACACTCTGCTGGAGGGCCACGAGGTGGCCACCCCTGCAACCGTGGTT 1500
Genbank         CGCCTCACACTCTACACTCTGCTGGAGGGCCACGAGGTGGCCACCCCTGCAACCGTGGTT 1500
                ************************************************************

COL7A1          CCCACTGGACCAGAGCTGCCTGTGAGCCCTGTAACAGACCTGCAAGCCACCGAGCTGCCC 1560
Genbank         CCCACTGGACCAGAGCTGCCTGTGAGCCCTGTAACAGACCTGCAAGCCACCGAGCTGCCC 1560
                ************************************************************

COL7A1          GGGCAGCGGGTGCGAGTGTCCTGGAGCCCAGTCCCTGGTGCCACCCAGTACCGCATCATT 1620
Genbank         GGGCAGCGGGTGCGAGTGTCCTGGAGCCCAGTCCCTGGTGCCACCCAGTACCGCATCATT 1620
                ************************************************************

COL7A1          GTGCGCAGCACCCAGGGGGTTGAGCGGACCCTGGTGCTTCCTGGGAGTCAGACAGCATTC 1680
Genbank         GTGCGCAGCACCCAGGGGGTTGAGCGGACCCTGGTGCTTCCTGGGAGTCAGACAGCATTC 1680
                ************************************************************

COL7A1          GACTTGGATGACGTTCAGGCTGGGCTTAGCTACACTGTGCGGGTGTCTGCTCGAGTGGGT 1740
Genbank         GACTTGGATGACGTTCAGGCTGGGCTTAGCTACACTGTGCGGGTGTCTGCTCGAGTGGGT 1740
                ************************************************************

COL7A1          CCCCGTGAGGGCAGTGCCAGTGTCCTCACTGTCCGCCGGGAGCCGGAAACTCCACTTGCT 1800
Genbank         CCCCGTGAGGGCAGTGCCAGTGTCCTCACTGTCCGCCGGGAGCCGGAAACTCCACTTGCT 1800
                ************************************************************

COL7A1          GTTCCAGGGCTGCGGGTTGTGGTGTCAGATGCAACGCGAGTGAGGGTGGCCTGGGGACCC 1860
Genbank         GTTCCAGGGCTGCGGGTTGTGGTGTCAGATGCAACGCGAGTGAGGGTGGCCTGGGGACCC 1860
                ************************************************************
```

```
COL7A1          GTCCCTGGAGCCAGTGGATTTCGGATTAGCTGGAGCACAGGCAGTGGTCCGGAGTCCAGC 1920
Genbank         GTCCCTGGAGCCAGTGGATTTCGGATTAGCTGGAGCACAGGCAGTGGTCCGGAGTCCAGC 1920
                ************************************************************

COL7A1          CAGACACTGCCCCCAGACTCTACTGCCACAGACATCACAGGGCTGCAGCCTGGAACCACC 1980
Genbank         CAGACACTGCCCCCAGACTCTACTGCCACAGACATCACAGGGCTGCAGCCTGGAACCACC 1980
                ************************************************************

COL7A1          TACCAGGTGGCTGTGTCGGTACTGCGAGGCAGAGAGGAGGGCCCTGCTGCAGTCATCGTG 2040
Genbank         TACCAGGTGGCTGTGTCGGTACTGCGAGGCAGAGAGGAGGGCCCTGCTGCAGTCATCGTG 2040
                ************************************************************

COL7A1          GCTCGAACGGACCCACTGGGCCCAGTGAGGACGGTCCATGTGACTCAGGCCAGCAGCTCA 2100
Genbank         GCTCGAACGGACCCACTGGGCCCAGTGAGGACGGTCCATGTGACTCAGGCCAGCAGCTCA 2100
                ************************************************************

COL7A1          TCTGTCACCATTACCTGGACCAGGGTTCCTGGCGCCACAGGATACAGGGTTTCCTGGCAC 2160
Genbank         TCTGTCACCATTACCTGGACCAGGGTTCCTGGCGCCACAGGATACAGGGTTTCCTGGCAC 2160
                ************************************************************

COL7A1          TCAGCCCACGGCCCAGAGAAATCCCAGTTGGTTTCTGGGGAGGCCACGGTGGCTGAGCTG 2220
Genbank         TCAGCCCACGGCCCAGAGAAATCCCAGTTGGTTTCTGGGGAGGCCACGGTGGCTGAGCTG 2220
                ************************************************************

COL7A1          GATGGACTGGAGCCAGATACTGAGTATACGGTGCATGTGAGGGCCCATGTGGCTGGCGTG 2280
Genbank         GATGGACTGGAGCCAGATACTGAGTATACGGTGCATGTGAGGGCCCATGTGGCTGGCGTG 2280
                ************************************************************

COL7A1          GATGGGCCCCCTGCCTCTGTGGTTGTGAGGACTGCCCCTGAGCCTGTGGGTCGTGTGTCG 2340
Genbank         GATGGGCCCCCTGCCTCTGTGGTTGTGAGGACTGCCCCTGAGCCTGTGGGTCGTGTGTCG 2340
                ************************************************************

COL7A1          AGGCTGCAGATCCTCAATGCTTCCAGCGACGTTCTACGGATCACCTGGGTAGGGGTCACT 2400
Genbank         AGGCTGCAGATCCTCAATGCTTCCAGCGACGTTCTACGGATCACCTGGGTAGGGGTCACT 2400
                ************************************************************

COL7A1          GGAGCCACAGCTTACAGACTGGCCTGGGGCCGGAGTGAAGGCGGCCCCATGAGGCACCAG 2460
Genbank         GGAGCCACAGCTTACAGACTGGCCTGGGGCCGGAGTGAAGGCGGCCCCATGAGGCACCAG 2460
                ************************************************************

COL7A1          ATACTCCCAGGAAACACAGACTCTGCAGAGATCCGGGGTCTCGAAGGTGGAGTCAGCTAC 2520
Genbank         ATACTCCCAGGAAACACAGACTCTGCAGAGATCCGGGGTCTCGAAGGTGGAGTCAGCTAC 2520
                ************************************************************

COL7A1          TCAGTGCGAGTGACTGCACTTGTCGGGGACCGCGAGGGCACACCTGTCTCCATTGTTGTC 2580
Genbank         TCAGTGCGAGTGACTGCACTTGTCGGGGACCGCGAGGGCACACCTGTCTCCATTGTTGTC 2580
                ************************************************************

COL7A1          ACTACGCCGCCTGAGGCTCCGCCAGCCCTGGGGACGCTTCACGTGGTGCAGCGCGGGGAG 2640
Genbank         ACTACGCCGCCTGAGGCTCCGCCAGCCCTGGGGACGCTTCACGTGGTGCAGCGCGGGGAG 2640
                ************************************************************

COL7A1          CACTCGCTGAGGCTGCGCTGGGAGCCGGTGCCCAGAGCGCAGGGCTTCCTTCTGCACTGG 2700
Genbank         CACTCGCTGAGGCTGCGCTGGGAGCCGGTGCCCAGAGCGCAGGGCTTCCTTCTGCACTGG 2700
                ************************************************************

COL7A1          CAACCTGAGGGTGGCCAGGAACAGTCCCGGGTCCTGGGGCCCGAGCTCAGCAGCTATCAC 2760
Genbank         CAACCTGAGGGTGGCCAGGAACAGTCCCGGGTCCTGGGGCCCGAGCTCAGCAGCTATCAC 2760
                ************************************************************

COL7A1          CTGGACGGGCTGGAGCCAGCGACACAGTACCGCGTGAGGCTGAGTGTCCTAGGGCCNGCT 2820
Genbank         CTGGACGGGCTGGAGCCAGCGACACAGTACCGCGTGAGGCTGAGTGTCCTAGGGCCNGCT 2820
```

```
                ************************************************************.***

COL7A1          GGAGAAGGGCCCTCTGCAGAGGTGACTGCGCGCACTGAGTCACCTCGTGTTCCAAGCATT 2880
Genbank         GGAGAAGGGCCCTCTGCAGAGGTGACTGCGCGCACTGAGTCACCTCGTGTTCCAAGCATT 2880
                ************************************************************

COL7A1          GAACTACGTGTGGTGGACACCTCGATCGACTCGGTGACTTTGGCCTGGACTCCAGTGTCC 2940
Genbank         GAACTACGTGTGGTGGACACCTCGATCGACTCGGTGACTTTGGCCTGGACTCCAGTGTCC 2940
                ************************************************************

COL7A1          AGGGCATCCAGCTACATCCTATCCTGGCGGCCACTCAGAGGCCCTGGCCAGGAAGTGCCT 3000
Genbank         AGGGCATCCAGCTACATCCTATCCTGGCGGCCACTCAGAGGCCCTGGCCAGGAAGTGCCT 3000
                ************************************************************

COL7A1          GGGTCCCCGCAGACACTTCCAGGGATCTCAAGCTCCCAGCGGGTGACAGGGCTAGAGCCT 3060
Genbank         GGGTCCCCGCAGACACTTCCAGGGATCTCAAGCTCCCAGCGGGTGACAGGGCTAGAGCCT 3060
                ************************************************************

COL7A1          GGCGTCTCTTACATCTTCTCCCTGACGCCTGTCCTGGATGGTGTGCGGGGTCCTGAGGCA 3120
Genbank         GGCGTCTCTTACATCTTCTCCCTGACGCCTGTCCTGGATGGTGTGCGGGGTCCTGAGGCA 3120
                ************************************************************

COL7A1          TCTGTCACACAGACGCCAGTGTGCCCCCGTGGCCTGGCGGATGTGGTGTTCCTACCACAT 3180
Genbank         TCTGTCACACAGACGCCAGTGTGCCCCCGTGGCCTGGCGGATGTGGTGTTCCTACCACAT 3180
                ************************************************************

COL7A1          GCCACTCAAGACAATGCTCACCGTGCGGAGGCTACGAGGAGGGTCCTGGAGCGTCTGGTG 3240
Genbank         GCCACTCAAGACAATGCTCACCGTGCGGAGGCTACGAGGAGGGTCCTGGAGCGTCTGGTG 3240
                ************************************************************

COL7A1          TTGGCACTTGGGCCTCTTGGGCCACAGGCAGTTCAGGTTGGCCTGCTGTCTTACAGTCAT 3300
Genbank         TTGGCACTTGGGCCTCTTGGGCCACAGGCAGTTCAGGTTGGCCTGCTGTCTTACAGTCAT 3300
                ************************************************************

COL7A1          CGGCCCTCCCCACTGTTCCCACTGAATGGCTCCCATGACCTTGGCATTATCTTGCAAAGG 3360
Genbank         CGGCCCTCCCCACTGTTCCCACTGAATGGCTCCCATGACCTTGGCATTATCTTGCAAAGG 3360
                ************************************************************

COL7A1          ATCCGTGACATGCCCTACATGGACCCAAGTGGGAACAACCTGGGCACAGCCGTGGTCACA 3420
Genbank         ATCCGTGACATGCCCTACATGGACCCAAGTGGGAACAACCTGGGCACAGCCGTGGTCACA 3420
                ************************************************************

COL7A1          GCTCACAGATACATGTTGGCACCAGATGCTCCTGGGCGCCGCCAGCACGTACCAGGGGTG 3480
Genbank         GCTCACAGATACATGTTGGCACCAGATGCTCCTGGGCGCCGCCAGCACGTACCAGGGGTG 3480
                ************************************************************

COL7A1          ATGGTTCTGCTAGTGGATGAACCCTTGAGAGGTGACATATTCAGCCCCATCCGTGAGGCC 3540
Genbank         ATGGTTCTGCTAGTGGATGAACCCTTGAGAGGTGACATATTCAGCCCCATCCGTGAGGCC 3540
                ************************************************************

COL7A1          CAGGCTTCTGGGCTTAATGTGGTGATGTTGGGAATGGCTGGAGCGGACCCAGAGCAGCTG 3600
Genbank         CAGGCTTCTGGGCTTAATGTGGTGATGTTGGGAATGGCTGGAGCGGACCCAGAGCAGCTG 3600
                ************************************************************

COL7A1          CGTCGCTTGGCGCCGGGTATGGACTCTGTCCAGACCTTCTTCGCCGTGGATGATGGGCCA 3660
Genbank         CGTCGCTTGGCGCCGGGTATGGACTCTGTCCAGACCTTCTTCGCCGTGGATGATGGGCCA 3660
                ************************************************************

COL7A1          AGCCTGGACCAGGCAGTCAGTGGTCTGGCCACAGCCCTGTGTCAGGCATCCTTCACTACT 3720
Genbank         AGCCTGGACCAGGCAGTCAGTGGTCTGGCCACAGCCCTGTGTCAGGCATCCTTCACTACT 3720
                ************************************************************
```

```
COL7A1          CAGCCCCGGCCAGAGCCCTGCCCAGTGTATTGTCCAAAGGGCCAGAAGGGGGAACCTGGA 3780
Genbank         CAGCCCCGGCCAGAGCCCTGCCCAGTGTATTGTCCAAAGGGCCAGAAGGGGGAACCTGGA 3780
                ************************************************************

COL7A1          GAGATGGGCCTGAGAGGACAAGTTGGGCCTCCTGGCGACCCTGGCCTCCCGGGCAGGACC 3840
Genbank         GAGATGGGCCTGAGAGGACAAGTTGGGCCTCCTGGCGACCCTGGCCTCCCGGGCAGGACC 3840
                ************************************************************

COL7A1          GGTGCTCCCGGCCCCCAGGGGCCCCCTGGAAGTGCCACTGCCAAGGGCGAGAGGGGCTTC 3900
Genbank         GGTGCTCCCGGCCCCCAGGGGCCCCCTGGAAGTGCCACTGCCAAGGGCGAGAGGGGCTTC 3900
                ************************************************************

COL7A1          CCTGGAGCAGATGGGCGTCCAGGCAGCCCTGGCCGCGCCGGGAATCCTGGGACCCCTGGA 3960
Genbank         CCTGGAGCAGATGGGCGTCCAGGCAGCCCTGGCCGCGCCGGGAATCCTGGGACCCCTGGA 3960
                ************************************************************

COL7A1          GCCCCTGGCCTAAAGGGCTCTCCAGGGTTGCCTGGCCCTCGTGGGGACCCGGGAGAGCGA 4020
Genbank         GCCCCTGGCCTAAAGGGCTCTCCAGGGTTGCCTGGCCCTCGTGGGGACCCGGGAGAGCGA 4020
                ************************************************************

COL7A1          GGACCTCGAGGCCCAAAGGGGGAGCCGGGGGCTCCCGGACAAGTCATCGGAGGTGAAGGA 4080
Genbank         GGACCTCGAGGCCCAAAGGGGGAGCCGGGGGCTCCCGGACAAGTCATCGGAGGTGAAGGA 4080
                ************************************************************

COL7A1          CCTGGGCTTCCTGGGCGGAAAGGGGACCCTGGACCATCGGGCCCCCCTGGACCTCGTGGA 4140
Genbank         CCTGGGCTTCCTGGGCGGAAAGGGGACCCTGGACCATCGGGCCCCCCTGGACCTCGTGGA 4140
                ************************************************************

COL7A1          CCACTGGGGGACCCAGGACCCCGTGGCCCCCCAGGGCTTCCTGGAACAGCCATGAAGGGT 4200
Genbank         CCACTGGGGGACCCAGGACCCCGTGGCCCCCCAGGGCTTCCTGGAACAGCCATGAAGGGT 4200
                ************************************************************

COL7A1          GACAAAGGCGATCGTGGGGAGCGGGGTCCCCCTGGACCAGGTGAAGGTGGCATTGCTCCT 4260
Genbank         GACAAAGGCGATCGTGGGGAGCGGGGTCCCCCTGGACCAGGTGAAGGTGGCATTGCTCCT 4260
                ************************************************************

COL7A1          GGGGAGCCTGGGCTGCCGGGTCTTCCCGGAAGCCCTGGACCCCAAGGCCCCGTTGGCCCC 4320
Genbank         GGGGAGCCTGGGCTGCCGGGTCTTCCCGGAAGCCCTGGACCCCAAGGCCCCGTTGGCCCC 4320
                ************************************************************

COL7A1          CCTGGAAAGAAAGGAGAAAAAAGGTGACTCTGAGGATGGAGCTCCAGGCCTCCCAGGACAA 4380
Genbank         CCTGGAAAGAAAGGAGAAAAAAGGTGACTCTGAGGATGGAGCTCCAGGCCTCCCAGGACAA 4380
                ************************************************************

COL7A1          CCTGGGTCTCCGGGTGAGCAGGGCCCACGGGGACCTCCTGGAGCTATTGGCCCCAAAGGT 4440
Genbank         CCTGGGTCTCCGGGTGAGCAGGGCCCACGGGGACCTCCTGGAGCTATTGGCCCCAAAGGT 4440
                ************************************************************

COL7A1          GACCGGGGCTTTCCAGGGCCCCTGGGTGAGGCTGGAGAGAAGGGCGAACGTGGACCCCCA 4500
Genbank         GACCGGGGCTTTCCAGGGCCCCTGGGTGAGGCTGGAGAGAAGGGCGAACGTGGACCCCCA 4500
                ************************************************************

COL7A1          GGCCCAGCGGGATCCCGGGGGCTGCCAGGGGTTGCTGGACGTCCTGGAGCCAAGGGTCCT 4560
Genbank         GGCCCAGCGGGATCCCGGGGGCTGCCAGGGGTTGCTGGACGTCCTGGAGCCAAGGGTCCT 4560
                ************************************************************

COL7A1          GAAGGGCCACCAGGACCCACTGGCCGCCAAGGAGAGAAGGGGGAGCCTGGTCGCCCTGGG 4620
Genbank         GAAGGGCCACCAGGACCCACTGGCCGCCAAGGAGAGAAGGGGGAGCCTGGTCGCCCTGGG 4620
                ************************************************************

COL7A1          GACCCTGCAGTGGTGGGACCTGCTGTTGCTGGACCCAAAGGAGAAAAGGGAGATGTGGGG 4680
Genbank         GACCCTGCAGTGGTGGGACCTGCTGTTGCTGGACCCAAAGGAGAAAAGGGAGATGTGGGG 4680
                ************************************************************
```

```
COL7A1          CCCGCTGGGCCCAGAGGAGCTACCGGAGTCCAAGGGGAACGGGGCCCACCCGGCTTGGTT 4740
Genbank         CCCGCTGGGCCCAGAGGAGCTACCGGAGTCCAAGGGGAACGGGGCCCACCCGGCTTGGTT 4740
                ************************************************************

COL7A1          CTTCCTGGAGACCCTGGCCCCAAGGGAGACCCTGGAGACCGGGGTCCCATTGGCCTTACT 4800
Genbank         CTTCCTGGAGACCCTGGCCCCAAGGGAGACCCTGGAGACCGGGGTCCCATTGGCCTTACT 4800
                ************************************************************

COL7A1          GGCAGAGCAGGACCCCCAGGTGACTCAGGGCCTCCTGGAGAGAAGGGAGACCCTGGGCGG 4860
Genbank         GGCAGAGCAGGACCCCCAGGTGACTCAGGGCCTCCTGGAGAGAAGGGAGACCCTGGGCGG 4860
                ************************************************************

COL7A1          CCTGGCCCCCCCAGGACCTGTTGGCCCCCGAGGACGAGATGGTGAAGTTGGAGAGAAAGGT 4920
Genbank         CCTGGCCCCCCCAGGACCTGTTGGCCCCCGAGGACGAGATGGTGAAGTTGGAGAGAAAGGT 4920
                ************************************************************

COL7A1          GACGAGGGTCCTCCGGGTGACCCGGGTTTGCCTGGAAAAGCAGGCGAGCGTGGCCTTCGG 4980
Genbank         GACGAGGGTCCTCCGGGTGACCCGGGTTTGCCTGGAAAAGCAGGCGAGCGTGGCCTTCGG 4980
                ************************************************************

COL7A1          GGGGCACCTGGAGTTCGGGGGCCTGTGGGTGAAAAGGGAGACCAGGGAGATCCTGGAGAG 5040
Genbank         GGGGCACCTGGAGTTCGGGGGCCTGTGGGTGAAAAGGGAGACCAGGGAGATCCTGGAGAG 5040
                ************************************************************

COL7A1          GATGGACGAAATGGCAGCCCTGGATCATCTGGACCCAAGGGTGACCGTGGGGAGCCGGGT 5100
Genbank         GATGGACGAAATGGCAGCCCTGGATCATCTGGACCCAAGGGTGACCGTGGGGAGCCGGGT 5100
                ************************************************************

COL7A1          CCCCCAGGACCCCCGGGACGGCTGGTAGACACAGGACCTGGAGCCAGAGAGAAGGGAGAG 5160
Genbank         CCCCCAGGACCCCCGGGACGGCTGGTAGACACAGGACCTGGAGCCAGAGAGAAGGGAGAG 5160
                ************************************************************

COL7A1          CCTGGGGACCGCGGACAAGAGGGTCCTCGAGGGCCCAAGGGTGATCCTGGCCTCCCTGGA 5220
Genbank         CCTGGGGACCGCGGACAAGAGGGTCCTCGAGGGCCCAAGGGTGATCCTGGCCTCCCTGGA 5220
                ************************************************************

COL7A1          GCCCCTGGGGAAAGGGGCATTGAAGGGTTTCGGGGACCCCCAGGCCCACAGGGGGACCCA 5280
Genbank         GCCCCTGGGGAAAGGGGCATTGAAGGGTTTCGGGGACCCCCAGGCCCACAGGGGGACCCA 5280
                ************************************************************

COL7A1          GGTGTCCGAGGCCCAGCAGGAGAAAAGGGTGACCGGGGTCCCCCTGGGCTGGATGGCCGG 5340
Genbank         GGTGTCCGAGGCCCAGCAGGAGAAAAGGGTGACCGGGGTCCCCCTGGGCTGGATGGCCGG 5340
                ************************************************************

COL7A1          AGCGGACTGGATGGGAAACCAGGAGCCGCTGGGCCCTCTGGGCCGAATGGTGCTGCAGGC 5400
Genbank         AGCGGACTGGATGGGAAACCAGGAGCCGCTGGGCCCTCTGGGCCGAATGGTGCTGCAGGC 5400
                ************************************************************

COL7A1          AAAGCTGGGGACCCAGGGAGAGACGGGCTTCCAGGCCTCCGTGGAGAACA▒GGCCTCCCT 5460
Genbank         AAAGCTGGGGACCCAGGGAGAGACGGGCTTCCAGGCCTCCGTGGAGAACA▒GGCCTCCCT 5460
                ************************************************.*********

COL7A1          GGCCCCTCTGGTCCCCCTGGATTACCGGGAAAGCCAGGCGAGGATGG▒AAACCTGGCCTG 5520
Genbank         GGCCCCTCTGGTCCCCCTGGATTACCGGGAAAGCCAGGCGAGGATGG▒AAACCTGGCCTG 5520
                ********************************************* ************

COL7A1          AATGGAAAAAACGGAGAACCTGGGGACCCTGGAGAAGACGGGAGGAAGGGAGAGAAAGGA 5580
Genbank         AATGGAAAAAACGGAGAACCTGGGGACCCTGGAGAAGACGGGAGGAAGGGAGAGAAAGGA 5580
                ************************************************************
```

```
COL7A1          GATTCAGGCGCCTCTGGGAGAGAAGGTCGTGATGGCCCCAAGGGTGAGCGTGGAGCTCCT 5640
Genbank         GATTCAGGCGCCTCTGGGAGAGAAGGTCGTGATGGCCCCAAGGGTGAGCGTGGAGCTCCT 5640
                ************************************************************

COL7A1          GGTATCCTTGGACCCCAGGGGCCTCCAGGCCTCCCAGGGCCAGTGGGCCCTCCTGGCCAG 5700
Genbank         GGTATCCTTGGACCCCAGGGGCCTCCAGGCCTCCCAGGGCCAGTGGGCCCTCCTGGCCAG 5700
                ************************************************************

COL7A1          GGTTTTCCTGGTGTCCCAGGAGGCACGGGCCCCAAGGGTGACCGTGGGGAGACTGGATCC 5760
Genbank         GGTTTTCCTGGTGTCCCAGGAGGCACGGGCCCCAAGGGTGACCGTGGGGAGACTGGATCC 5760
                ************************************************************

COL7A1          AAAGGGGAGCAGGGCCTCCCTGGAGAGCGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTGGAAGTGTGCCG 5820
Genbank         AAAGGGGAGCAGGGCCTCCCTGGAGAGCGTGGCCTGCGAGGAGAGCCTGGAAGTGTGCCG 5820
                ************************************************************

COL7A1          AATGTGGATCGGTTGCTGGAAACTGCTGGCATCAAGGCATCTGCCCTGCGGGAGATCGTG 5880
Genbank         AATGTGGATCGGTTGCTGGAAACTGCTGGCATCAAGGCATCTGCCCTGCGGGAGATCGTG 5880
                ************************************************************

COL7A1          GAGACCTGGGATGAGAGCTCTGGTAGCTTCCTGCCTGTGCCCGAACGGCGTCGAGGCCCC 5940
Genbank         GAGACCTGGGATGAGAGCTCTGGTAGCTTCCTGCCTGTGCCCGAACGGCGTCGAGGCCCC 5940
                ************************************************************

COL7A1          AAGGGGGACTCAGGCGAACAGGGCCCCCCAGGCAAGGAGGGCCCCATCGGCTTTCCTGGA 6000
Genbank         AAGGGGGACTCAGGCGAACAGGGCCCCCCAGGCAAGGAGGGCCCCATCGGCTTTCCTGGA 6000
                ************************************************************

COL7A1          GAACGCGGGCTGAAGGGCGACCGTGGAGACCCTGGCCCTCAGGGGCCACCTGGTCTGGCC 6060
Genbank         GAACGCGGGCTGAAGGGCGACCGTGGAGACCCTGGCCCTCAGGGGCCACCTGGTCTGGCC 6060
                ************************************************************

COL7A1          CTTGGGGAGAGGGGCCCCCCCGGGCCTTCCGGCCTTGCCGGGGAGCCTGGAAAGCCTGGT 6120
Genbank         CTTGGGGAGAGGGGCCCCCCCGGGCCTTCCGGCCTTGCCGGGGAGCCTGGAAAGCCTGGT 6120
                ************************************************************

COL7A1          ATTCCCGGGCTCCCAGGCAGGGCTGGGGGTGTGGGAGAGGCAGGAAGGCCAGGAGAGAGG 6180
Genbank         ATTCCCGGGCTCCCAGGCAGGGCTGGGGGTGTGGGAGAGGCAGGAAGGCCAGGAGAGAGG 6180
                ************************************************************

COL7A1          GGAGAACGGGGAGAGAAAGGAGAACGTGGAGAACAGGGCAGAGATGGCCCTCCTGGACTC 6240
Genbank         GGAGAACGGGGAGAGAAAGGAGAACGTGGAGAACAGGGCAGAGATGGCCCTCCTGGACTC 6240
                ************************************************************

COL7A1          CCTGGAACCCCTGGGCCCCCCGGACCCCCTGGCCCCAAGGTGTCTGTGGATGAGCCAGGT 6300
Genbank         CCTGGAACCCCTGGGCCCCCCGGACCCCCTGGCCCCAAGGTGTCTGTGGATGAGCCAGGT 6300
                ************************************************************

COL7A1          CCTGGACTCTCTGGAGAACAGGGACCCCCTGGACTCAAGGGTGCTAAGGGGGAGCCGGGC 6360
Genbank         CCTGGACTCTCTGGAGAACAGGGACCCCCTGGACTCAAGGGTGCTAAGGGGGAGCCGGGC 6360
                ************************************************************

COL7A1          AGCAATGGTGACCAAGGTCCCAAAGGAGACAGGGGTGTGCCAGGCATCAAAGGAGACCGG 6420
Genbank         AGCAATGGTGACCAAGGTCCCAAAGGAGACAGGGGTGTGCCAGGCATCAAAGGAGACCGG 6420
                ************************************************************

COL7A1          GGAGAGCCTGGACCGAGGGGTCAGGACGGCAACCCGGGTCTACCAGGAGAGCGTGGTATG 6480
Genbank         GGAGAGCCTGGACCGAGGGGTCAGGACGGCAACCCGGGTCTACCAGGAGAGCGTGGTATG 6480
                ************************************************************

COL7A1          GCTGGGCCTGAAGGGAAGCCGGGTCTGCAGGGTCCAAGAGGCCCCCCTGGCCCAGTGGGT 6540
Genbank         GCTGGGCCTGAAGGGAAGCCGGGTCTGCAGGGTCCAAGAGGCCCCCCTGGCCCAGTGGGT 6540
                ************************************************************
```

```
COL7A1          GGTCATGGAGACCCTGGACCACCTGGTGCCCCGGGTCTTGCTGGCCCTGCAGGACCCCAA 6600
Genbank         GGTCATGGAGACCCTGGACCACCTGGTGCCCCGGGTCTTGCTGGCCCTGCAGGACCCCAA 6600
                ************************************************************

COL7A1          GGACCTTCTGGCCTGAAGGGGGAGCCTGGAGAGACAGGACCTCCAGGACGGGGCCTGACT 6660
Genbank         GGACCTTCTGGCCTGAAGGGGGAGCCTGGAGAGACAGGACCTCCAGGACGGGGCCTGACT 6660
                ************************************************************

COL7A1          GGACCTACTGGAGCTGTGGGACTTCCTGGACCCCCCGGCCCTTCAGGCCTTGTGGGTCCA 6720
Genbank         GGACCTACTGGAGCTGTGGGACTTCCTGGACCCCCCGGCCCTTCAGGCCTTGTGGGTCCA 6720
                ************************************************************

COL7A1          CAGGGGTCTCCAGGTTTGCCTGGACAAGTGGGGGAGACAGGGAAGCCGGGAGCCCCAGGT 6780
Genbank         CAGGGGTCTCCAGGTTTGCCTGGACAAGTGGGGGAGACAGGGAAGCCGGGAGCCCCAGGT 6780
                ************************************************************

COL7A1          CGAGATGGTGCCAGTGGAAAAGATGGAGACAGAGGGAGCCCTGGTGTGCCAGGGTCACCA 6840
Genbank         CGAGATGGTGCCAGTGGAAAAGATGGAGACAGAGGGAGCCCTGGTGTGCCAGGGTCACCA 6840
                ************************************************************

COL7A1          GGTCTGCCTGGCCCTGTCGGACCTAAAGGAGAACCTGGCCCCACGGGGGCCCCTGGACAG 6900
Genbank         GGTCTGCCTGGCCCTGTCGGACCTAAAGGAGAACCTGGCCCCACGGGGGCCCCTGGACAG 6900
                ************************************************************

COL7A1          GCTGTGGTCGGGCTCCCTGGAGCAAAGGGAGAGAAGGGAGCCCCTGGAGGCCTTGCTGGA 6960
Genbank         GCTGTGGTCGGGCTCCCTGGAGCAAAGGGAGAGAAGGGAGCCCCTGGAGGCCTTGCTGGA 6960
                ************************************************************

COL7A1          GACCTGGTGGGTGAGCCGGGAGCCAAAGGTGACCGAGGACTGCCAGGGCCGCGAGGCGAG 7020
Genbank         GACCTGGTGGGTGAGCCGGGAGCCAAAGGTGACCGAGGACTGCCAGGGCCGCGAGGCGAG 7020
                ************************************************************

COL7A1          AAGGGTGAAGCTGGCCGTGCAGGGGAGCCCGGAGACCCTGGGGAAGATGGTCAGAAAGGG 7080
Genbank         AAGGGTGAAGCTGGCCGTGCAGGGGAGCCCGGAGACCCTGGGGAAGATGGTCAGAAAGGG 7080
                ************************************************************

COL7A1          GCTCCAGGACCCAAAGGTTTCAAGGGTGACCCAGGAGTCGGGGTCCCGGGCTCCCCTGGG 7140
Genbank         GCTCCAGGACCCAAAGGTTTCAAGGGTGACCCAGGAGTCGGGGTCCCGGGCTCCCCTGGG 7140
                ************************************************************

COL7A1          CCTCCTGGCCCTCCAGGTGTGAAGGGAGATCTGGGCCTCCCTGGCCTGCCCGGTGCTCCT 7200
Genbank         CCTCCTGGCCCTCCAGGTGTGAAGGGAGATCTGGGCCTCCCTGGCCTGCCCGGTGCTCCT 7200
                ************************************************************

COL7A1          GGTGTTGTTGGGTTCCCGGGTCAGACAGGCCCTCGAGGAGAGATGGGTCAGCCAGGCCCT 7260
Genbank         GGTGTTGTTGGGTTCCCGGGTCAGACAGGCCCTCGAGGAGAGATGGGTCAGCCAGGCCCT 7260
                ************************************************************

COL7A1          AGTGGAGAGCGGGGTCTGGCAGGCCCCCCAGGGAGAGAAGGAATCCCAGGACCCCTGGGG 7320
Genbank         AGTGGAGAGCGGGGTCTGGCAGGCCCCCCAGGGAGAGAAGGAATCCCAGGACCCCTGGGG 7320
                ************************************************************

COL7A1          CCACCTGGACCACCGGGGTCAGTGGGACCACCTGGGGCCTCTGGACTCAAAGGAGACAAG 7380
Genbank         CCACCTGGACCACCGGGGTCAGTGGGACCACCTGGGGCCTCTGGACTCAAAGGAGACAAG 7380
                ************************************************************

COL7A1          GGAGACCCTGGAGTAGGGCTGCCTGGGCCCCGAGGCGAGCGTGGGGAGCCAGGCATCCGG 7440
Genbank         GGAGACCCTGGAGTAGGGCTGCCTGGGCCCCGAGGCGAGCGTGGGGAGCCAGGCATCCGG 7440
                ************************************************************

COL7A1          GGTGAAGATGGCCGCCCCGGCCAGGAGGGACCCCGAGGACTCACGGGGCCCCCTGGCAGC 7500
Genbank         GGTGAAGATGGCCGCCCCGGCCAGGAGGGACCCCGAGGACTCACGGGGCCCCCTGGCAGC 7500
```

```
                ************************************************************

COL7A1          AGGGGAGAGCGTGGGGAGAAGGGTGATGTTGGGAGTGCAGGACTAAAGGGTGACAAGGGA 7560
Genbank         AGGGGAGAGCGTGGGGAGAAGGGTGATGTTGGGAGTGCAGGACTAAAGGGTGACAAGGGA 7560
                ************************************************************

COL7A1          GACTCAGCTGTGATCCTGGGGCCTCCAGGCCCACGGGGTGCCAAGGGGGACATGGGTGAA 7620
Genbank         GACTCAGCTGTGATCCTGGGGCCTCCAGGCCCACGGGGTGCCAAGGGGGACATGGGTGAA 7620
                ************************************************************

COL7A1          CGAGGGCCTCGGGGCTTGGATGGTGACAAAGGACCTCGGGGAGACAATGGGGACCCTGGT 7680
Genbank         CGAGGGCCTCGGGGCTTGGATGGTGACAAAGGACCTCGGGGAGACAATGGGGACCCTGGT 7680
                ************************************************************

COL7A1          GACAAGGGCAGCAAGGGAGAGCCTGGTGACAAGGGCTCAGCCGGGTTGCCAGGACTGCGT 7740
Genbank         GACAAGGGCAGCAAGGGAGAGCCTGGTGACAAGGGCTCAGCCGGGTTGCCAGGACTGCGT 7740
                ************************************************************

COL7A1          GGACTCCTGGGACCCCAGGGTCAACCTGGTGCAGCAGGGATCCCTGGTGACCCGGGATCC 7800
Genbank         GGACTCCTGGGACCCCAGGGTCAACCTGGTGCAGCAGGGATCCCTGGTGACCCGGGATCC 7800
                ************************************************************

COL7A1          CCAGGAAAGGATGGAGTGCCTGGTATCCGAGGAGAAAAAAGGAGATGTTGGCTTCATGGGT 7860
Genbank         CCAGGAAAGGATGGAGTGCCTGGTATCCGAGGAGAAAAAAGGAGATGTTGGCTTCATGGGT 7860
                ************************************************************

COL7A1          CCCCGGGGCCTCAAGGGTGAACGGGGAGTGAAGGGAGCCTGTGGCCTTGATGGAGAGAAG 7920
Genbank         CCCCGGGGCCTCAAGGGTGAACGGGGAGTGAAGGGAGCCTGTGGCCTTGATGGAGAGAAG 7920
                ************************************************************

COL7A1          GGAGACAAGGGAGAAGCTGGTCCCCCAGGCCGCCCCGGGCTGGCAGGACACAAAGGAGAG 7980
Genbank         GGAGACAAGGGAGAAGCTGGTCCCCCAGGCCGCCCCGGGCTGGCAGGACACAAAGGAGAG 7980
                ************************************************************

COL7A1          ATGGGGGAGCCTGGTGTGCCGGGCCAGTCGGGGGCCCCTGGCAAGGAGGGCCTGATCGGT 8040
Genbank         ATGGGGGAGCCTGGTGTGCCGGGCCAGTCGGGGGCCCCTGGCAAGGAGGGCCTGATCGGT 8040
                ************************************************************

COL7A1          CCCAAGGGTGACCGAGGCTTTGACGGGCAGCCAGGCCCCAAGGGTGACCAGGGCGAGAAA 8100
Genbank         CCCAAGGGTGACCGAGGCTTTGACGGGCAGCCAGGCCCCAAGGGTGACCAGGGCGAGAAA 8100
                ************************************************************

COL7A1          GGGGAGCGGGGAACCCCAGGAATTGGGGGCTTCCCAGGCCCCAGTGGAAATGATGGCTCT 8160
Genbank         GGGGAGCGGGGAACCCCAGGAATTGGGGGCTTCCCAGGCCCCAGTGGAAATGATGGCTCT 8160
                ************************************************************

COL7A1          GCTGGTCCCCCAGGGCCACCTGGCAGTGTTGGTCCCAGAGGCCCCGAAGGACTTCAGGGC 8220
Genbank         GCTGGTCCCCCAGGGCCACCTGGCAGTGTTGGTCCCAGAGGCCCCGAAGGACTTCAGGGC 8220
                ************************************************************

COL7A1          CAGAAGGGTGAGCGAGGTCCCCCCGGAGAGAGAGTGGTGGGGGCTCCTGGGGTCCCTGGA 8280
Genbank         CAGAAGGGTGAGCGAGGTCCCCCCGGAGAGAGAGTGGTGGGGGCTCCTGGGGTCCCTGGA 8280
                ************************************************************

COL7A1          GCTCCTGGCGAGAGAGGGGAGCAGGGGCGGCCAGGGCCTGCCGGTCCTCGAGGCGAGAAG 8340
Genbank         GCTCCTGGCGAGAGAGGGGAGCAGGGGCGGCCAGGGCCTGCCGGTCCTCGAGGCGAGAAG 8340
                ************************************************************

COL7A1          GGAGAAGCTGCACTGACGGAGGATGACATCCGGGGCTTTGTGCGCCAAGAGATGAGTCAG 8400
Genbank         GGAGAAGCTGCACTGACGGAGGATGACATCCGGGGCTTTGTGCGCCAAGAGATGAGTCAG 8400
                ************************************************************

COL7A1          CACTGTGCCTGCCAGGGCCAGTTCATCGCATCTGGATCACGACCCCTCCCTAGTTATGCT 8460
```

```
Genbank         CACTGTGCCTGCCAGGGCCAGTTCATCGCATCTGGATCACGACCCCTCCCTAGTTATGCT 8460
                ************************************************************

COL7A1          GCAGACACTGCCGGCTCCCAGCTCCATGCTGTGCCTGTGCTCCGCGTCTCTCATGCAGAG 8520
Genbank         GCAGACACTGCCGGCTCCCAGCTCCATGCTGTGCCTGTGCTCCGCGTCTCTCATGCAGAG 8520
                ************************************************************

COL7A1          GAGGAAGAGCGGGTACCCCCTGAGGATGATGAGTACTCTGAATACTCCGAGTATTCTGTG 8580
Genbank         GAGGAAGAGCGGGTACCCCCTGAGGATGATGAGTACTCTGAATACTCCGAGTATTCTGTG 8580
                ************************************************************

COL7A1          GAGGAGTACCAGGACCCTGAAGCTCCTTGGGATAGTGATGACCCCTGTTCCCTGCCACTG 8640
Genbank         GAGGAGTACCAGGACCCTGAAGCTCCTTGGGATAGTGATGACCCCTGTTCCCTGCCACTG 8640
                ************************************************************

COL7A1          GATGAGGGCTCCTGCACTGCCTACACCCTGCGCTGGTACCATCGGGCTGTGACAGGCAGC 8700
Genbank         GATGAGGGCTCCTGCACTGCCTACACCCTGCGCTGGTACCATCGGGCTGTGACAGGCAGC 8700
                ************************************************************

COL7A1          ACAGAGGCCTGTCACCCTTTTGTCTATGGTGGCTGTGGAGGGAATGCCAACCGTTTTGGG 8760
Genbank         ACAGAGGCCTGTCACCCTTTTGTCTATGGTGGCTGTGGAGGGAATGCCAACCGTTTTGGG 8760
                ************************************************************

COL7A1          ACCCGTGAGGCCTGCGAGCGCCGCTGCCCACCCCGGGTGGTCCAGAGCCAGGGGACAGGT 8820
Genbank         ACCCGTGAGGCCTGCGAGCGCCGCTGCCCACCCCGGGTGGTCCAGAGCCAGGGGACAGGT 8820
                ************************************************************

COL7A1          ACTGCCCAGGAC 8832 (SEQ ID NO: 23)
Genbank         ACTGCCCAGGAC 8832 (SEQ ID NO: 24)
                ************
```

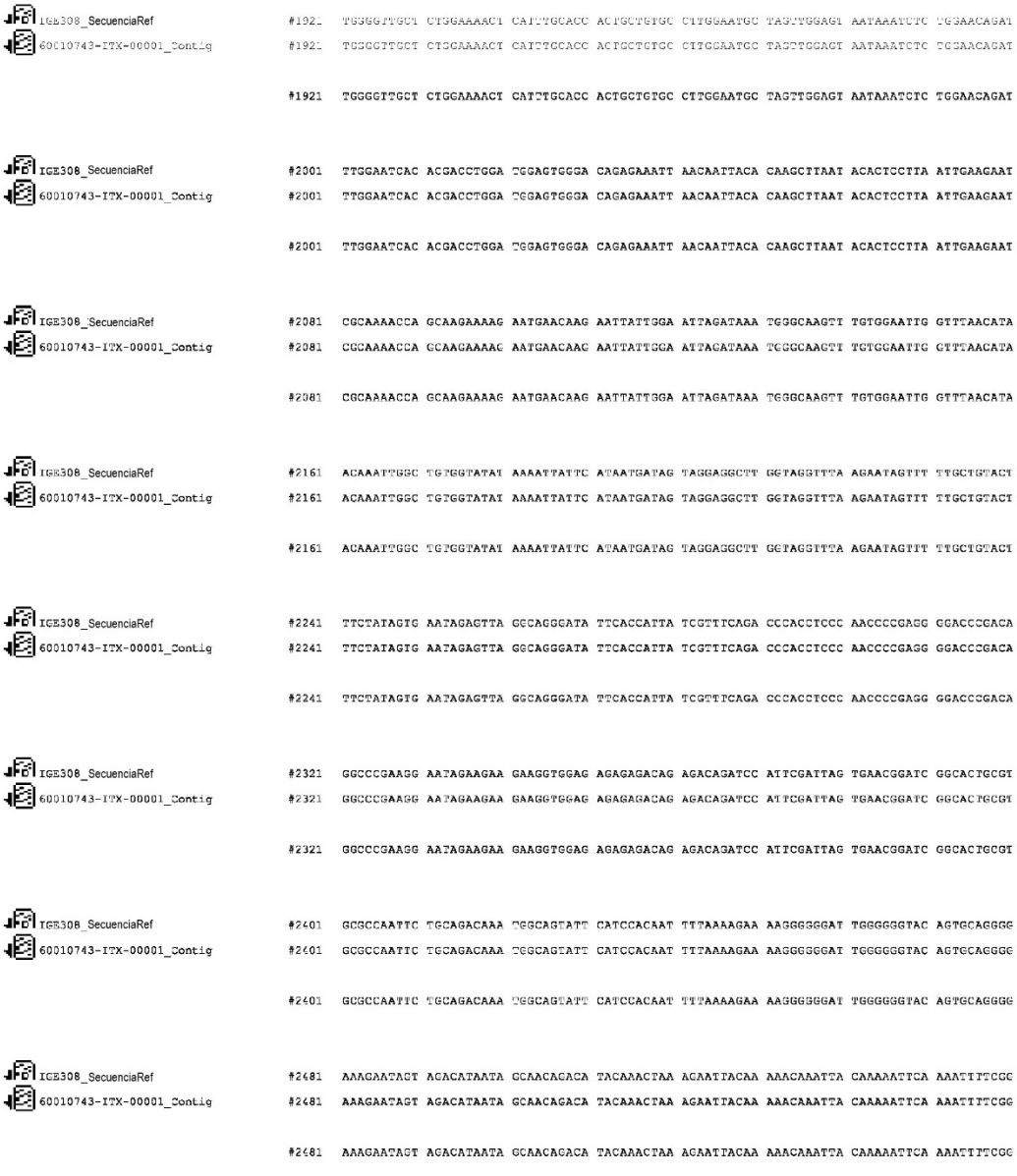
Lo siguiente es un análisis comparativo de la SECUENCIA 60010743-ITX-00001_CONTIG (SEQ ID NO: 34) en relación con la SECUENCIA REF IGE308 (SEQ ID NO: 34).

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF



60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

IGE308_SecuenciaRef #3201 CATTGTGTGC TTTTCGGGCC ACCATGACGC TGCGGCTTCT GGTGGCCGGG CTCTCCGCCG GGATCCTGGC AGACGCGCCC
60010743-ITX-00001_Contig #3201 CATTGTGTGC TTTTCGGGCC ACCATGACGC TGCGGCTTCT GGTGGCCGGG CTCTCCGCCG GGATCCTGGC AGACGCGCCC

#3201 CATTGTGTGC TTTTCGGGCC ACCATGACGC TGCGGCTTCT GGTGGCCGGG CTCTCCGCCG GGATCCTGGC AGACGCGCCC

IGE308_SecuenciaRef #3281 CGAGTGCGAG CCCAGCACAC GGAGAGAGTG ACCTGCACCC GCCTTCACGC CGCTCACATT GTGTTCTTAC TGGATGGCTC
60010743-ITX-00001_Contig #3281 CGAGTGCGAG CCCAGCACAC GGAGAGAGTG ACCTGCACCC GCCTTCACGC CGCTCACATT GTGTTCTTAC TGGATGGCTC

#3281 CGAGTGCGAG CCCAGCACAC GGAGAGAGTG ACCTGCACCC GCCTTCACGC CGCTCACATT GTGTTCTTAC TGGATGGCTC

IGE308_SecuenciaRef #3361 CTCATCCATT GGCCGCAGCA ATTTCCGCGA GGTCCGCAGC CTTCTCGAAG GGCTGGTGCT GCCTTTCTCT GGAGCAGCCA
60010743-ITX-00001_Contig #3361 CTCATCCATT GGCCGCAGCA ATTTCCGCGA GGTCCGCAGC CTTCTCGAAG GGCTGGTGCT GCCTTTCTCT GGAGCAGCCA

#3361 CTCATCCATT GGCCGCAGCA ATTTCCGCGA GGTCCGCAGC CTTCTCGAAG GGCTGGTGCT GCCTTTCTCT GGAGCAGCCA

IGE308_SecuenciaRef #3441 GTGCACAGGG TGTGCGCTTT GCCACAGTGC AGTACAGCGA TGACCCACGG ACAGAGTTCG GCCTGGATGC ACTTGGCTCT
60010743-ITX-00001_Contig #3441 GTGCACAGGG TGTGCGCTTT GCCACAGTGC AGTACAGCGA TGACCCACGG ACAGAGTTCG GCCTGGATGC ACTTGGCTCT

#3441 GTGCACAGGG TGTGCGCTTT GCCACAGTGC AGTACAGCGA TGACCCACGG ACAGAGTTCG GCCTGGATGC ACTTGGCTCT

IGE308_SecuenciaRef #3521 GGGGGTGATG TGATCCGCGC CATCCGTGAG CTTAGCTACA AGGGGGGCAA CACTCGCACA GGGGCTGCAA TTCTCCATGT
60010743-ITX-00001_Contig #3521 GGGGGTGATG TGATCCGCGC CATCCGTGAG CTTAGCTACA AGGGGGGCAA CACTCGCACA GGGGCTGCAA TTCTCCATGT

#3521 GGGGGTGATG TGATCCGCGC CATCCGTGAG CTTAGCTACA AGGGGGGCAA CACTCGCACA GGGGCTGCAA TTCTCCATGT

IGE308_SecuenciaRef #3601 GGCTGACCAT GTCTTCCTGC CCCAGCTGGC CCGACCTGGT GTCCCCAAGG TCTGCATCCT GATCACAGAC GGGAAGTCCC
60010743-ITX-00001_Contig #3601 GGCTGACCAT GTCTTCCTGC CCCAGCTGGC CCGACCTGGT GTCCCCAAGG TCTGCATCCT GATCACAGAC GGGAAGTCCC

#3601 GGCTGACCAT GTCTTCCTGC CCCAGCTGGC CCGACCTGGT GTCCCCAAGG TCTGCATCCT GATCACAGAC GGGAAGTCCC

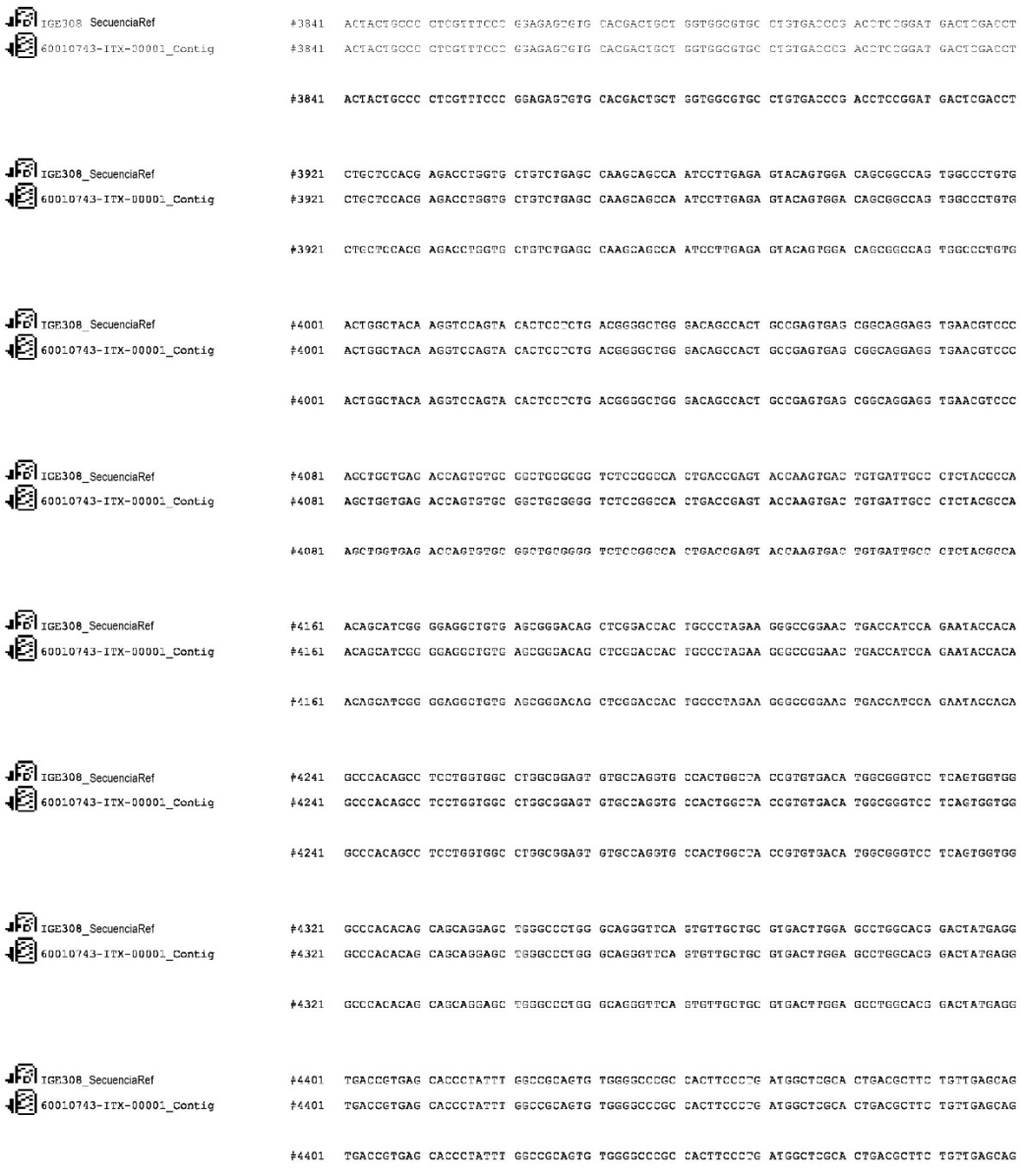
IGE308_SecuenciaRef #3681 AGGACCTGGT GGACACAGCT GCCCAAAGGC TGAAGGGGCA GGGGGCCAAG CTATTTGCTG TGGGGATCAA GAATGCTGAC
60010743-ITX-00001_Contig #3681 AGGACCTGGT GGACACAGCT GCCCAAAGGC TGAAGGGGCA GGGGGCCAAG CTATTTGCTG TGGGGATCAA GAATGCTGAC

#3681 AGGACCTGGT GGACACAGCT GCCCAAAGGC TGAAGGGGCA GGGGGCCAAG CTATTTGCTG TGGGGATCAA GAATGCTGAC

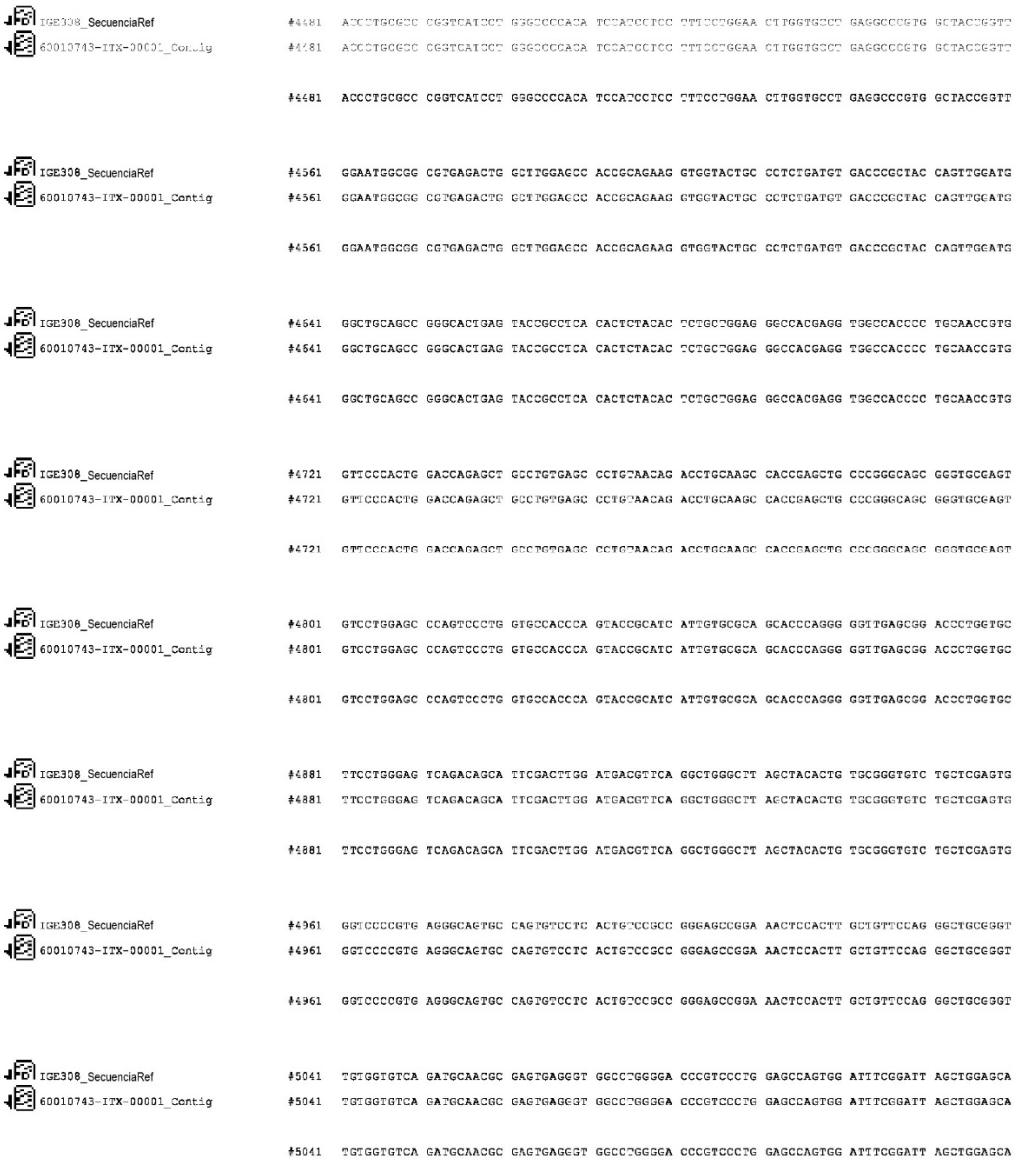
IGE308_SecuenciaRef #3761 CCTGAGGAGC TGAAGCGAGT TGCCTCACAG CCCACCAGTG ACTTCTTCTT CTTCGTCAAT GACTTCAGCA TCTTGAGGAC
60010743-ITX-00001_Contig #3761 CCTGAGGAGC TGAAGCGAGT TGCCTCACAG CCCACCAGTG ACTTCTTCTT CTTCGTCAAT GACTTCAGCA TCTTGAGGAC

#3761 CCTGAGGAGC TGAAGCGAGT TGCCTCACAG CCCACCAGTG ACTTCTTCTT CTTCGTCAAT GACTTCAGCA TCTTGAGGAC

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

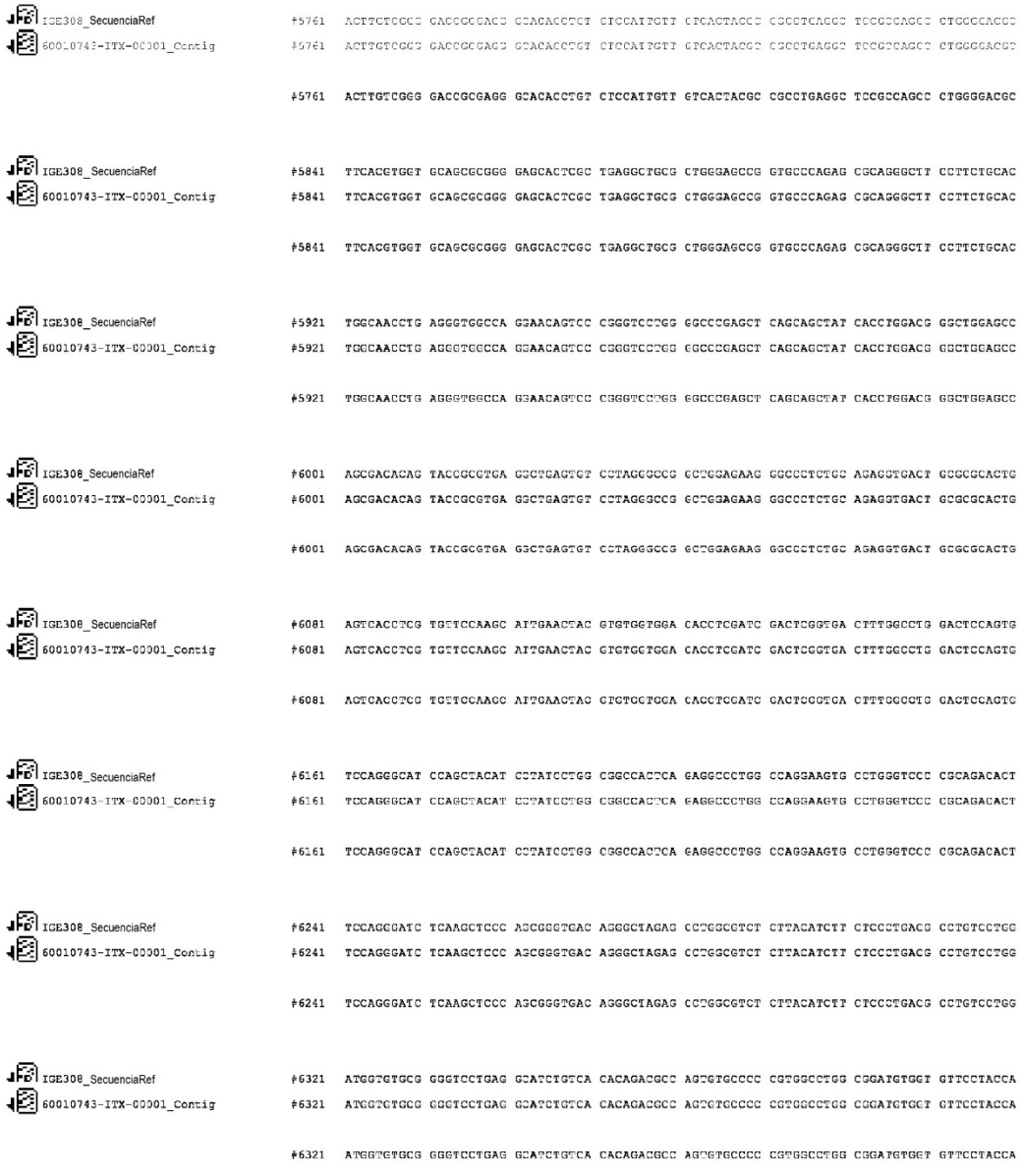


60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF



60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF



60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

IGE308_SecuenciaRef #9601 TCCCAAAGGA CACAGGGGTG TGCCAGGCAT CAAAGGAGAC CGGGGAGAGC CTGGACCGAG GGGTCAGGAC GGCAACCCGG
60010743-ITX-00001_Contig #9601 TCCCAAAGGA CACAGGGGTG TGCCAGGCAT CAAAGGAGAC CGGGGAGAGC CTGGACCGAG GGGTCAGGAC GGCAACCCGG

#9601 TCCCAAAGGA CACAGGGGTG TGCCAGGCAT CAAAGGAGAC CGGGGAGAGC CTGGACCGAG GGGTCAGGAC GGCAACCCGG

IGE308_SecuenciaRef #9681 GTCTACCAGG AGAGCGTGGT ATGGCTGGGC CTGAAGGGAA GCCGGGTCTG CAGGGTCCAA GAGGCCCCCC TGGCCCAGTG
60010743-ITX-00001_Contig #9681 GTCTACCAGG AGAGCGTGGT ATGGCTGGGC CTGAAGGGAA GCCGGGTCTG CAGGGTCCAA GAGGCCCCCC TGGCCCAGTG

#9681 GTCTACCAGG AGAGCGTGGT ATGGCTGGGC CTGAAGGGAA GCCGGGTCTG CAGGGTCCAA GAGGCCCCCC TGGCCCAGTG

IGE308_SecuenciaRef #9761 GGTGGTCATG GAGACCCTGG ACCACCTGGT GCCCCGGGTC TTGCTGGCCC TGCAGGACCC CAAGGACCTT CTGGCCTGAA
60010743-ITX-00001_Contig #9761 GGTGGTCATG GAGACCCTGG ACCACCTGGT GCCCCGGGTC TTGCTGGCCC TGCAGGACCC CAAGGACCTT CTGGCCTGAA

#9761 GGTGGTCATG GAGACCCTGG ACCACCTGGT GCCCCGGGTC TTGCTGGCCC TGCAGGACCC CAAGGACCTT CTGGCCTGAA

IGE308_SecuenciaRef #9841 GGGGGAGCCT GGAGAGACAG GACCTCCAGG ACGGGGCCTG ACTGGACCCA CTGGAGCTGT GGGACTTCCT GGACCCCCCG
60010743-ITX-00001_Contig #9841 GGGGGAGCCT GGAGAGACAG GACCTCCAGG ACGGGGCCTG ACTGGACCCA CTGGAGCTGT GGGACTTCCT GGACCCCCCG

#9841 GGGGGAGCCT GGAGAGACAG GACCTCCAGG ACGGGGCCTG ACTGGACCCA CTGGAGCTGT GGGACTTCCT GGACCCCCCG

IGE308_SecuenciaRef #9921 GCCCTTCAGG CCTTGTGGGT CCACAGGGGT CTCCAGGTTT GCCTGGACAA GTGGGGGAGA CAGGGAAGCC GGGAGCCCCA
60010743-ITX-00001_Contig #9921 GCCCTTCAGG CCTTGTGGGT CCACAGGGGT CTCCAGGTTT GCCTGGACAA GTGGGGGAGA CAGGGAAGCC GGGAGCCCCA

#9921 GCCCTTCAGG CCTTGTGGGT CCACAGGGGT CTCCAGGTTT GCCTGGACAA GTGGGGGAGA CAGGGAAGCC GGGAGCCCCA

IGE308_SecuenciaRef #10001 GGTCGAGATG GTGCCAGTGG AAAAGATGGA GACAGAGGGA GCCCTGGTGT GCCAGGGTCA CCAGGTCTGC CTGGCCCTGT
60010743-ITX-00001_Contig #10001 GGTCGAGATG GTGCCAGTGG AAAAGATGGA GACAGAGGGA GCCCTGGTGT GCCAGGGTCA CCAGGTCTGC CTGGCCCTGT

#10001 GGTCGAGATG GTGCCAGTGG AAAAGATGGA GACAGAGGGA GCCCTGGTGT GCCAGGGTCA CCAGGTCTGC CTGGCCCTGT

IGE308_SecuenciaRef #10081 CGGACCTAAA GGAGAACCTG GCCCCACGGG GGCCCCTGGA CAGGCTGTGG TCGGGCTCCC TGGAGCAAAG GGAGAGAAGG
60010743-ITX-00001_Contig #10081 CGGACCTAAA GGAGAACCTG GCCCCACGGG GGCCCCTGGA CAGGCTGTGG TCGGGCTCCC TGGAGCAAAG GGAGAGAAGG

#10081 CGGACCTAAA GGAGAACCTG GCCCCACGGG GGCCCCTGGA CAGGCTGTGG TCGGGCTCCC TGGAGCAAAG GGAGAGAAGG

IGE308_SecuenciaRef #10161 GAGCCCCTGG AGGCCTTGCT GGAGACCTGG TGGGTGAGCC GGGAGCCAAA GGTGACCGAG GACTGCCAGG GCCGCGAGGC
60010743-ITX-00001_Contig #10161 GAGCCCCTGG AGGCCTTGCT GGAGACCTGG TGGGTGAGCC GGGAGCCAAA GGTGACCGAG GACTGCCAGG GCCGCGAGGC

#10161 GAGCCCCTGG AGGCCTTGCT GGAGACCTGG TGGGTGAGCC GGGAGCCAAA GGTGACCGAG GACTGCCAGG GCCGCGAGGC

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

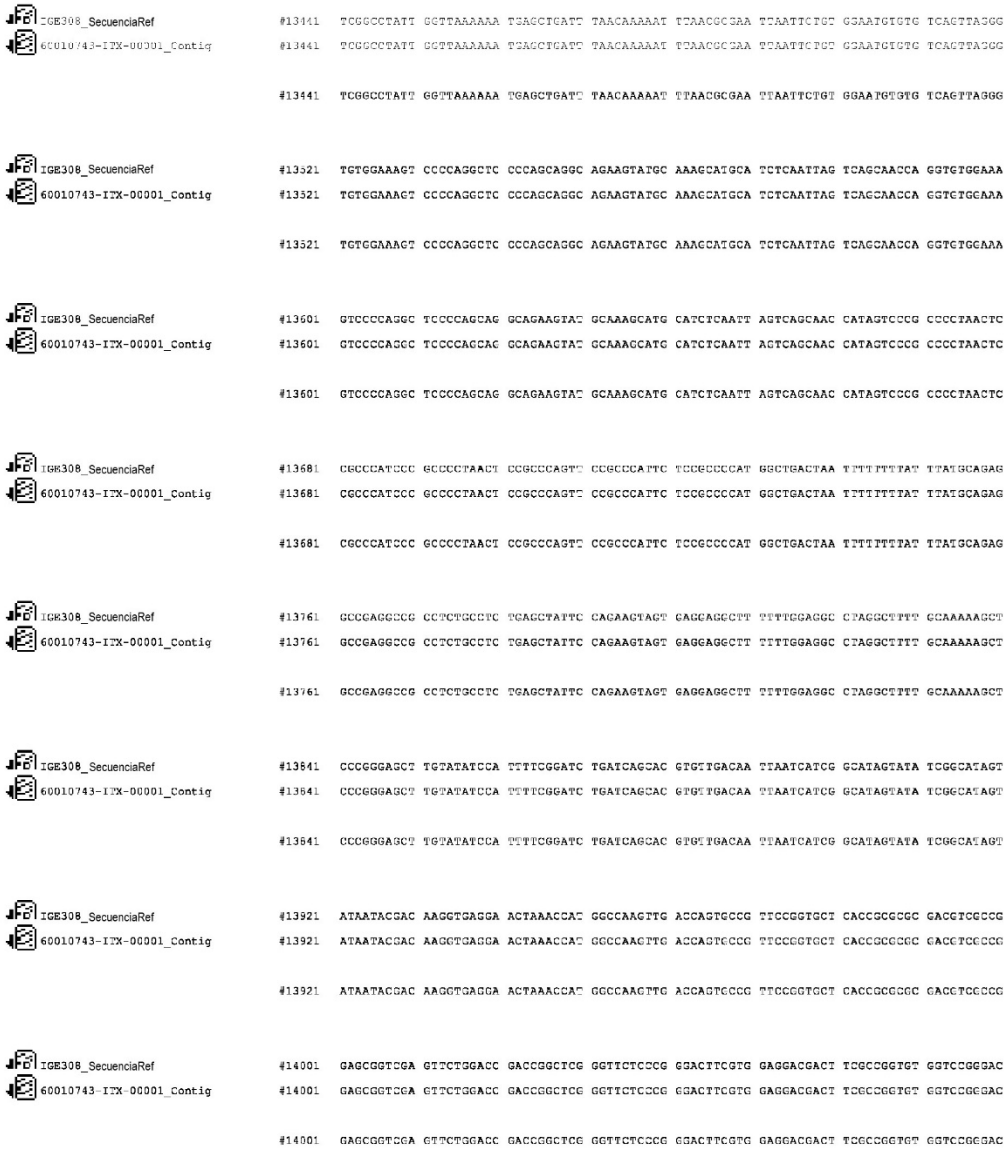
60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

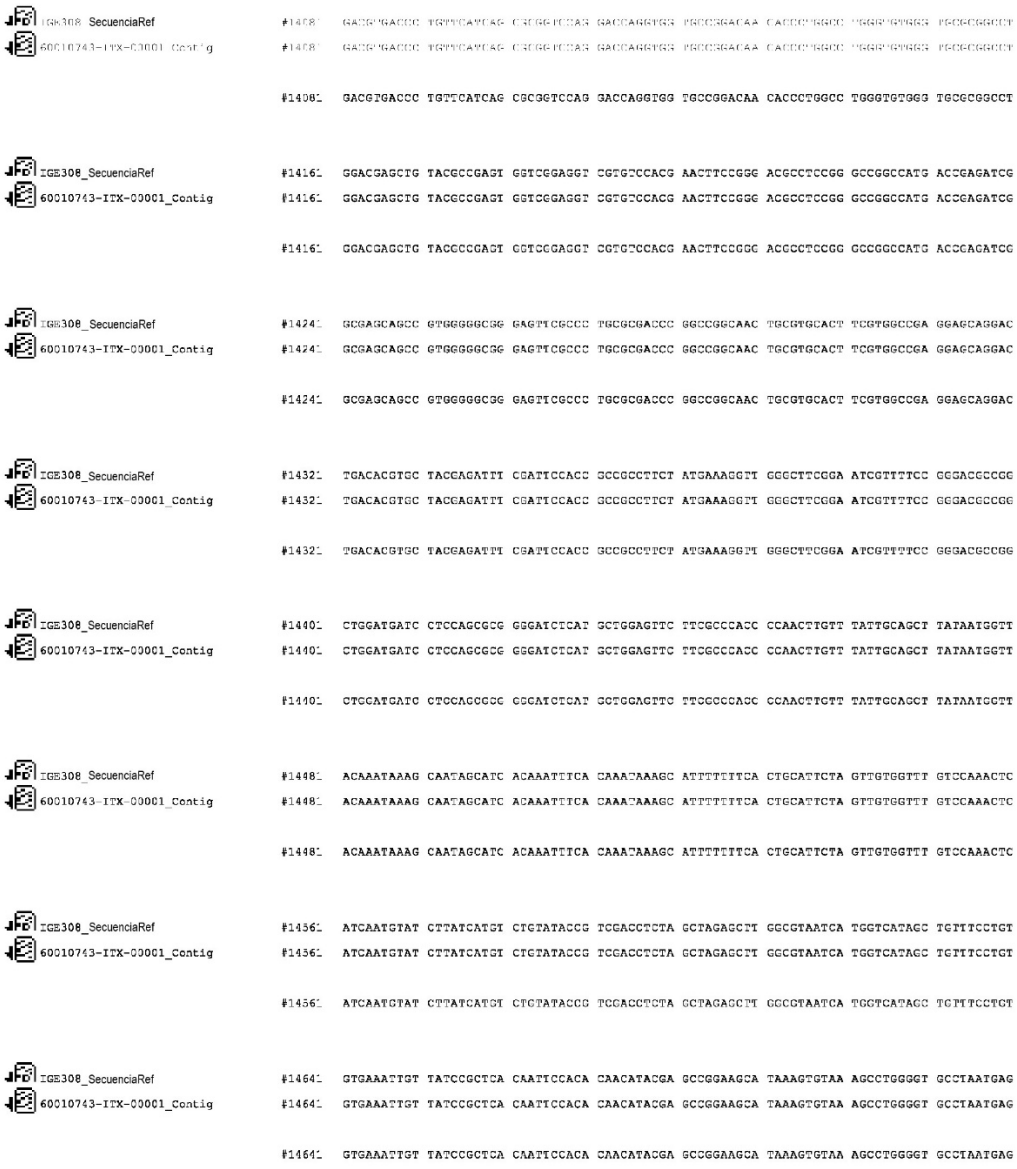
60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF

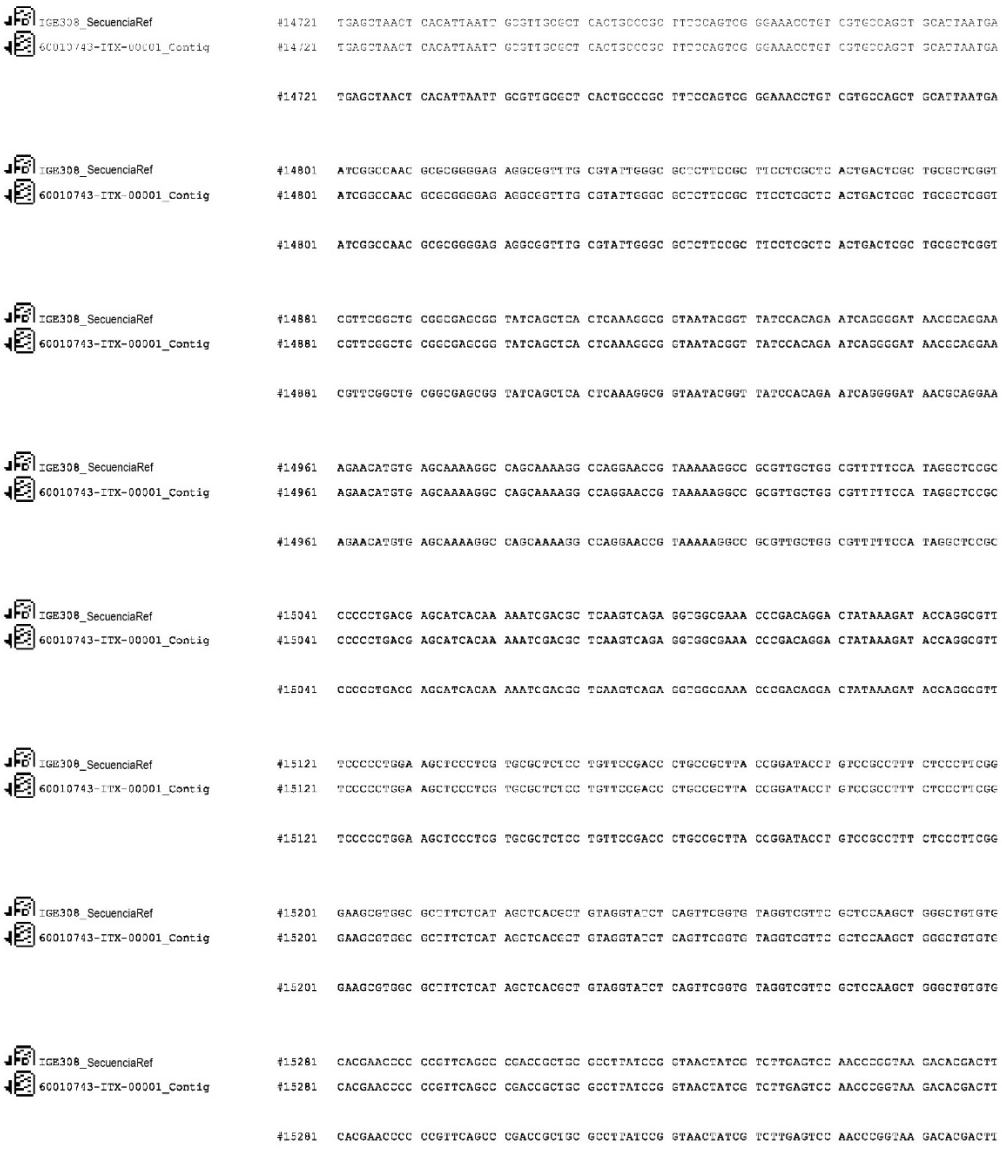
60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF



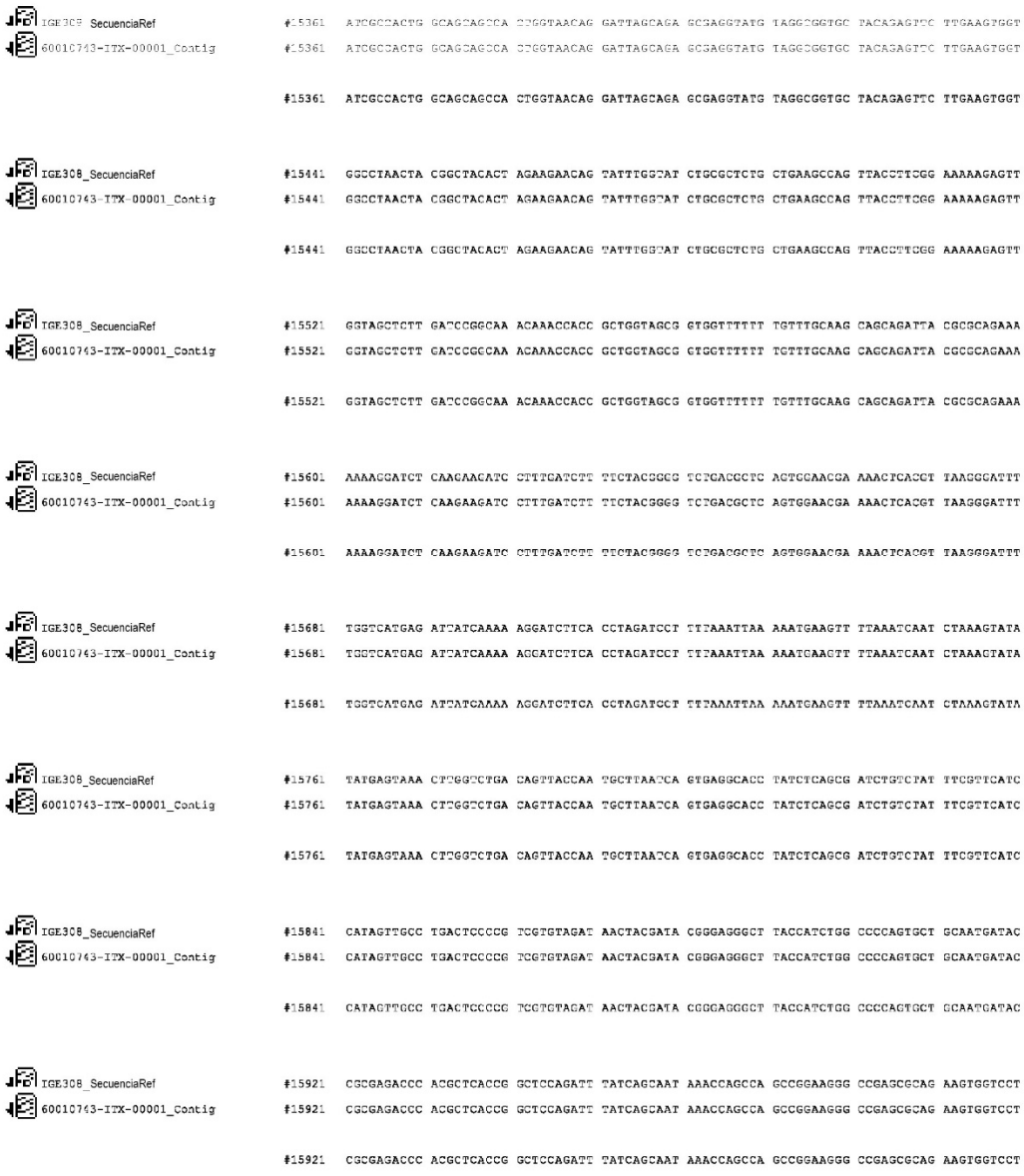
60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF



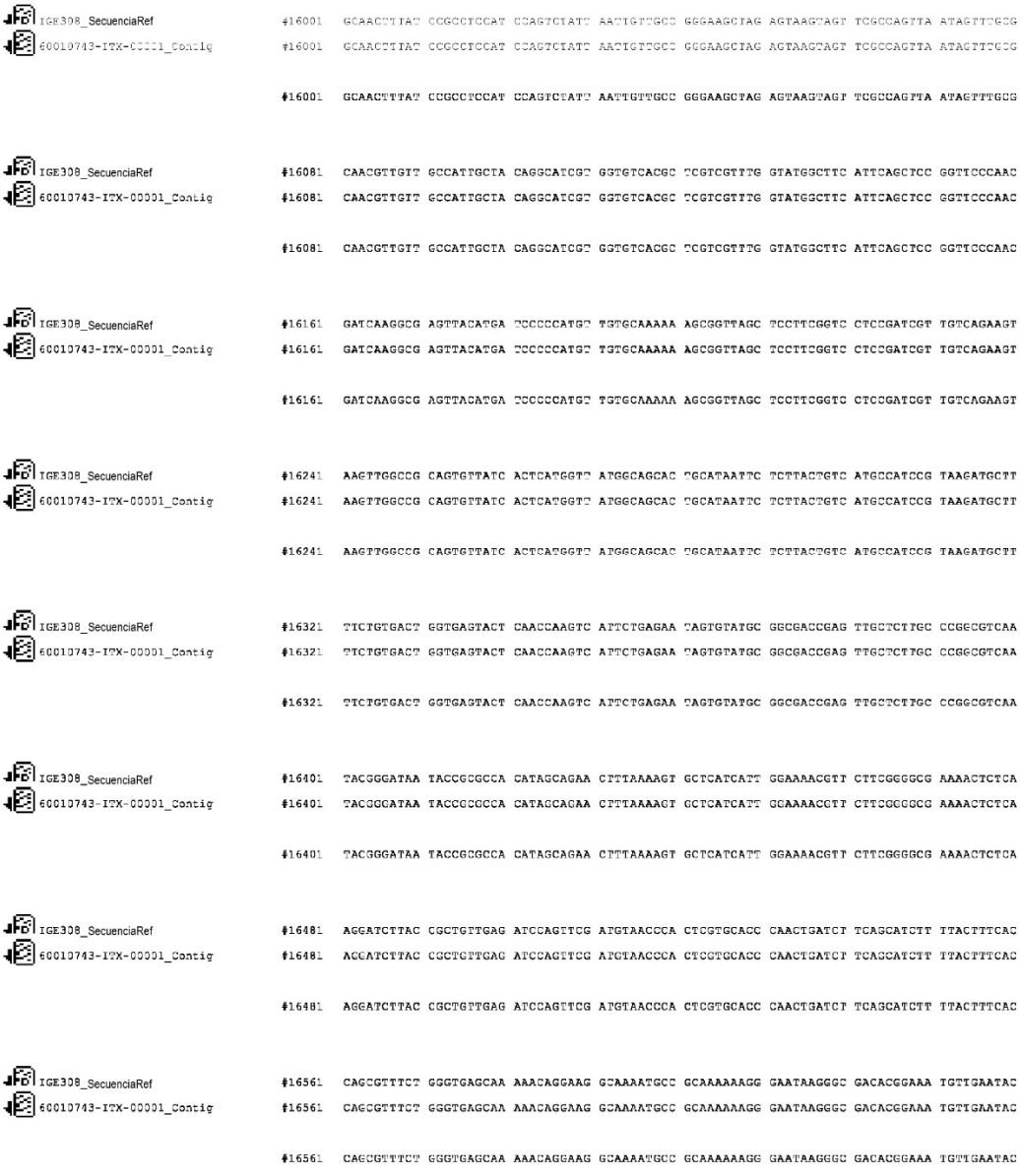
60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF



60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF



60010743-ITX-00001_Análisis_Comparativo
60010743-ITX_Final.SPF



Referencias

A. Aiuti et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. Science, 2013. August; 341:6148.

Baldeschi C, Gache Y, Rattenholl A, Bouillé P, Danos O, Ortonne JP, Bruckner-Tuderman L, Meneguzzi G. 2003. Genetic correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors. Human Molecular Genetics 12: 1897-905.

A. Biffi et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. Science, 2013. August; 341:6148.

Bruckner-Tuderman L, Hopfner B, Hammami-Hauasli N. 1999. Biology of anchoring fibrils: lessons from dystrophic epidermolysis bullosa. Matirx Biology 18: 43-54.

Burgeson R.E. Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. J. Invest. Dermatol. 1993;101:252–255.

Chen M, O'Toole EA, Muellenhoff M, Medina E, Kasahara N, Woodley DT. 2000. Development and characterization of a recombinant truncated type VII collagen "minigene". Implication for gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. J Biol Chem 275: 24429-35.

Chen M, Costa FK, Lindvay CR, Han YP, Woodley DT. 2002a. The recombinant expression of full-length type VII collagen and characterization of molecular mechanisms underlying dystrophic epidermolysis bullosa. J Biol Chem 277: 2118-24.

Chen M, Kasahara N, Keene DR, Chan L, Hoeffler WK, Finlay D, Barcova M, Cannon PM, Mazurek C, Woodley DT. 2002b. Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. Nature Genetics 32: 670-5.

Cogan J, Weinstein J, Wang X, Hou Y, Martin S, South AP, Woodley DT, Chen M. 2014. Aminoglycosides restore full-length type VII collagen by overcoming premature termination codons: therapeutic implications for dystrophic epidermolysis bullosa. Molecular Therapy 22: 1741-52.

Deshpande P, Ralston DR, y S McNeil. The use of allodermis prepared from Euro skin bank to prepare autologous tissue engineered skin for clinical use. Burns. 2013. 39(6): 1170-1177.

Goto, M., et al., Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. J Invest Dermatol, 2006. 126(4): p. 766-72.

Greenberg KP, Edwin SL, Schaffer DV, Flannery JG. 2006. Gene Delivery to the Retina Using Lentiviral Vectors. Advances in Experimental Medicine and Biology 572: 255-66

Kim YH, Woodley DT, Wynn KC, Giomi W, Bauer EA. Recessive Dystrophic Epidermylosis Bullosa Phenotype is Preserved in Xenografts Using SCID Mice: Development of an Experimental In Vivo Model. J Invest Dermatol. 1992 Feb;98(2):191-7.

Keene DR, Sakai LY, Lunstrum GP, Morris NP, Burgeson RE. Type VII Collagen Forms an Extended Network of Anchoring Fibrils. J Cell Biol. 1987 Mar;104(3):611-21.

Leigh I.M. Eady R.A. Heagerty A.H. Purkis P.E. Whitehead P.A. Burgeson R.E. Type VII collagen is a normal component of epidermal basement membrane, which shows altered expression in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. J. Invest. Dermatol. 1988;90:639–642.

Mavilio F. Pellegrini G. Ferrari S. Di Nunzio F. Di Iorio E. Recchia A. Maruggi G. Ferrari G. Provasi E. Bonini C. Capurro S. Conti A. Magnoni C. Giannetti A. De Luca M. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. Nat. Med. 2006;12:1397–1402.

Ortiz-Urda S. Lin Q. Green C.L. Keene D.R. Marinkovich M.P. Khavari P.A. Injection of genetically engineered fibroblasts corrects regenerated human epidermolysis bullosa skin tissue. J. Clin. Invest. 2003;111:251–255.

Remington J. Wang X. Hou Y. Zhou H. Burnett J. Muirhead T. Uitto J. Keene D.R. Woodley D.T. Chen M. Injection of recombinant human type VII collagen corrects the

disease phenotype in a murine model of dystrophic epidermolysis bullosa. Mol. Ther. 2009;17:26–33.

Rousselle P, Keene DR, Ruggiero F, Champliaud MF, Rest M, Burgeson RE. 1997. Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. J Cell Bio, 138: 719-28.

Siprashvili Z, Ngon T. Nguyen, Maria Y. Bezchinsky, M. Peter Marinkovich, Alfred T. Lane, y Paul A. Khavari. Long-term type VII collagen restoration to human epidermylosis bullosa skin tissue. Hum Gene Ther. Oct 2010; 21(10): 1299–1310.

Tareen S, Nicolai C, Campbell D, Flynn P, Slough M, Vin C, Kelly-Clarke B, Odegard J, Robbins S. 2013. A Rev-Independent gag/pol Eliminates Detectable psi-gag Recombination in Lentiviral Vectors. Biores Open Access. 2013 Dec 1; 2(6): 421-430.

Waterman EA, Sakai N, Nguyen NT, Horst BA, Veitch DP, Dey CN, Ortiz-Urda S, Khavari PA, Marinkovich MP. 2007. A laminin-collagen complex drives human epidermal carcinogenesis through phosphoinositol-3-kinase activation. Cancer Research 67: 4264-70.

Woodley D.T. Keene D.R. Atha T. Huang Y. Ram R. Kasahara N. Chen M. Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue in vivo. Mol. Ther. 2004;10:318–326.

Woodley D.T. Krueger G.G. Jorgensen C.M. Fairley J.A. Atha T. Huang Y. Clian L. Keene D.R. Chen M. Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. J. Invest. Dermatol. 2003;121:1021–1028.

Woodley D.T. Keene D.R. Atha T. Huang Y. Lipman K. Li W. Chen M. Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa. Nat. Med. 2004;10:693–695.

Lista de secuencias

<110> INTREXON CORPORATION

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE DEFICIENCIAS DE COLÁGENO TIPO VII

<130> 0100-0016PR1

<140>
<141>

<150> 62/310,623
<151> 2016-03-18

<160> 34

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9169
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1

gatgacgctg cggcttctgg tggccgcgct ctgcgccggg atcctggcag aggcgccccg 60

agtgcgagcc cagcacaggg agagagtgac ctgcacgcgc ctttacgccg ctgacattgt 120

gttcttactg gatggctcct catccattgg ccgcagcaat ttccgcgagg tccgcagctt 180

tctcgaaggg ctggtgctgc ctttctctgg agcagccagt gcacagggtg tgcgctttgc 240

cacagtgcag tacagcgatg acccacggac agagttcggc ctggatgcac ttggctctgg 300

gggtgatgtg atccgcgcca tccgtgagct tagctacaag gggggcaaca ctcgcacagg 360

ggctgcaatt ctccatgtgg ctgaccatgt cttcctgccc cagctggccc gacctggtgt 420

ccccaaggtc tgcatcctga tcacagacgg gaagtcccag gacctggtgg acacagctgc 480

ccaaaggctg aaggggcagg gggtcaagct atttgctgtg gggatcaaga atgctgaccc 540

tgaggagctg aagcgagttg cctcacagcc caccagtgac ttcttcttct tcgtcaatga 600

cttcagcatc ttgaggacac tactgccccc cgtttcccgg agagtgtgca cgactgctgg 660

tggcgtgcct gtgacccgac ctccggatga ctcgacctct gctccacgag acctggtgct 720

gtctgagcca agcagccaat ccttgagagt acagtggaca gcggccagtg gccctgtgac 780

tggctacaag gtccagtaca ctcctctgac ggggctggga cagccactgc cgagtgagcg 840

gcaggaggtg aacgtcccag ctggtgagac cagtgtgcgg ctgcggggtc tccggccact 900

gaccgagtac caagtgactg tgattgccct ctacgccaac agcatcgggg aggctgtgag 960

cgggacagct cggaccactg ccctagaagg gccggaactg accatccaga ataccacagc 1020

ccacagcctc ctggtggcct ggcggagtgt gccaggtgcc actggctacc gtgtgacatg 1080

gcgggtcctc agtggtgggc ccacacagca gcaggagctg ggccctgggc agggttcagt 1140

```
gttgctgcgt gacttggagc ctggcacgga ctatgaggtg accgtgagca ccctatttgg     1200
ccgcagtgtg gggcccgcca cttccctgat ggctcgcact gacgcttctg ttgagcagac     1260
cctgcgcccg gtcatcctgg gccccacatc catcctcctt tcctggaact tggtgcctga     1320
ggcccgtggc taccggttgg aatggcggcg tgagactggc ttggagccac cgcagaaggt     1380
ggtactgccc tctgatgtga cccgctacca gttggatggg ctgcagccgg gcactgagta     1440
ccgcctcaca ctctacactc tgctggaggg ccacgaggtg gccacccctg caaccgtggt     1500
tcccactgga ccagagctgc ctgtgagccc tgtaacagac ctgcaagcca ccgagctgcc     1560
cgggcagcgg gtgcgagtgt cctggagccc agtccctggt gccacccagt accgcatcat     1620
tgtgcgcagc acccaggggg ttgagcggac cctggtgctt cctgggagtc agacagcatt     1680
cgacttggat gacgttcagg ctgggcttag ctacactgtg cgggtgtctg ctcgagtggg     1740
tccccgtgag ggcagtgcca gtgtcctcac tgtccgccgg gagccggaaa ctccacttgc     1800
tgttccaggg ctgcgggttg tggtgtcaga tgcaacgcga gtgagggtgg cctggggacc     1860
cgtccctgga gccagtggat ttcggattag ctggagcaca ggcagtggtc cggagtccag     1920
ccagacactg cccccagact ctactgccac agacatcaca gggctgcagc ctggaaccac     1980
ctaccaggtg gctgtgtcgg tactgcgagg cagagaggag ggccctgctg cagtcatcgt     2040
ggctcgaacg gacccactgg gcccagtgag gacggtccat gtgactcagg ccagcagctc     2100
atctgtcacc attacctgga ccagggttcc tggcgccaca ggatacaggg tttcctggca     2160
ctcagcccac ggcccagaga aatcccagtt ggtttctggg gaggccacgg tggctgagct     2220
ggatggactg gagccagata ctgagtatac ggtgcatgtg agggcccatg tggctggcgt     2280
ggatgggccc cctgcctctg tggttgtgag gactgccccc gagcctgtgg gtcgtgtgtc     2340
gaggctgcag atcctcaatg cttccagcga cgttctacgg atcacctggg taggggtcac     2400
tggagccaca gcttacagac tggcctgggg ccggagtgaa ggcggcccca tgaggcacca     2460
gatactccca ggaaacacag actctgcaga gatccggggt ctcgaaggtg gagtcagcta     2520
ctcagtgcga gtgactgcac ttgtcgggga ccgcgagggc acacctgtct ccattgttgt     2580
cactacgccg cctgaggctc cgccagccct ggggacgctt cacgtggtgc agcgcgggga     2640
gcactcgctg aggctgcgct gggagccggt gcccagagcg cagggcttcc ttctgcactg     2700
gcaacctgag ggtggccagg aacagtcccg ggtcctgggg cccgagctca gcagctatca     2760
cctggacggg ctggagccag cgacacagta ccgcgtgagg ctgagtgtcc tagggccagc     2820
tggagaaggg ccctctgcag aggtgactgc gcgcactgag tcacctcgtg ttccaagcat     2880
tgaactacgt gtggtggaca cctcgatcga ctcggtgact ttggcctgga ctccagtgtc     2940
cagggcatcc agctacatcc tatcctggcg gccactcaga ggccctggcc aggaagtgcc     3000
tgggtccccg cagacacttc cagggatctc aagctcccag cgggtgacag ggctagagcc     3060
```

tggcgtctct tacatcttct ccctgacgcc tgtcctggat ggtgtgcggg gtcctgaggc 3120

atctgtcaca cagacgccag tgtgcccccg tggcctggcg gatgtggtgt tcctaccaca 3180

tgccactcaa gacaatgctc accgtgcgga ggctacgagg agggtcctgg agcgtctggt 3240

gttggcactt gggcctcttg ggccacaggc agttcaggtt ggcctgctgt cttacagtca 3300

tcggccctcc ccactgttcc cactgaatgg ctcccatgac cttggcatta tcttgcaaag 3360

gatccgtgac atgccctaca tggacccaag tgggaacaac ctgggcacag ccgtggtcac 3420

agctcacaga tacatgttgg caccagatgc tcctgggcgc cgccagcacg taccaggggt 3480

gatggttctg ctagtggatg aacccttgag aggtgacata ttcagcccca tccgtgaggc 3540

ccaggcttct gggcttaatg tggtgatgtt gggaatggct ggagcggacc cagagcagct 3600

gcgtcgcttg gcgccgggta tggactctgt ccagaccttc ttcgccgtgg atgatgggcc 3660

aagcctggac caggcagtca gtggtctggc cacagccctg tgtcaggcat ccttcactac 3720

tcagccccgg ccagagccct gcccagtgta ttgtccaaag ggccagaagg gggaacctgg 3780

agagatgggc ctgagaggac aagttgggcc tcctggcgac cctggcctcc cgggcaggac 3840

cggtgctccc ggcccccagg ggcccccctgg aagtgccact gccaagggcg agaggggctt 3900

ccctggagca gatgggcgtc caggcagccc tggccgcgcc gggaatcctg ggacccctgg 3960

agcccctggc ctaaagggct ctccagggtt gcctggccct cgtggggacc cgggagagcg 4020

aggacctcga ggcccaaagg gggagccggg ggctcccgga caagtcatcg gaggtgaagg 4080

acctgggctt cctgggcgga aaggggaccc tggaccatcg ggcccccctg gacctcgtgg 4140

accactgggg gacccaggac cccgtggccc cccagggctt cctggaacag ccatgaaggg 4200

tgacaaaggc gatcgtgggg agcggggtcc ccctggacca ggtgaaggtg gcattgctcc 4260

tggggagcct gggctgccgg gtcttcccgg aagccctgga ccccaaggcc ccgttggccc 4320

ccctggaaag aaaggagaaa aaggtgactc tgaggatgga gctccaggcc tcccaggaca 4380

acctgggtct ccgggtgagc agggcccacg gggacctcct ggagctattg gccccaaagg 4440

tgaccggggc tttccagggc ccctgggtga ggctggagag aagggcgaac gtggaccccc 4500

aggcccagcg ggatcccggg ggctgccagg ggttgctgga cgtcctggag ccaagggtcc 4560

tgaagggcca ccaggaccca ctggccgcca aggagagaag ggggagcctg gtcgccctgg 4620

ggaccctgca gtggtgggac ctgctgttgc tggacccaaa ggagaaaagg gagatgtggg 4680

gcccgctggg cccagaggag ctaccggagt ccaaggggaa cggggcccac ccggcttggt 4740

tcttcctgga gaccctggcc ccaagggaga ccctggagac cggggtccca ttggccttac 4800

tggcagagca ggacccccag gtgactcagg gcctcctgga gagaagggag accctgggcg 4860

gcctggcccc ccaggacctg ttggcccccg aggacgagat ggtgaagttg gagagaaagg 4920

tgacgagggt cctccgggtg acccgggttt gcctggaaaa gcaggcgagc gtggccttcg 4980

gggggcacct ggagttcggg ggcctgtggg tgaaaaggga gaccagggag atcctggaga 5040

ggatggacga aatggcagcc ctggatcatc tggacccaag ggtgaccgtg gggagccggg 5100

tcccccagga cccccgggac ggctggtaga cacaggacct ggagccagag agaagggaga 5160

gcctggggac cgcggacaag agggtcctcg agggcccaag ggtgatcctg gcctccctgg 5220

agcccctggg gaaaggggca ttgaagggtt tcggggaccc ccaggcccac agggggaccc 5280

aggtgtccga ggcccagcag gagaaaaggg tgaccggggt ccccctgggc tggatggccg 5340

gagcggactg gatgggaaac caggagccgc tgggccctct gggccgaatg gtgctgcagg 5400

caaagctggg gacccaggga gagacgggct tccaggcctc cgtggagaac agggcctccc 5460

tggcccctct ggtccccctg gattaccggg aaagccaggc gaggatggca aacctggcct 5520

gaatggaaaa aacggagaac ctggggaccc tggagaagac gggaggaagg gagagaaagg 5580

agattcaggc gcctctggga gagaaggtcg tgatggcccc aagggtgagc gtggagctcc 5640

tggtatcctt ggaccccagg ggcctccagg cctcccaggg ccagtgggcc ctcctggcca 5700

gggttttcct ggtgtcccag gaggcacggg ccccaagggt gaccgtgggg agactggatc 5760

caaaggggag cagggcctcc ctggagagcg tggcctgcga ggagagcctg gaagtgtgcc 5820

gaatgtggat cggttgctgg aaactgctgg catcaaggca tctgccctgc gggagatcgt 5880

ggagacctgg gatgagagct ctggtagctt cctgcctgtg cccgaacggc gtcgaggccc 5940

caagggggac tcaggcgaac agggcccccc aggcaaggag ggccccatcg gctttcctgg 6000

agaacgcggg ctgaagggcg accgtggaga ccctggccct caggggccac ctggtctggc 6060

ccttggggag aggggccccc ccgggccttc cggccttgcc ggggagcctg gaaagcctgg 6120

tattcccggg ctcccaggca gggctggggg tgtgggagag gcaggaaggc caggagagag 6180

gggagaacgg ggagagaaag gagaacgtgg agaacagggc agagatggcc ctcctggact 6240

ccctggaacc cctgggcccc ccggaccccc tggccccaag gtgtctgtgg atgagccagg 6300

tcctggactc tctggagaac agggaccccc tggactcaag ggtgctaagg gggagccggg 6360

cagcaatggt gaccaaggtc ccaaaggaga caggggtgtg ccaggcatca aaggagaccg 6420

gggagagcct ggaccgaggg gtcaggacgg caacccgggt ctaccaggag agcgtggtat 6480

ggctgggcct gaagggaagc cgggtctgca gggtccaaga ggccccccctg gcccagtggg 6540

tggtcatgga gaccctggac cacctggtgc cccgggtctt gctggccctg caggacccca 6600

aggaccttct ggcctgaagg gggagcctgg agagacagga cctccaggac ggggcctgac 6660

tggacctact ggagctgtgg gacttcctgg acccccccggc ccttcaggcc ttgtgggtcc 6720

acaggggtct ccaggtttgc ctggacaagt gggggagaca gggaagccgg gagccccagg 6780

tcgagatggt gccagtggaa aagatggaga cagagggagc cctggtgtgc cagggtcacc 6840

aggtctgcct ggccctgtcg gacctaaagg agaacctggc cccacggggg cccctggaca 6900

ggctgtggtc gggctccctg gagcaaaggg agagaaggga gcccctggag gccttgctgg 6960

agacctggtg ggtgagccgg gagccaaagg tgaccgagga ctgccagggc cgcgaggcga 7020

gaagggtgaa gctggccgtg caggggagcc cggagaccct ggggaagatg gtcagaaagg 7080

ggctccagga cccaaaggtt tcaagggtga cccaggagtc ggggtcccgg gctcccctgg 7140

gcctcctggc cctccaggtg tgaagggaga tctgggcctc cctggcctgc ccggtgctcc 7200

tggtgttgtt gggttcccgg gtcagacagg ccctcgagga gagatgggtc agccaggccc 7260

tagtggagag cggggtctgg caggcccccc agggagagaa ggaatcccag gacccctggg 7320

gccacctgga ccaccggggt cagtgggacc acctggggcc tctggactca aaggagacaa 7380

gggagaccct ggagtagggc tgcctgggcc ccgaggcgag cgtggggagc caggcatccg 7440

gggtgaagat ggccgccccg gccaggaggg accccgagga ctcacggggc cccctggcag 7500

caggggagag cgtggggaga agggtgatgt tgggagtgca ggactaaagg gtgacaaggg 7560

agactcagct gtgatcctgg ggcctccagg cccacggggt gccaaggggg acatgggtga 7620

acgagggcct cggggcttgg atggtgacaa aggacctcgg ggagacaatg gggaccctgg 7680

tgacaagggc agcaagggag agcctggtga caagggctca gccgggttgc caggactgcg 7740

tggactcctg ggaccccagg gtcaacctgg tgcagcaggg atccctggtg acccgggatc 7800

cccaggaaag gatggagtgc ctggtatccg aggagaaaaa ggagatgttg gcttcatggg 7860

tccccggggc ctcaagggtg aacggggagt gaagggagcc tgtggccttg atggagagaa 7920

gggagacaag ggagaagctg gtcccccagg ccgccccggg ctggcaggac acaaaggaga 7980

gatgggggag cctggtgtgc cgggccagtc gggggccccc ggcaaggagg gcctgatcgg 8040

tcccaagggt gaccgaggct ttgacgggca gccaggcccc aagggtgacc agggcgagaa 8100

aggggagcgg ggaaccccag gaattggggg cttcccaggc cccagtggaa atgatggctc 8160

tgctggtccc ccagggccac ctggcagtgt tggtcccaga ggccccgaag gacttcaggg 8220

ccagaagggt gagcgaggtc cccccggaga gagagtggtg ggggctcctg gggtccctgg 8280

agctcctggc gagagagggg agcaggggcg gccagggcct gccggtcctc gaggcgagaa 8340

gggagaagct gcactgacgg aggatgacat ccggggcttt gtgcgccaag agatgagtca 8400

gcactgtgcc tgccagggcc agttcatcgc atctggatca cgacccctcc ctagttatgc 8460

tgcagacact gccggctccc agctccatgc tgtgcctgtg ctccgcgtct ctcatgcaga 8520

ggaggaagag cgggtacccc ctgaggatga tgagtactct gaatactccg agtattctgt 8580

ggaggagtac caggaccctg aagctccttg ggatagtgat gacccctgtt ccctgccact 8640

ggatgagggc tcctgcactg cctacaccct gcgctggtac catcgggctg tgacaggcag 8700

```
cacagaggcc tgtcaccctt ttgtctatgg tggctgtgga gggaatgcca accgttttgg     8760

gacccgtgag gcctgcgagc gccgctgccc accccgggtg gtccagagcc aggggacagg     8820

tactgcccag gactgaggcc cagataatga gctgagattc agcatcccct ggaggagtcg     8880

gggtctcagc agaaccccac tgtccctccc cttggtgcta gaggcttgtg tgcacgtgag     8940

cgtgcgtgtg cacgtccgtt atttcagtga cttggtcccg tgggtctagc cttcccccct     9000

gtggacaaac ccccattgtg gctcctgcca ccctggcaga tgactcactg tgggggggtg     9060

gctgtgggca gtgagcggat gtgactggcg tctgacccgc cccttgaccc aagcctgtga     9120

tgacatggtg ctgattctgg ggggcattaa agctgctgtt ttaaaaggc                 9169
```

<210> 2
<211> 2944
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Thr Leu Arg Leu Leu Val Ala Ala Leu Cys Ala Gly Ile Leu Ala
1               5                  10                  15

Glu Ala Pro Arg Val Arg Ala Gln His Arg Glu Arg Val Thr Cys Thr
            20                  25                  30

Arg Leu Tyr Ala Ala Asp Ile Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser
        35                  40                  45

Ile Gly Arg Ser Asn Phe Arg Glu Val Arg Ser Phe Leu Glu Gly Leu
    50                  55                  60

Val Leu Pro Phe Ser Gly Ala Ala Ser Ala Gln Gly Val Arg Phe Ala
65                  70                  75                  80

Thr Val Gln Tyr Ser Asp Asp Pro Arg Thr Glu Phe Gly Leu Asp Ala
                85                  90                  95

Leu Gly Ser Gly Gly Asp Val Ile Arg Ala Ile Arg Glu Leu Ser Tyr
            100                 105                 110

Lys Gly Gly Asn Thr Arg Thr Gly Ala Ala Ile Leu His Val Ala Asp
        115                 120                 125

His Val Phe Leu Pro Gln Leu Ala Arg Pro Gly Val Pro Lys Val Cys
    130                 135                 140

Ile Leu Ile Thr Asp Gly Lys Ser Gln Asp Leu Val Asp Thr Ala Ala
145                 150                 155                 160
```

```
Gln Arg Leu Lys Gly Gln Gly Val Lys Leu Phe Ala Val Gly Ile Lys
                165                 170                 175

Asn Ala Asp Pro Glu Glu Leu Lys Arg Val Ala Ser Gln Pro Thr Ser
            180                 185                 190

Asp Phe Phe Phe Phe Val Asn Asp Phe Ser Ile Leu Arg Thr Leu Leu
        195                 200                 205

Pro Leu Val Ser Arg Arg Val Cys Thr Thr Ala Gly Gly Val Pro Val
    210                 215                 220

Thr Arg Pro Pro Asp Asp Ser Thr Ser Ala Pro Arg Asp Leu Val Leu
225                 230                 235                 240

Ser Glu Pro Ser Ser Gln Ser Leu Arg Val Gln Trp Thr Ala Ala Ser
                245                 250                 255

Gly Pro Val Thr Gly Tyr Lys Val Gln Tyr Thr Pro Leu Thr Gly Leu
            260                 265                 270

Gly Gln Pro Leu Pro Ser Glu Arg Gln Glu Val Asn Val Pro Ala Gly
        275                 280                 285

Glu Thr Ser Val Arg Leu Arg Gly Leu Arg Pro Leu Thr Glu Tyr Gln
    290                 295                 300

Val Thr Val Ile Ala Leu Tyr Ala Asn Ser Ile Gly Glu Ala Val Ser
305                 310                 315                 320

Gly Thr Ala Arg Thr Thr Ala Leu Glu Gly Pro Glu Leu Thr Ile Gln
                325                 330                 335

Asn Thr Thr Ala His Ser Leu Leu Val Ala Trp Arg Ser Val Pro Gly
            340                 345                 350

Ala Thr Gly Tyr Arg Val Thr Trp Arg Val Leu Ser Gly Gly Pro Thr
        355                 360                 365

Gln Gln Gln Glu Leu Gly Pro Gly Gln Gly Ser Val Leu Leu Arg Asp
    370                 375                 380

Leu Glu Pro Gly Thr Asp Tyr Glu Val Thr Val Ser Thr Leu Phe Gly
385                 390                 395                 400

Arg Ser Val Gly Pro Ala Thr Ser Leu Met Ala Arg Thr Asp Ala Ser
                405                 410                 415
```

```
Val Glu Gln Thr Leu Arg Pro Val Ile Leu Gly Pro Thr Ser Ile Leu
            420                 425                 430

Leu Ser Trp Asn Leu Val Pro Glu Ala Arg Gly Tyr Arg Leu Glu Trp
        435                 440                 445

Arg Arg Glu Thr Gly Leu Glu Pro Pro Gln Lys Val Val Leu Pro Ser
    450                 455                 460

Asp Val Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Gly Leu Gln Pro Gly Thr Glu Tyr
465                 470                 475                 480

Arg Leu Thr Leu Tyr Thr Leu Leu Glu Gly His Glu Val Ala Thr Pro
                485                 490                 495

Ala Thr Val Val Pro Thr Gly Pro Glu Leu Pro Val Ser Pro Val Thr
            500                 505                 510

Asp Leu Gln Ala Thr Glu Leu Pro Gly Gln Arg Val Arg Val Ser Trp
        515                 520                 525

Ser Pro Val Pro Gly Ala Thr Gln Tyr Arg Ile Ile Val Arg Ser Thr
    530                 535                 540

Gln Gly Val Glu Arg Thr Leu Val Leu Pro Gly Ser Gln Thr Ala Phe
545                 550                 555                 560

Asp Leu Asp Asp Val Gln Ala Gly Leu Ser Tyr Thr Val Arg Val Ser
                565                 570                 575

Ala Arg Val Gly Pro Arg Glu Gly Ser Ala Ser Val Leu Thr Val Arg
            580                 585                 590

Arg Glu Pro Glu Thr Pro Leu Ala Val Pro Gly Leu Arg Val Val Val
        595                 600                 605

Ser Asp Ala Thr Arg Val Arg Val Ala Trp Gly Pro Val Pro Gly Ala
    610                 615                 620

Ser Gly Phe Arg Ile Ser Trp Ser Thr Gly Ser Gly Pro Glu Ser Ser
625                 630                 635                 640

Gln Thr Leu Pro Pro Asp Ser Thr Ala Thr Asp Ile Thr Gly Leu Gln
                645                 650                 655

Pro Gly Thr Thr Tyr Gln Val Ala Val Ser Val Leu Arg Gly Arg Glu
            660                 665                 670
```

```
Glu Gly Pro Ala Ala Val Ile Val Ala Arg Thr Asp Pro Leu Gly Pro
        675                 680                 685

Val Arg Thr Val His Val Thr Gln Ala Ser Ser Ser Ser Val Thr Ile
    690                 695                 700

Thr Trp Thr Arg Val Pro Gly Ala Thr Gly Tyr Arg Val Ser Trp His
705                 710                 715                 720

Ser Ala His Gly Pro Glu Lys Ser Gln Leu Val Ser Gly Glu Ala Thr
                725                 730                 735

Val Ala Glu Leu Asp Gly Leu Glu Pro Asp Thr Glu Tyr Thr Val His
            740                 745                 750

Val Arg Ala His Val Ala Gly Val Asp Gly Pro Pro Ala Ser Val Val
        755                 760                 765

Val Arg Thr Ala Pro Glu Pro Val Gly Arg Val Ser Arg Leu Gln Ile
    770                 775                 780

Leu Asn Ala Ser Ser Asp Val Leu Arg Ile Thr Trp Val Gly Val Thr
785                 790                 795                 800

Gly Ala Thr Ala Tyr Arg Leu Ala Trp Gly Arg Ser Glu Gly Gly Pro
                805                 810                 815

Met Arg His Gln Ile Leu Pro Gly Asn Thr Asp Ser Ala Glu Ile Arg
            820                 825                 830

Gly Leu Glu Gly Gly Val Ser Tyr Ser Val Arg Val Thr Ala Leu Val
        835                 840                 845

Gly Asp Arg Glu Gly Thr Pro Val Ser Ile Val Val Thr Thr Pro Pro
    850                 855                 860

Glu Ala Pro Pro Ala Leu Gly Thr Leu His Val Val Gln Arg Gly Glu
865                 870                 875                 880

His Ser Leu Arg Leu Arg Trp Glu Pro Val Pro Arg Ala Gln Gly Phe
                885                 890                 895

Leu Leu His Trp Gln Pro Glu Gly Gly Gln Glu Gln Ser Arg Val Leu
            900                 905                 910

Gly Pro Glu Leu Ser Ser Tyr His Leu Asp Gly Leu Glu Pro Ala Thr
```

915 920 925

Gln Tyr Arg Val Arg Leu Ser Val Leu Gly Pro Ala Gly Glu Gly Pro
930 935 940

Ser Ala Glu Val Thr Ala Arg Thr Glu Ser Pro Arg Val Pro Ser Ile
945 950 955 960

Glu Leu Arg Val Val Asp Thr Ser Ile Asp Ser Val Thr Leu Ala Trp
965 970 975

Thr Pro Val Ser Arg Ala Ser Ser Tyr Ile Leu Ser Trp Arg Pro Leu
980 985 990

Arg Gly Pro Gly Gln Glu Val Pro Gly Ser Pro Gln Thr Leu Pro Gly
995 1000 1005

Ile Ser Ser Ser Gln Arg Val Thr Gly Leu Glu Pro Gly Val Ser
1010 1015 1020

Tyr Ile Phe Ser Leu Thr Pro Val Leu Asp Gly Val Arg Gly Pro
1025 1030 1035

Glu Ala Ser Val Thr Gln Thr Pro Val Cys Pro Arg Gly Leu Ala
1040 1045 1050

Asp Val Val Phe Leu Pro His Ala Thr Gln Asp Asn Ala His Arg
1055 1060 1065

Ala Glu Ala Thr Arg Arg Val Leu Glu Arg Leu Val Leu Ala Leu
1070 1075 1080

Gly Pro Leu Gly Pro Gln Ala Val Gln Val Gly Leu Leu Ser Tyr
1085 1090 1095

Ser His Arg Pro Ser Pro Leu Phe Pro Leu Asn Gly Ser His Asp
1100 1105 1110

Leu Gly Ile Ile Leu Gln Arg Ile Arg Asp Met Pro Tyr Met Asp
1115 1120 1125

Pro Ser Gly Asn Asn Leu Gly Thr Ala Val Val Thr Ala His Arg
1130 1135 1140

Tyr Met Leu Ala Pro Asp Ala Pro Gly Arg Arg Gln His Val Pro
1145 1150 1155

```
Gly Val  Met Val Leu Leu Val  Asp Glu Pro Leu Arg  Gly Asp Ile
    1160                 1165                 1170

Phe Ser  Pro Ile Arg Glu Ala  Gln Ala Ser Gly Leu  Asn Val Val
    1175                 1180                 1185

Met Leu  Gly Met Ala Gly Ala  Asp Pro Glu Gln Leu  Arg Arg Leu
    1190                 1195                 1200

Ala Pro  Gly Met Asp Ser Val  Gln Thr Phe Phe Ala  Val Asp Asp
    1205                 1210                 1215

Gly Pro  Ser Leu Asp Gln Ala  Val Ser Gly Leu Ala  Thr Ala Leu
    1220                 1225                 1230

Cys Gln  Ala Ser Phe Thr Thr  Gln Pro Arg Pro Glu  Pro Cys Pro
    1235                 1240                 1245

Val Tyr  Cys Pro Lys Gly Gln  Lys Gly Glu Pro Gly  Glu Met Gly
    1250                 1255                 1260

Leu Arg  Gly Gln Val Gly Pro  Pro Gly Asp Pro Gly  Leu Pro Gly
    1265                 1270                 1275

Arg Thr  Gly Ala Pro Gly Pro  Gln Gly Pro Pro Gly  Ser Ala Thr
    1280                 1285                 1290

Ala Lys  Gly Glu Arg Gly Phe  Pro Gly Ala Asp Gly  Arg Pro Gly
    1295                 1300                 1305

Ser Pro  Gly Arg Ala Gly Asn  Pro Gly Thr Pro Gly  Ala Pro Gly
    1310                 1315                 1320

Leu Lys  Gly Ser Pro Gly Leu  Pro Gly Pro Arg Gly  Asp Pro Gly
    1325                 1330                 1335

Glu Arg  Gly Pro Arg Gly Pro  Lys Gly Glu Pro Gly  Ala Pro Gly
    1340                 1345                 1350

Gln Val  Ile Gly Gly Glu Gly  Pro Gly Leu Pro Gly  Arg Lys Gly
    1355                 1360                 1365

Asp Pro  Gly Pro Ser Gly Pro  Pro Gly Pro Arg Gly  Pro Leu Gly
    1370                 1375                 1380

Asp Pro  Gly Pro Arg Gly Pro  Pro Gly Leu Pro Gly  Thr Ala Met
    1385                 1390                 1395
```

```
Lys Gly  Asp Lys Gly Asp Arg  Gly Glu Arg Gly Pro  Pro Gly Pro
    1400                 1405                 1410

Gly Glu  Gly Gly Ile Ala Pro  Gly Glu Pro Gly Leu  Pro Gly Leu
    1415                 1420                 1425

Pro Gly  Ser Pro Gly Pro Gln  Gly Pro Val Gly Pro  Pro Gly Lys
    1430                 1435                 1440

Lys Gly  Glu Lys Gly Asp Ser  Glu Asp Gly Ala Pro  Gly Leu Pro
    1445                 1450                 1455

Gly Gln  Pro Gly Ser Pro Gly  Glu Gln Gly Pro Arg  Gly Pro Pro
    1460                 1465                 1470

Gly Ala  Ile Gly Pro Lys Gly  Asp Arg Gly Phe Pro  Gly Pro Leu
    1475                 1480                 1485

Gly Glu  Ala Gly Glu Lys Gly  Glu Arg Gly Pro Pro  Gly Pro Ala
    1490                 1495                 1500

Gly Ser  Arg Gly Leu Pro Gly  Val Ala Gly Arg Pro  Gly Ala Lys
    1505                 1510                 1515

Gly Pro  Glu Gly Pro Pro Gly  Pro Thr Gly Arg Gln  Gly Glu Lys
    1520                 1525                 1530

Gly Glu  Pro Gly Arg Pro Gly  Asp Pro Ala Val Val  Gly Pro Ala
    1535                 1540                 1545

Val Ala  Gly Pro Lys Gly Glu  Lys Gly Asp Val Gly  Pro Ala Gly
    1550                 1555                 1560

Pro Arg  Gly Ala Thr Gly Val  Gln Gly Glu Arg Gly  Pro Pro Gly
    1565                 1570                 1575

Leu Val  Leu Pro Gly Asp Pro  Gly Pro Lys Gly Asp  Pro Gly Asp
    1580                 1585                 1590

Arg Gly  Pro Ile Gly Leu Thr  Gly Arg Ala Gly Pro  Pro Gly Asp
    1595                 1600                 1605

Ser Gly  Pro Pro Gly Glu Lys  Gly Asp Pro Gly Arg  Pro Gly Pro
    1610                 1615                 1620

Pro Gly  Pro Val Gly Pro Arg  Gly Arg Asp Gly Glu  Val Gly Glu
    1625                 1630                 1635
```

```
Lys Gly  Asp Glu Gly Pro Pro  Gly Asp Pro Gly Leu  Pro Gly Lys
    1640                 1645                 1650

Ala Gly  Glu Arg Gly Leu Arg  Gly Ala Pro Gly Val  Arg Gly Pro
    1655                 1660                 1665

Val Gly  Glu Lys Gly Asp Gln  Gly Asp Pro Gly Glu  Asp Gly Arg
    1670                 1675                 1680

Asn Gly  Ser Pro Gly Ser Ser  Gly Pro Lys Gly Asp  Arg Gly Glu
    1685                 1690                 1695

Pro Gly  Pro Pro Gly Pro Pro  Gly Arg Leu Val Asp  Thr Gly Pro
    1700                 1705                 1710

Gly Ala  Arg Glu Lys Gly Glu  Pro Gly Asp Arg Gly  Gln Glu Gly
    1715                 1720                 1725

Pro Arg  Gly Pro Lys Gly Asp  Pro Gly Leu Pro Gly  Ala Pro Gly
    1730                 1735                 1740

Glu Arg  Gly Ile Glu Gly Phe  Arg Gly Pro Pro Gly  Pro Gln Gly
    1745                 1750                 1755

Asp Pro  Gly Val Arg Gly Pro  Ala Gly Glu Lys Gly  Asp Arg Gly
    1760                 1765                 1770

Pro Pro  Gly Leu Asp Gly Arg  Ser Gly Leu Asp Gly  Lys Pro Gly
    1775                 1780                 1785

Ala Ala  Gly Pro Ser Gly Pro  Asn Gly Ala Ala Gly  Lys Ala Gly
    1790                 1795                 1800

Asp Pro  Gly Arg Asp Gly Leu  Pro Gly Leu Arg Gly  Glu Gln Gly
    1805                 1810                 1815

Leu Pro  Gly Pro Ser Gly Pro  Pro Gly Leu Pro Gly  Lys Pro Gly
    1820                 1825                 1830

Glu Asp  Gly Lys Pro Gly Leu  Asn Gly Lys Asn Gly  Glu Pro Gly
    1835                 1840                 1845

Asp Pro  Gly Glu Asp Gly Arg  Lys Gly Glu Lys Gly  Asp Ser Gly
    1850                 1855                 1860

Ala Ser  Gly Arg Glu Gly Arg  Asp Gly Pro Lys Gly  Glu Arg Gly
```

```
    1865                1870                1875

Ala Pro  Gly Ile Leu Gly Pro  Gln Gly Pro Pro Gly  Leu Pro Gly
    1880                1885                1890

Pro Val  Gly Pro Pro Gly Gln  Gly Phe Pro Gly Val  Pro Gly Gly
    1895                1900                1905

Thr Gly  Pro Lys Gly Asp Arg  Gly Glu Thr Gly Ser  Lys Gly Glu
    1910                1915                1920

Gln Gly  Leu Pro Gly Glu Arg  Gly Leu Arg Gly Glu  Pro Gly Ser
    1925                1930                1935

Val Pro  Asn Val Asp Arg Leu  Leu Glu Thr Ala Gly  Ile Lys Ala
    1940                1945                1950

Ser Ala  Leu Arg Glu Ile Val  Glu Thr Trp Asp Glu  Ser Ser Gly
    1955                1960                1965

Ser Phe  Leu Pro Val Pro Glu  Arg Arg Arg Gly Pro  Lys Gly Asp
    1970                1975                1980

Ser Gly  Glu Gln Gly Pro Pro  Gly Lys Glu Gly Pro  Ile Gly Phe
    1985                1990                1995

Pro Gly  Glu Arg Gly Leu Lys  Gly Asp Arg Gly Asp  Pro Gly Pro
    2000                2005                2010

Gln Gly  Pro Pro Gly Leu Ala  Leu Gly Glu Arg Gly  Pro Pro Gly
    2015                2020                2025

Pro Ser  Gly Leu Ala Gly Glu  Pro Gly Lys Pro Gly  Ile Pro Gly
    2030                2035                2040

Leu Pro  Gly Arg Ala Gly Gly  Val Gly Glu Ala Gly  Arg Pro Gly
    2045                2050                2055

Glu Arg  Gly Glu Arg Gly Glu  Lys Gly Glu Arg Gly  Glu Gln Gly
    2060                2065                2070

Arg Asp  Gly Pro Pro Gly Leu  Pro Gly Thr Pro Gly  Pro Pro Gly
    2075                2080                2085

Pro Pro  Gly Pro Lys Val Ser  Val Asp Glu Pro Gly  Pro Gly Leu
    2090                2095                2100
```

```
Ser Gly  Glu Gln Gly Pro Pro  Gly Leu Lys Gly Ala  Lys Gly Glu
    2105                 2110                 2115

Pro Gly  Ser Asn Gly Asp Gln  Gly Pro Lys Gly Asp  Arg Gly Val
    2120                 2125                 2130

Pro Gly  Ile Lys Gly Asp Arg  Gly Glu Pro Gly Pro  Arg Gly Gln
    2135                 2140                 2145

Asp Gly  Asn Pro Gly Leu Pro  Gly Glu Arg Gly Met  Ala Gly Pro
    2150                 2155                 2160

Glu Gly  Lys Pro Gly Leu Gln  Gly Pro Arg Gly Pro  Pro Gly Pro
    2165                 2170                 2175

Val Gly  Gly His Gly Asp Pro  Gly Pro Pro Gly Ala  Pro Gly Leu
    2180                 2185                 2190

Ala Gly  Pro Ala Gly Pro Gln  Gly Pro Ser Gly Leu  Lys Gly Glu
    2195                 2200                 2205

Pro Gly  Glu Thr Gly Pro Pro  Gly Arg Gly Leu Thr  Gly Pro Thr
    2210                 2215                 2220

Gly Ala  Val Gly Leu Pro Gly  Pro Pro Gly Pro Ser  Gly Leu Val
    2225                 2230                 2235

Gly Pro  Gln Gly Ser Pro Gly  Leu Pro Gly Gln Val  Gly Glu Thr
    2240                 2245                 2250

Gly Lys  Pro Gly Ala Pro Gly  Arg Asp Gly Ala Ser  Gly Lys Asp
    2255                 2260                 2265

Gly Asp  Arg Gly Ser Pro Gly  Val Pro Gly Ser Pro  Gly Leu Pro
    2270                 2275                 2280

Gly Pro  Val Gly Pro Lys Gly  Glu Pro Gly Pro Thr  Gly Ala Pro
    2285                 2290                 2295

Gly Gln  Ala Val Val Gly Leu  Pro Gly Ala Lys Gly  Glu Lys Gly
    2300                 2305                 2310

Ala Pro  Gly Gly Leu Ala Gly  Asp Leu Val Gly Glu  Pro Gly Ala
    2315                 2320                 2325

Lys Gly  Asp Arg Gly Leu Pro  Gly Pro Arg Gly Glu  Lys Gly Glu
    2330                 2335                 2340
```

```
Ala Gly  Arg Ala Gly Glu Pro  Gly Asp Pro Gly Glu  Asp Gly Gln
    2345                 2350                 2355

Lys Gly  Ala Pro Gly Pro Lys  Gly Phe Lys Gly Asp  Pro Gly Val
    2360                 2365                 2370

Gly Val  Pro Gly Ser Pro Gly  Pro Pro Gly Pro Pro  Gly Val Lys
    2375                 2380                 2385

Gly Asp  Leu Gly Leu Pro Gly  Leu Pro Gly Ala Pro  Gly Val Val
    2390                 2395                 2400

Gly Phe  Pro Gly Gln Thr Gly  Pro Arg Gly Glu Met  Gly Gln Pro
    2405                 2410                 2415

Gly Pro  Ser Gly Glu Arg Gly  Leu Ala Gly Pro Pro  Gly Arg Glu
    2420                 2425                 2430

Gly Ile  Pro Gly Pro Leu Gly  Pro Pro Gly Pro Pro  Gly Ser Val
    2435                 2440                 2445

Gly Pro  Pro Gly Ala Ser Gly  Leu Lys Gly Asp Lys  Gly Asp Pro
    2450                 2455                 2460

Gly Val  Gly Leu Pro Gly Pro  Arg Gly Glu Arg Gly  Glu Pro Gly
    2465                 2470                 2475

Ile Arg  Gly Glu Asp Gly Arg  Pro Gly Gln Glu Gly  Pro Arg Gly
    2480                 2485                 2490

Leu Thr  Gly Pro Pro Gly Ser  Arg Gly Glu Arg Gly  Glu Lys Gly
    2495                 2500                 2505

Asp Val  Gly Ser Ala Gly Leu  Lys Gly Asp Lys Gly  Asp Ser Ala
    2510                 2515                 2520

Val Ile  Leu Gly Pro Pro Gly  Pro Arg Gly Ala Lys  Gly Asp Met
    2525                 2530                 2535

Gly Glu  Arg Gly Pro Arg Gly  Leu Asp Gly Asp Lys  Gly Pro Arg
    2540                 2545                 2550

Gly Asp  Asn Gly Asp Pro Gly  Asp Lys Gly Ser Lys  Gly Glu Pro
    2555                 2560                 2565

Gly Asp  Lys Gly Ser Ala Gly  Leu Pro Gly Leu Arg  Gly Leu Leu
    2570                 2575                 2580
```

```
Gly Pro  Gln Gly Gln Pro Gly  Ala Ala Gly Ile Pro  Gly Asp Pro
    2585                 2590                 2595

Gly Ser  Pro Gly Lys Asp Gly  Val Pro Gly Ile Arg  Gly Glu Lys
    2600                 2605                 2610

Gly Asp  Val Gly Phe Met Gly  Pro Arg Gly Leu Lys  Gly Glu Arg
    2615                 2620                 2625

Gly Val  Lys Gly Ala Cys Gly  Leu Asp Gly Glu Lys  Gly Asp Lys
    2630                 2635                 2640

Gly Glu  Ala Gly Pro Pro Gly  Arg Pro Gly Leu Ala  Gly His Lys
    2645                 2650                 2655

Gly Glu  Met Gly Glu Pro Gly  Val Pro Gly Gln Ser  Gly Ala Pro
    2660                 2665                 2670

Gly Lys  Glu Gly Leu Ile Gly  Pro Lys Gly Asp Arg  Gly Phe Asp
    2675                 2680                 2685

Gly Gln  Pro Gly Pro Lys Gly  Asp Gln Gly Glu Lys  Gly Glu Arg
    2690                 2695                 2700

Gly Thr  Pro Gly Ile Gly Gly  Phe Pro Gly Pro Ser  Gly Asn Asp
    2705                 2710                 2715

Gly Ser  Ala Gly Pro Pro Gly  Pro Pro Gly Ser Val  Gly Pro Arg
    2720                 2725                 2730

Gly Pro  Glu Gly Leu Gln Gly  Gln Lys Gly Glu Arg  Gly Pro Pro
    2735                 2740                 2745

Gly Glu  Arg Val Val Gly Ala  Pro Gly Val Pro Gly  Ala Pro Gly
    2750                 2755                 2760

Glu Arg  Gly Glu Gln Gly Arg  Pro Gly Pro Ala Gly  Pro Arg Gly
    2765                 2770                 2775

Glu Lys  Gly Glu Ala Ala Leu  Thr Glu Asp Asp Ile  Arg Gly Phe
    2780                 2785                 2790

Val Arg  Gln Glu Met Ser Gln  His Cys Ala Cys Gln  Gly Gln Phe
    2795                 2800                 2805

Ile Ala  Ser Gly Ser Arg Pro  Leu Pro Ser Tyr Ala  Ala Asp Thr
```

```
     2810                 2815                 2820

Ala Gly  Ser Gln Leu His Ala  Val Pro Val Leu Arg  Val Ser His
     2825                 2830                 2835

Ala Glu  Glu Glu Glu Arg Val  Pro Pro Glu Asp Asp  Glu Tyr Ser
     2840                 2845                 2850

Glu Tyr  Ser Glu Tyr Ser Val  Glu Glu Tyr Gln Asp  Pro Glu Ala
     2855                 2860                 2865

Pro Trp  Asp Ser Asp Asp Pro  Cys Ser Leu Pro Leu  Asp Glu Gly
     2870                 2875                 2880

Ser Cys  Thr Ala Tyr Thr Leu  Arg Trp Tyr His Arg  Ala Val Thr
     2885                 2890                 2895

Gly Ser  Thr Glu Ala Cys His  Pro Phe Val Tyr Gly  Gly Cys Gly
     2900                 2905                 2910

Gly Asn  Ala Asn Arg Phe Gly  Thr Arg Glu Ala Cys  Glu Arg Arg
     2915                 2920                 2925

Cys Pro  Pro Arg Val Val Gln  Ser Gln Gly Thr Gly  Thr Ala Gln
     2930                 2935                 2940

Asp
```

<210> 3
<211> 53
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 3
cgacttgtgt tgggactggc tagcgccacc atgacgctgc ggcttctggt ggc 53

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 4
gggcttagct acactgtgcg gg 22

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 5
cctgcccagt gtattgtcca aagg 24

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 6
ctgctggcat caaggcatct g 21

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 7
cccgcacagt gtagctaagc cc 22

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 8
cctttggaca atacactggg cagg 24

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 9
cagatgcctt gatgccagca g 21

<210> 10
<211> 53
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 10
cgtgatttca tttgctacac gtaatcgatt cagtcctggg cagtacctgt ccc 53

<210> 11
<211> 341
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 11
cgctcccaga acatcaccta ccactgcaag aacagcgtgg cctacatgga ccagcagact 60

ggcaacctca agaaggccct gctcctccag ggctccaacg agatcgagat ccgcgccgag 120

ggcaacagcc gcttcaccta cagcgtcact gtcgatggct gcacgagtca caccggagcc 180

tggggcaaga cagtgattga atacaaaacc accaagacct cccgcctgcg catcatcgat 240

gtggcccccc tggacgttgg tgccccagac caggaattcg gcttcgacgt tggccatgtc 300

tgcttcctgt aaatcgatta cgtgtagcaa atgaaatcac g 341

<210> 12
<211> 730
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 12
ttcaaatttt cgggggatcg cattagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt 60

catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggttga 120

ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca 180

atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttggta 240

gtacatcaag tgtatcatac gccaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg 300

cccgcctggt attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc 360

tgcgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt 420

ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt 480

ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg 540

acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc tggtttagtg 600

aaccgtcaga tccgctagca ttgtgtgctt ttcgggccac catgacgctg cggcttctgg 660

tggccgcgct ctgcgccggg atcctggcag aggcgccccg agtgcgagcc cagcacaggg 720

agagagtgac 730

<210> 13
<211> 740
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 13
agtgcgagcc cagcacaggg agagagtgac ctgcacgcgc ctttacgccg ctgacattgt 60

gttcttactg gatggctcct catccattgg ccgcagcaat ttccgcgagg tccgcagctt 120

tctcgaaggg ctggtgctgc ctttctctgg agcagccagt gcacagggtg tgcgctttgc 180

cacagtgcag tacagcgatg acccacggac agagttcggc ctggatgcac ttggctctgg 240

gggtgatgtg atccgcgcca tccgtgagct tagctacaag gggggcaaca ctcgcacagg 300

ggctgcaatt ctccatgtgg ctgaccatgt cttcctgccc cagctggccc gacctggtgt 360

ccccaaggtc tgcatcctga tcacgtctct catgcagagg aggaagagcg ggtaccccct 420

gaggatgatg agtactctga atactccgag tattctgtgg aggagtacca ggaccctgaa 480

gctccttggg atagtgatga cccctgttcc ctgccactgg atgagggctc ctgcactgcc 540

tacaccctgc gctggtacca tcgggctgtg acaggcagca cagaggcctg tcacccttt 600

gtctatggtg gctgtggagg gaatgccaac cgttttggga cccgtgaggc ctgcgagcgc 660

cgctgcccac cccgggtggt ccagagccag gggacaggta ctgcccagga ctgagtacct 720

ttaagaccaa tgacttacaa 740

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 14
atggaaaaac gccagcaacg 20

<210> 15
<211> 20

<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 15
ctgtcaccct tttgtctatg 20

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 16
gttgccggac acttcttgtc ctct 24

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 17
cccgcacagt gtagctaagc cc 22

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 18
agaggccccg aaggacttca 20

<210> 19
<211> 467
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 19

acagcagaga tccagtttgg ttaattaagc attagttatt aatagtaatc aattacgggg 60

tcattaagac tcggccttag aaccccagta tcagcagaac cgcgtctctc atgcagagga 120

ggaagagcgg gtacccccctg aggatgatga gtactctgaa tactccgagt attctgtgga 180

ggagtaccag gaccctgaag ctccttgggga tagtgatgac ccctgttccc tgccactgga 240

tgagggctcc tgcactgcct acaccctgcg ctggtaccat cgggctgtga caggcagcac 300

agaggcctgt cacccttttg tctatggtgg ctgtggaggg aatgccaacc gttttgggac 360

ccgtgaggcc tgcgagcgcc gctgcccacc ccgggtggtc cagagccagg ggacaggtac 420

tgcccaggac tgatcgatac cgtcgacctc gagacctaga aaaacat 467

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 20
gtagacataa tagcaacaga c 21

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 21
tattgctact tgtgattgct c 21

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 22
agaggccccg aaggacttca 20

<210> 23
<211> 8832
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 23

atgacgctgc ggcttctggt ggccgcgctc tgcgccggga tcctggcaga ggcgccccga 60

gtgcgagccc agcacaggga gagagtgacc tgcacgcgcc tttacgccgc tgacattgtg 120

ttcttactgg atggctcctc atccattggc cgcagcaatt tccgcgaggt ccgcagcttt 180

ctcgaagggc tggtgctgcc tttctctgga gcagccagtg cacagggtgt gcgctttgcc 240

acagtgcagt acagcgatga cccacggaca gagttcggcc tggatgcact tggctctggg 300

ggtgatgtga tccgcgccat ccgtgagctt agctacaagg ggggcaacac tcgcacaggg 360

gctgcaattc tccatgtggc tgaccatgtc ttcctgcccc agctggcccg acctggtgtc 420

cccaaggtct gcatcctgat cacagacggg aagtcccagg acctggtgga cacagctgcc 480

caaaggctga aggggcaggg ggtcaagcta tttgctgtgg ggatcaagaa tgctgaccct 540

gaggagctga agcgagttgc ctcacagccc accagtgact tcttcttctt cgtcaatgac 600

ttcagcatct tgaggacact actgcccctc gtttcccgga gagtgtgcac gactgctggt 660

ggcgtgcctg tgacccgacc tccggatgac tcgacctctg ctccacgaga cctggtgctg 720

tctgagccaa gcagccaatc cttgagagta cagtggacag cggccagtgg ccctgtgact 780

ggctacaagg tccagtacac tcctctgacg gggctgggac agccactgcc gagtgagcgg 840

caggaggtga acgtcccagc tggtgagacc agtgtgcggc tgcggggtct ccggccactg 900

accgagtacc aagtgactgt gattgccctc tacgccaaca gcatcgggga ggctgtgagc 960

gggacagctc ggaccactgc cctagaaggg ccggaactga ccatccagaa taccacagcc 1020

cacagcctcc tggtggcctg gcggagtgtg ccaggtgcca ctggctaccg tgtgacatgg 1080

cgggtcctca gtggtgggcc cacacagcag caggagctgg gccctgggca gggttcagtg 1140

ttgctgcgtg acttggagcc tggcacggac tatgaggtga ccgtgagcac cctatttggc 1200

cgcagtgtgg ggcccgccac ttccctgatg gctcgcactg acgcttctgt tgagcagacc 1260

ctgcgcccgg tcatcctggg ccccacatcc atcctccttt cctggaactt ggtgcctgag 1320

gcccgtggct accggttgga atggcggcgt gagactggct tggagccacc gcagaaggtg 1380

gtactgccct ctgatgtgac ccgctaccag ttggatgggc tgcagccggg cactgagtac 1440

cgcctcacac tctacactct gctggagggc cacgaggtgg ccacccctgc aaccgtggtt 1500

cccactggac cagagctgcc tgtgagccct gtaacagacc tgcaagccac cgagctgccc 1560

gggcagcggg tgcgagtgtc ctggagccca gtccctggtg ccacccagta ccgcatcatt 1620

gtgcgcagca cccagggggt tgagcggacc ctggtgcttc ctgggagtca gacagcattc 1680

gacttggatg acgttcaggc tgggcttagc tacactgtgc gggtgtctgc tcgagtgggt 1740

ccccgtgagg gcagtgccag tgtcctcact gtccgccggg agccggaaac tccacttgct 1800

gttccagggc tgcgggttgt ggtgtcagat gcaacgcgag tgagggtggc ctggggaccc 1860

gtccctggag ccagtggatt tcggattagc tggagcacag gcagtggtcc ggagtccagc 1920

cagacactgc ccccagactc tactgccaca gacatcacag ggctgcagcc tggaaccacc 1980

taccaggtgg ctgtgtcggt actgcgaggc agagaggagg gccctgctgc agtcatcgtg 2040

gctcgaacgg acccactggg cccagtgagg acggtccatg tgactcaggc cagcagctca 2100

tctgtcacca ttacctggac cagggttcct ggcgccacag gatacagggt ttcctggcac 2160

tcagcccacg gcccagagaa atcccagttg gtttctgggg aggccacggt ggctgagctg 2220

gatggactgg agccagatac tgagtatacg gtgcatgtga gggcccatgt ggctggcgtg 2280

gatgggcccc ctgcctctgt ggttgtgagg actgcccctg agcctgtggg tcgtgtgtcg 2340

aggctgcaga tcctcaatgc ttccagcgac gttctacgga tcacctgggt aggggtcact 2400

ggagccacag cttacagact ggcctggggc cggagtgaag gcggccccat gaggcaccag 2460

atactcccag gaaacacaga ctctgcagag atccggggtc tcgaaggtgg agtcagctac 2520

tcagtgcgag tgactgcact tgtcggggac cgcgagggca cacctgtctc cattgttgtc 2580

actacgccgc ctgaggctcc gccagccctg gggacgcttc acgtggtgca gcgcggggag 2640

cactcgctga ggctgcgctg ggagccggtg cccagagcgc agggcttcct tctgcactgg 2700

caacctgagg gtggccagga acagtcccgg gtcctggggc ccgagctcag cagctatcac 2760

ctggacgggc tggagccagc gacacagtac cgcgtgaggc tgagtgtcct agggccggct 2820

ggagaagggc cctctgcaga ggtgactgcg cgcactgagt cacctcgtgt tccaagcatt 2880

gaactacgtg tggtggacac ctcgatcgac tcggtgactt tggcctggac tccagtgtcc 2940

agggcatcca gctacatcct atcctggcgg ccactcagag gccctggcca ggaagtgcct 3000

gggtccccgc agacacttcc agggatctca agctcccagc gggtgacagg gctagagcct 3060

ggcgtctctt acatcttctc cctgacgcct gtcctggatg gtgtgcgggg tcctgaggca 3120

tctgtcacac agacgccagt gtgcccccgt ggcctggcgg atgtggtgtt cctaccacat 3180

gccactcaag acaatgctca ccgtgcggag gctacgagga gggtcctgga gcgtctggtg 3240

ttggcacttg ggcctcttgg gccacaggca gttcaggttg gcctgctgtc ttacagtcat 3300

cggccctccc cactgttccc actgaatggc tcccatgacc ttggcattat cttgcaaagg 3360

atccgtgaca tgccctacat ggacccaagt gggaacaacc tgggcacagc cgtggtcaca 3420

gctcacagat acatgttggc accagatgct cctgggcgcc gccagcacgt accaggggtg 3480

atggttctgc tagtggatga acccttgaga ggtgacatat tcagccccat ccgtgaggcc 3540

caggcttctg ggcttaatgt ggtgatgttg ggaatggctg gagcggaccc agagcagctg 3600

cgtcgcttgg cgccgggtat ggactctgtc cagaccttct tcgccgtgga tgatgggcca 3660

agcctggacc aggcagtcag tggtctggcc acagccctgt gtcaggcatc cttcactact 3720

cagccccggc cagagccctg cccagtgtat tgtccaaagg gccagaaggg ggaacctgga 3780

gagatgggcc tgagaggaca agttgggcct cctggcgacc ctggcctccc gggcaggacc 3840

ggtgctcccg gcccccaggg gcccccctgga agtgccactg ccaagggcga gaggggcttc 3900

cctggagcag atgggcgtcc aggcagccct ggccgcgccg ggaatcctgg gacccctgga 3960

gcccctggcc taaagggctc tccagggttg cctggccctc gtggggaccc gggagagcga 4020

ggacctcgag gcccaaaggg ggagccgggg gctcccggac aagtcatcgg aggtgaagga 4080

cctgggcttc ctgggcggaa aggggaccct ggaccatcgg gcccccctgg acctcgtgga 4140

ccactggggg acccaggacc ccgtggcccc ccagggcttc ctggaacagc catgaagggt 4200

gacaaaggcg atcgtgggga gcggggtccc cctggaccag gtgaaggtgg cattgctcct 4260

ggggagcctg ggctgccggg tcttcccgga agccctggac cccaaggccc cgttggcccc 4320

cctggaaaga aaggagaaaa aggtgactct gaggatggag ctccaggcct cccaggacaa 4380

cctgggtctc cgggtgagca gggcccacgg ggacctcctg gagctattgg ccccaaaggt 4440

gaccggggct ttccagggcc cctgggtgag gctggagaga agggcgaacg tggacccccа 4500

ggcccagcgg gatcccgggg gctgccaggg gttgctggac gtcctggagc caagggtcct 4560

gaagggccac caggacccac tggccgccaa ggagagaagg gggagcctgg tcgccctggg 4620

gaccctgcag tggtgggacc tgctgttgct ggacccaaag gagaaaaggg agatgtgggg 4680

cccgctgggc ccagaggagc taccggagtc caaggggaac ggggcccacc cggcttggtt 4740

cttcctggag accctggccc caagggagac cctggagacc ggggtcccat tggccttact 4800

ggcagagcag gacccccagg tgactcaggg cctcctggag agaagggaga ccctgggcgg 4860

cctggccccc caggacctgt tggcccccga ggacgagatg gtgaagttgg agagaaaggt 4920

gacgagggtc ctccgggtga cccgggtttg cctggaaaag caggcgagcg tggccttcgg 4980

ggggcacctg gagttcgggg gcctgtgggt gaaaagggag accagggaga tcctggagag 5040

gatggacgaa atggcagccc tggatcatct ggacccaagg gtgaccgtgg ggagccgggt 5100

cccccaggac ccccgggacg gctggtagac acaggacctg gagccagaga gaagggagag 5160

cctggggacc gcggacaaga gggtcctcga gggcccaagg gtgatcctgg cctccctgga 5220

gcccctgggg aaaggggcat tgaagggttt cggggacccc caggcccaca gggggaccca 5280

ggtgtccgag gcccagcagg agaaaagggt gaccggggtc cccctgggct ggatggccgg 5340

agcggactgg atgggaaacc aggagccgct gggccctctg ggccgaatgg tgctgcaggc 5400

aaagctgggg acccagggag agacgggctt ccaggcctcc gtggagaaca aggcctccct 5460

ggcccctctg gtccccctgg attaccggga aagccaggcg aggatgggaa acctggcctg 5520

aatggaaaaa acggagaacc tggggaccct ggagaagacg ggaggaaggg agagaaagga 5580

gattcaggcg cctctgggag agaaggtcgt gatggcccca agggtgagcg tggagctcct 5640

ggtatccttg gaccccaggg gcctccaggc ctcccagggc cagtgggccc tcctggccag 5700

ggttttcctg gtgtcccagg aggcacgggc cccaagggtg accgtgggga gactggatcc 5760

aaaggggagc agggcctccc tggagagcgt ggcctgcgag gagagcctgg aagtgtgccg 5820

aatgtggatc ggttgctgga aactgctggc atcaaggcat ctgccctgcg ggagatcgtg 5880

gagacctggg atgagagctc tggtagcttc ctgcctgtgc ccgaacggcg tcgaggcccc 5940

aaggggact caggcgaaca gggcccccca ggcaaggagg gccccatcgg ctttcctgga 6000

gaacgcgggc tgaagggcga ccgtggagac cctggccctc aggggccacc tggtctggcc 6060

cttggggaga ggggccccc cgggccttcc ggccttgccg gggagcctgg aaagcctggt 6120

attcccgggc tcccaggcag ggctgggggt gtgggagagg caggaaggcc aggagagagg 6180

ggagaacggg gagagaaagg agaacgtgga gaacagggca gagatggccc tcctggactc 6240

cctggaaccc ctgggccccc cggaccccct ggccccaagg tgtctgtgga tgagccaggt 6300

cctggactct ctggagaaca gggaccccct ggactcaagg gtgctaaggg ggagccgggc 6360

agcaatggtg accaaggtcc caaaggagac aggggtgtgc caggcatcaa aggagaccgg 6420

ggagagcctg gaccgagggg tcaggacggc aacccgggtc taccaggaga gcgtggtatg 6480

gctgggcctg aagggaagcc gggtctgcag ggtccaagag gccccccctgg cccagtgggt 6540

ggtcatggag accctggacc acctggtgcc ccgggtcttg ctggccctgc aggaccccaa 6600

ggaccttctg gcctgaaggg ggagcctgga gagacaggac ctccaggacg gggcctgact 6660

ggacctactg gagctgtggg acttcctgga ccccccggcc cttcaggcct tgtgggtcca 6720

caggggtctc caggtttgcc tggacaagtg ggggagacag ggaagccggg agccccaggt 6780

cgagatggtg ccagtggaaa agatggagac agagggagcc ctggtgtgcc agggtcacca 6840

ggtctgcctg gccctgtcgg acctaaagga gaacctggcc ccacgggggc ccctggacag 6900

gctgtggtcg ggctccctgg agcaaagggа gagaagggag cccctggagg ccttgctgga 6960

gacctggtgg gtgagccggg agccaaaggt gaccgaggac tgccagggcc gcgaggcgag 7020

aagggtgaag ctggccgtgc aggggagccc ggagaccctg gggaagatgg tcagaaaggg 7080

gctccaggac ccaaaggttt caagggtgac ccaggagtcg gggtcccggg ctcccctggg 7140

cctcctggcc ctccaggtgt gaagggagat ctgggcctcc ctggcctgcc cggtgctcct 7200

ggtgttgttg ggttcccggg tcagacaggc cctcgaggag agatgggtca gccaggccct 7260

agtggagagc ggggtctggc aggcccccca gggagagaag gaatcccagg acccctgggg 7320

ccacctggac caccggggtc agtgggacca cctggggcct ctggactcaa aggagacaag 7380

ggagaccctg gagtagggct gcctgggccc cgaggcgagc gtggggagcc aggcatccgg 7440

ggtgaagatg gccgccccgg ccaggaggga ccccgaggac tcacggggcc ccctggcagc 7500

```
aggggagagc gtggggagaa gggtgatgtt gggagtgcag gactaaaggg tgacaaggga     7560

gactcagctg tgatcctggg gcctccaggc ccacggggtg ccaaggggga catgggtgaa     7620

cgagggcctc ggggcttgga tggtgacaaa ggacctcggg gagacaatgg ggaccctggt     7680

gacaagggca gcaagggaga gcctggtgac aagggctcag ccgggttgcc aggactgcgt     7740

ggactcctgg gaccccaggg tcaacctggt gcagcaggga tccctggtga cccgggatcc     7800

ccaggaaagg atggagtgcc tggtatccga ggagaaaaag gagatgttgg cttcatgggt     7860

ccccggggcc tcaagggtga acggggagtg aagggagcct gtggccttga tggagagaag     7920

ggagacaagg gagaagctgg tcccccaggc cgccccgggc tggcaggaca caaaggagag     7980

atgggggagc ctggtgtgcc gggccagtcg ggggcccctg gcaaggaggg cctgatcggt     8040

cccaagggtg accgaggctt tgacgggcag ccaggcccca agggtgacca gggcgagaaa     8100

ggggagcggg gaaccccagg aattgggggc ttcccaggcc ccagtggaaa tgatggctct     8160

gctggtcccc cagggccacc tggcagtgtt ggtcccagag gccccgaagg acttcagggc     8220

cagaagggtg agcgaggtcc ccccggagag agagtggtgg gggctcctgg ggtccctgga     8280

gctcctggcg agagagggga gcaggggcgg ccagggcctg ccggtcctcg aggcgagaag     8340

ggagaagctg cactgacgga ggatgacatc cggggctttg tgcgccaaga gatgagtcag     8400

cactgtgcct gccagggcca gttcatcgca tctggatcac gacccctccc tagttatgct     8460

gcagacactg ccggctccca gctccatgct gtgcctgtgc tccgcgtctc tcatgcagag     8520

gaggaagagc gggtaccccc tgaggatgat gagtactctg aatactccga gtattctgtg     8580

gaggagtacc aggaccctga agctccttgg gatagtgatg acccctgttc cctgccactg     8640

gatgagggct cctgcactgc ctacaccctg cgctggtacc atcgggctgt gacaggcagc     8700

acagaggcct gtcacccttt tgtctatggt ggctgtggag ggaatgccaa ccgttttggg     8760

acccgtgagg cctgcgagcg ccgctgccca ccccgggtgg tccagagcca ggggacaggt     8820

actgcccagg ac                                                        8832
```

<210> 24
<211> 8832
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 24

```
atgacgctgc ggcttctggt ggccgcgctc tgcgccggga tcctggcaga ggcgccccga       60

gtgcgagccc agcacaggga gagagtgacc tgcacgcgcc tttacgccgc tgacattgtg      120

ttcttactgg atggctcctc atccattggc cgcagcaatt tccgcgaggt ccgcagcttt      180

ctcgaagggc tggtgctgcc tttctctgga gcagccagtg cacagggtgt gcgctttgcc      240

acagtgcagt acagcgatga cccacggaca gagttcggcc tggatgcact tggctctggg      300
```

ggtgatgtga tccgcgccat ccgtgagctt agctacaagg ggggcaacac tcgcacaggg 360

gctgcaattc tccatgtggc tgaccatgtc ttcctgcccc agctggcccg acctggtgtc 420

cccaaggtct gcatcctgat cacagacggg aagtcccagg acctggtgga cacagctgcc 480

caaaggctga aggggcaggg ggtcaagcta tttgctgtgg ggatcaagaa tgctgaccct 540

gaggagctga agcgagttgc ctcacagccc accagtgact tcttcttctt cgtcaatgac 600

ttcagcatct tgaggacact actgcccctc gtttcccgga gagtgtgcac gactgctggt 660

ggcgtgcctg tgacccgacc tccggatgac tcgacctctg ctccacgaga cctggtgctg 720

tctgagccaa gcagccaatc cttgagagta cagtggacag cggccagtgg ccctgtgact 780

ggctacaagg tccagtacac tcctctgacg gggctgggac agccactgcc gagtgagcgg 840

caggaggtga acgtcccagc tggtgagacc agtgtgcggc tgcggggtct ccggccactg 900

accgagtacc aagtgactgt gattgccctc tacgccaaca gcatcgggga ggctgtgagc 960

gggacagctc ggaccactgc cctagaaggg ccggaactga ccatccagaa taccacagcc 1020

cacagcctcc tggtggcctg gcggagtgtg ccaggtgcca ctggctaccg tgtgacatgg 1080

cgggtcctca gtggtgggcc cacacagcag caggagctgg gccctgggca gggttcagtg 1140

ttgctgcgtg acttggagcc tggcacggac tatgaggtga ccgtgagcac cctatttggc 1200

cgcagtgtgg ggcccgccac ttccctgatg gctcgcactg acgcttctgt tgagcagacc 1260

ctgcgcccgg tcatcctggg ccccacatcc atcctccttt cctggaactt ggtgcctgag 1320

gcccgtggct accggttgga atggcggcgt gagactggct tggagccacc gcagaaggtg 1380

gtactgccct ctgatgtgac ccgctaccag ttggatgggc tgcagccggg cactgagtac 1440

cgcctcacac tctacactct gctggagggc cacgaggtgg ccacccctgc aaccgtggtt 1500

cccactggac cagagctgcc tgtgagccct gtaacagacc tgcaagccac cgagctgccc 1560

gggcagcggg tgcgagtgtc ctggagccca gtccctggtg ccacccagta ccgcatcatt 1620

gtgcgcagca cccagggggt tgagcggacc ctggtgcttc ctgggagtca gacagcattc 1680

gacttggatg acgttcaggc tgggcttagc tacactgtgc gggtgtctgc tcgagtgggt 1740

ccccgtgagg gcagtgccag tgtcctcact gtccgccggg agccggaaac tccacttgct 1800

gttccagggc tgcgggttgt ggtgtcagat gcaacgcgag tgagggtggc ctggggaccc 1860

gtccctggag ccagtggatt tcggattagc tggagcacag gcagtggtcc ggagtccagc 1920

cagacactgc ccccagactc tactgccaca gacatcacag ggctgcagcc tggaaccacc 1980

taccaggtgg ctgtgtcggt actgcgaggc agagaggagg gccctgctgc agtcatcgtg 2040

gctcgaacgg acccactggg cccagtgagg acggtccatg tgactcaggc cagcagctca 2100

tctgtcacca ttacctggac cagggttcct ggcgccacag gatacagggt ttcctggcac 2160

tcagcccacg gcccagagaa atcccagttg gtttctgggg aggccacggt ggctgagctg 2220

gatggactgg agccagatac tgagtatacg gtgcatgtga gggcccatgt ggctggcgtg 2280

gatgggcccc ctgcctctgt ggttgtgagg actgcccctg agcctgtggg tcgtgtgtcg 2340

aggctgcaga tcctcaatgc ttccagcgac gttctacgga tcacctgggt aggggtcact 2400

ggagccacag cttacagact ggcctggggc cggagtgaag gcggccccat gaggcaccag 2460

atactcccag gaaacacaga ctctgcagag atccggggtc tcgaaggtgg agtcagctac 2520

tcagtgcgag tgactgcact tgtcggggac cgcgagggca cacctgtctc cattgttgtc 2580

actacgccgc ctgaggctcc gccagccctg gggacgcttc acgtggtgca gcgcggggag 2640

cactcgctga ggctgcgctg ggagccggtg cccagagcgc agggcttcct tctgcactgg 2700

caacctgagg gtggccagga acagtcccgg gtcctggggc ccgagctcag cagctatcac 2760

ctggacgggc tggagccagc gacacagtac cgcgtgaggc tgagtgtcct agggccagct 2820

ggagaagggc cctctgcaga ggtgactgcg cgcactgagt cacctcgtgt tccaagcatt 2880

gaactacgtg tggtggacac ctcgatcgac tcggtgactt tggcctggac tccagtgtcc 2940

agggcatcca gctacatcct atcctggcgg ccactcagag gccctggcca ggaagtgcct 3000

gggtccccgc agacacttcc agggatctca agctcccagc gggtgacagg gctagagcct 3060

ggcgtctctt acatcttctc cctgacgcct gtcctggatg gtgtgcgggg tcctgaggca 3120

tctgtcacac agacgccagt gtgcccccgt ggcctggcgg atgtggtgtt cctaccacat 3180

gccactcaag acaatgctca ccgtgcggag gctacgagga gggtcctgga gcgtctggtg 3240

ttggcacttg ggcctcttgg gccacaggca gttcaggttg gcctgctgtc ttacagtcat 3300

cggccctccc cactgttccc actgaatggc tcccatgacc ttggcattat cttgcaaagg 3360

atccgtgaca tgccctacat ggacccaagt gggaacaacc tgggcacagc cgtggtcaca 3420

gctcacagat acatgttggc accagatgct cctgggcgcc gccagcacgt accaggggtg 3480

atggttctgc tagtggatga acccttgaga ggtgacatat tcagccccat ccgtgaggcc 3540

caggcttctg ggcttaatgt ggtgatgttg ggaatggctg gagcggaccc agagcagctg 3600

cgtcgcttgg cgccgggtat ggactctgtc cagaccttct tcgccgtgga tgatgggcca 3660

agcctggacc aggcagtcag tggtctggcc acagccctgt gtcaggcatc cttcactact 3720

cagccccggc cagagccctg cccagtgtat tgtccaaagg gccagaaggg ggaacctgga 3780

gagatgggcc tgagaggaca agttgggcct cctggcgacc ctggcctccc gggcaggacc 3840

ggtgctcccg gccccccaggg gccccctgga agtgccactg ccaagggcga gaggggcttc 3900

cctggagcag atgggcgtcc aggcagccct ggccgcgccg ggaatcctgg gacccctgga 3960

gcccctggcc taaagggctc tccagggttg cctggccctc gtggggaccc gggagagcga 4020

ggacctcgag gcccaaaggg ggagccgggg gctcccggac aagtcatcgg aggtgaagga 4080

cctgggcttc ctgggcggaa aggggaccct ggaccatcgg gccccctgg acctcgtgga 4140

ccactggggg acccaggacc ccgtggcccc ccagggcttc ctggaacagc catgaagggt 4200

gacaaaggcg atcgtgggga gcggggtccc cctggaccag gtgaaggtgg cattgctcct 4260

ggggagcctg ggctgccggg tcttcccgga agccctggac cccaaggccc cgttggcccc 4320

cctggaaaga aaggagaaaa aggtgactct gaggatggag ctccaggcct cccaggacaa 4380

cctgggtctc cgggtgagca gggcccacgg ggacctcctg gagctattgg ccccaaaggt 4440

gaccggggct ttccagggcc cctgggtgag gctggagaga agggcgaacg tggacccca 4500

ggcccagcgg gatcccgggg gctgccaggg gttgctggac gtcctggagc caagggtcct 4560

gaagggccac caggacccac tggccgccaa ggagagaagg gggagcctgg tcgccctggg 4620

gaccctgcag tggtgggacc tgctgttgct ggacccaaag gagaaaaggg agatgtgggg 4680

cccgctgggc ccagaggagc taccggagtc caaggggaac ggggcccacc cggcttggtt 4740

cttcctggag accctggccc caagggagac cctggagacc ggggtcccat tggccttact 4800

ggcagagcag gacccccagg tgactcaggg cctcctggag agaagggaga ccctgggcgg 4860

cctggccccc caggacctgt tggcccccga ggacgagatg gtgaagttgg agagaaaggt 4920

gacgagggtc ctccgggtga cccgggtttg cctggaaaag caggcgagcg tggccttcgg 4980

ggggcacctg gagttcgggg gcctgtgggt gaaaagggag accagggaga tcctggagag 5040

gatggacgaa atggcagccc tggatcatct ggacccaagg gtgaccgtgg ggagccgggt 5100

cccccaggac ccccgggacg gctggtagac acaggacctg gagccagaga gaagggagag 5160

cctggggacc gcggacaaga gggtcctcga gggcccaagg gtgatcctgg cctccctgga 5220

gcccctgggg aaaggggcat tgaagggttt cggggacccc caggcccaca gggggaccca 5280

ggtgtccgag gcccagcagg agaaaagggt gaccggggtc cccctgggct ggatggccgg 5340

agcggactgg atgggaaacc aggagccgct gggccctctg ggccgaatgg tgctgcaggc 5400

aaagctgggg acccagggag agacgggctt ccaggcctcc gtggagaaca gggcctccct 5460

ggcccctctg gtccccctgg attaccggga aagccaggcg aggatggcaa acctggcctg 5520

aatggaaaaa acggagaacc tggggaccct ggagaagacg ggaggaaggg agagaaagga 5580

gattcaggcg cctctgggag agaaggtcgt gatggcccca agggtgagcg tggagctcct 5640

ggtatccttg gaccccaggg gcctccaggc ctcccagggc cagtgggccc tcctggccag 5700

ggttttcctg gtgtcccagg aggcacgggc cccaagggtg accgtgggga gactggatcc 5760

aaaggggagc agggcctccc tggagagcgt ggcctgcgag gagagcctgg aagtgtgccg 5820

aatgtggatc ggttgctgga aactgctggc atcaaggcat ctgccctgcg ggagatcgtg 5880

gagacctggg atgagagctc tggtagcttc ctgcctgtgc ccgaacggcg tcgaggcccc 5940

aaggggact caggcgaaca gggcccccca ggcaaggagg gccccatcgg ctttcctgga 6000

gaacgcgggc tgaagggcga ccgtggagac cctggccctc aggggccacc tggtctggcc 6060

cttggggaga ggggcccccc cgggccttcc ggccttgccg gggagcctgg aaagcctggt 6120

attcccgggc tcccaggcag ggctgggggt gtgggagagg caggaaggcc aggagagagg 6180

ggagaacggg gagagaaagg agaacgtgga gaacagggca gagatggccc tcctggactc 6240

cctggaaccc ctgggccccc cggacccccc ggccccaagg tgtctgtgga tgagccaggt 6300

cctggactct ctggagaaca gggacccccc ggactcaagg gtgctaaggg ggagccgggc 6360

agcaatggtg accaaggtcc caaaggagac aggggtgtgc caggcatcaa aggagaccgg 6420

ggagagcctg gaccgagggg tcaggacggc aacccgggtc taccaggaga gcgtggtatg 6480

gctgggcctg aagggaagcc gggtctgcag ggtccaagag gccccccctgg cccagtgggt 6540

ggtcatggag accctggacc acctggtgcc ccgggtcttg ctggccctgc aggaccccaa 6600

ggaccttctg gcctgaaggg ggagcctgga gagacaggac ctccaggacg gggcctgact 6660

ggacctactg gagctgtggg acttcctgga ccccccggcc cttcaggcct tgtgggtcca 6720

caggggtctc caggtttgcc tggacaagtg ggggagacag ggaagccggg agccccaggt 6780

cgagatggtg ccagtggaaa agatggagac agagggagcc ctggtgtgcc agggtcacca 6840

ggtctgcctg gccctgtcgg acctaaagga gaacctggcc ccacgggggc ccctggacag 6900

gctgtggtcg ggctccctgg agcaaaggga gagaagggag cccctggagg ccttgctgga 6960

gacctggtgg gtgagccggg agccaaaggt gaccgaggac tgccagggcc gcgaggcgag 7020

aagggtgaag ctggccgtgc aggggagccc ggagaccctg gggaagatgg tcagaaaggg 7080

gctccaggac ccaaaggttt caagggtgac ccaggagtcg gggtcccggg ctcccctggg 7140

cctcctggcc ctccaggtgt gaagggagat ctgggcctcc ctggcctgcc cggtgctcct 7200

ggtgttgttg ggttcccggg tcagacaggc cctcgaggag agatgggtca gccaggccct 7260

agtggagagc ggggtctggc aggcccccca gggagagaag gaatcccagg acccctgggg 7320

ccacctggac caccggggtc agtgggacca cctggggcct ctggactcaa aggagacaag 7380

ggagaccctg gagtagggct gcctgggccc cgaggcgagc gtggggagcc aggcatccgg 7440

ggtgaagatg gccgccccgg ccaggaggga ccccgaggac tcacggggcc ccctggcagc 7500

aggggagagc gtggggagaa gggtgatgtt gggagtgcag gactaaaggg tgacaaggga 7560

gactcagctg tgatcctggg gcctccaggc ccacggggtg ccaaggggga catgggtgaa 7620

cgagggcctc ggggcttgga tggtgacaaa ggacctcggg gagacaatgg ggaccctggt 7680

gacaagggca gcaagggaga gcctggtgac aagggctcag ccgggttgcc aggactgcgt 7740

ggactcctgg gaccccaggg tcaacctggt gcagcaggga tccctggtga cccgggatcc 7800

ccaggaaagg atggagtgcc tggtatccga ggagaaaaag gagatgttgg cttcatgggt 7860

ccccggggcc tcaagggtga acggggagtg aagggagcct gtggccttga tggagagaag 7920

ggagacaagg gagaagctgg tcccccaggc cgccccgggc tggcaggaca caaaggagag 7980

atgggggagc ctggtgtgcc gggccagtcg ggggcccctg gcaaggaggg cctgatcggt 8040

cccaagggtg accgaggctt tgacgggcag ccaggcccca agggtgacca gggcgagaaa 8100

ggggagcggg gaaccccagg aattgggggc ttcccaggcc ccagtggaaa tgatggctct 8160

gctggtcccc cagggccacc tggcagtgtt ggtcccagag gccccgaagg acttcagggc 8220

cagaagggtg agcgaggtcc ccccggagag agagtggtgg gggctcctgg ggtccctgga 8280

gctcctggcg agagagggga gcaggggcgg ccagggcctg ccggtcctcg aggcgagaag 8340

ggagaagctg cactgacgga ggatgacatc cggggctttg tgcgccaaga gatgagtcag 8400

cactgtgcct gccagggcca gttcatcgca tctggatcac gacccctccc tagttatgct 8460

gcagacactg ccggctccca gctccatgct gtgcctgtgc tccgcgtctc tcatgcagag 8520

gaggaagagc gggtaccccc tgaggatgat gagtactctg aatactccga gtattctgtg 8580

gaggagtacc aggaccctga agctccttgg gatagtgatg acccctgttc cctgccactg 8640

gatgagggct cctgcactgc ctacaccctg cgctggtacc atcgggctgt gacaggcagc 8700

acagaggcct gtcacccttt tgtctatggt ggctgtggag ggaatgccaa ccgttttggg 8760

acccgtgagg cctgcgagcg ccgctgccca ccccgggtgg tccagagcca ggggacaggt 8820

actgcccagg ac 8832

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 25
acctgaaagc gaaagggaaa c 21

<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 26
cacccatctc tctccttcta gcc 23

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética

<400> 27
agctctctcg acgcaggact cggc 24

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 28
cactcccaac gaagacaaga t 21

<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 29
gtctaaccag agagacccag ta 22

<210> 30
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética

<400> 30
tttgtaaacc ggtgcagctg cttt 24

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 31
acctgaaagc gaaagggaaa c 21

<210> 32
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético

<400> 32

cacccatctc tctccttcta gcc 23

<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sonda sintética

<400> 33
agctctctcg acgcaggact cggc 24

<210> 34
<211> 16777
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 34
gtcgacggat cgggagatct cccgatcccc tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg 60

atgccgcata gttaagccag tatctgctcc ctgcttgtgt gttggaggtc gctgagtagt 120

gcgcgagcaa aatttaagct acaacaaggc aaggcttgac cgacaattgc atgaagaatc 180

tgcttagggt taggcgtttt gcgctgcttc gcgatgtacg ggccagatat acgcgttgac 240

attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt catagcccat 300

atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccaacg 360

acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca atagggactt 420

tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttggca gtacatcaag 480

tgtatcatat gccaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc 540

attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag 600

tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacat caatgggcgt ggatagcggt 660

ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc 720

accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg acgcaaatgg 780

gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagcgc gttttgcctg tactgggtct 840

ctctggttag accagatctg agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt 900

aagcctcaat aaagcttgcc ttgagtgctt caagtagtgt gtgcccgtct gttgtgtgac 960

tctggtaact agagatccct cagacccttt tagtcagtgt ggaaaatctc tagcagtggc 1020

gcccgaacag ggacttgaaa gcgaaaggga aaccagagga gctctctcga cgcaggactc 1080

ggcttgctga agcgcgcacg gcaagaggcg aggggcggcg actggtgagt acgccaaaaa 1140

ttttgactag cggaggctag aaggagagag atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg 1200

ggagaattag atcgcgatgg gaaaaaattc ggttaaggcc aggggaaag aaaaaatata 1260

aattaaaaca tatagtatgg gcaagcaggg agctagaacg attcgcagtt aatcctggcc 1320

tgttagaaac atcagaaggc tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga 1380

caggatcaga agaacttaga tcattatata atacagtagc aaccctctat tgtgtgcatc 1440

aaaggataga gataaaagac accaaggaag ctttagacaa gatagaggaa gagcaaaaca 1500

aaagtaagac caccgcacag caagcggccg ctgatcttca gacctggagg aggagatatg 1560

agggacaatt ggagaagtga attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga 1620

gtagcaccca ccaaggcaaa gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata 1680

ggagctttgt tccttgggtt cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg 1740

acgctgacgg tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg 1800

ctgagggcta ttgaggcgca acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag 1860

ctccaggcaa gaatcctggc tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt 1920

tggggttgct ctggaaaact catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt 1980

aataaatctc tggaacagat ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt 2040

aacaattaca caagcttaat acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag 2100

aatgaacaag aattattgga attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata 2160

acaaattggc tgtggtatat aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta 2220

agaatagttt ttgctgtact ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttcaccatta 2280

tcgtttcaga cccacctccc aaccccgagg ggacccgaca ggcccgaagg aatagaagaa 2340

gaaggtggag agagagacag agacagatcc attcgattag tgaacggatc ggcactgcgt 2400

gcgccaattc tgcagacaaa tggcagtatt catccacaat tttaaaagaa aaggggggat 2460

tgggggtac agtgcagggg aaagaatagt agacataata gcaacagaca tacaaactaa 2520

agaattacaa aaacaaatta caaaaattca aaattttcgg gtttattaca gggacagcag 2580

agatccagtt tggttaatta agcattagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag 2640

ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggtt 2700

gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 2760

caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg 2820

tagtacatca agtgtatcat acgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat 2880

ggcccgcctg gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca 2940

tctgcgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc 3000

gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca ccccattgac gtcaatggga 3060

gtttgttttg gcaccaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat 3120

tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctggtttag 3180

tgaaccgtca gatccgctag cattgtgtgc ttttcgggcc accatgacgc tgcggcttct 3240

ggtggccgcg ctctgcgccg ggatcctggc agaggcgccc cgagtgcgag cccagcacag 3300

ggagagagtg acctgcacgc gcctttacgc cgctgacatt gtgttcttac tggatggctc 3360

ctcatccatt ggccgcagca atttccgcga ggtccgcagc tttctcgaag ggctggtgct 3420

gcctttctct ggagcagcca gtgcacaggg tgtgcgcttt gccacagtgc agtacagcga 3480

tgacccacgg acagagttcg gcctggatgc acttggctct gggggtgatg tgatccgcgc 3540

catccgtgag cttagctaca agggggggcaa cactcgcaca ggggctgcaa ttctccatgt 3600

ggctgaccat gtcttcctgc cccagctggc ccgacctggt gtccccaagg tctgcatcct 3660

gatcacagac gggaagtccc aggacctggt ggacacagct gcccaaaggc tgaaggggca 3720

gggggtcaag ctatttgctg tggggatcaa gaatgctgac cctgaggagc tgaagcgagt 3780

tgcctcacag cccaccagtg acttcttctt cttcgtcaat gacttcagca tcttgaggac 3840

actactgccc ctcgtttccc ggagagtgtg cacgactgct ggtggcgtgc ctgtgacccg 3900

acctccggat gactcgacct ctgctccacg agacctggtg ctgtctgagc caagcagcca 3960

atccttgaga gtacagtgga cagcggccag tggccctgtg actggctaca aggtccagta 4020

cactcctctg acggggctgg gacagccact gccgagtgag cggcaggagg tgaacgtccc 4080

agctggtgag accagtgtgc ggctgcgggg tctccggcca ctgaccgagt accaagtgac 4140

tgtgattgcc ctctacgcca acagcatcgg ggaggctgtg agcgggacag ctcggaccac 4200

tgccctagaa gggccggaac tgaccatcca gaataccaca gcccacagcc tcctggtggc 4260

ctggcggagt gtgccaggtg ccactggcta ccgtgtgaca tggcgggtcc tcagtggtgg 4320

gcccacacag cagcaggagc tgggccctgg gcagggttca gtgttgctgc gtgacttgga 4380

gcctggcacg gactatgagg tgaccgtgag caccctattt ggccgcagtg tggggcccgc 4440

cacttccctg atggctcgca ctgacgcttc tgttgagcag accctgcgcc cggtcatcct 4500

gggccccaca tccatcctcc tttcctggaa cttggtgcct gaggcccgtg gctaccggtt 4560

ggaatggcgg cgtgagactg gcttggagcc accgcagaag gtggtactgc cctctgatgt 4620

gacccgctac cagttggatg ggctgcagcc gggcactgag taccgcctca cactctacac 4680

tctgctggag ggccacgagg tggccacccc tgcaaccgtg gttcccactg gaccagagct 4740

gcctgtgagc cctgtaacag acctgcaagc caccgagctg cccgggcagc gggtgcgagt 4800

gtcctggagc ccagtccctg gtgccaccca gtaccgcatc attgtgcgca gcacccaggg 4860

ggttgagcgg accctggtgc ttcctgggag tcagacagca ttcgacttgg atgacgttca 4920

ggctgggctt agctacactg tgcgggtgtc tgctcgagtg ggtccccgtg agggcagtgc 4980

cagtgtcctc actgtccgcc gggagccgga aactccactt gctgttccag ggctgcgggt 5040

tgtggtgtca gatgcaacgc gagtgagggt ggcctgggga cccgtccctg gagccagtgg 5100

atttcggatt agctggagca caggcagtgg tccggagtcc agccagacac tgcccccaga 5160

ctctactgcc acagacatca cagggctgca gcctggaacc acctaccagg tggctgtgtc 5220

ggtactgcga ggcagagagg agggccctgc tgcagtcatc gtggctcgaa cggacccact 5280

gggcccagtg aggacggtcc atgtgactca ggccagcagc tcatctgtca ccattacctg 5340

gaccagggtt cctggcgcca caggatacag ggtttcctgg cactcagccc acggcccaga 5400

gaaatcccag ttggtttctg gggaggccac ggtggctgag ctggatggac tggagccaga 5460

tactgagtat acggtgcatg tgagggccca tgtggctggc gtggatgggc cccctgcctc 5520

tgtggttgtg aggactgccc ctgagcctgt gggtcgtgtg tcgaggctgc agatcctcaa 5580

tgcttccagc gacgttctac ggatcacctg ggtaggggtc actggagcca cagcttacag 5640

actggcctgg ggccggagtg aaggcggccc catgaggcac cagatactcc caggaaacac 5700

agactctgca gagatccggg gtctcgaagg tggagtcagc tactcagtgc gagtgactgc 5760

acttgtcggg gaccgcgagg gcacacctgt ctccattgtt gtcactacgc cgcctgaggc 5820

tccgccagcc ctggggacgc ttcacgtggt gcagcgcggg gagcactcgc tgaggctgcg 5880

ctgggagccg gtgcccagag cgcagggctt ccttctgcac tggcaacctg agggtggcca 5940

ggaacagtcc cgggtcctgg ggcccgagct cagcagctat cacctggacg ggctggagcc 6000

agcgacacag taccgcgtga ggctgagtgt cctagggccg gctggagaag ggccctctgc 6060

agaggtgact gcgcgcactg agtcacctcg tgttccaagc attgaactac gtgtggtgga 6120

cacctcgatc gactcggtga ctttggcctg gactccagtg tccagggcat ccagctacat 6180

cctatcctgg cggccactca gaggccctgg ccaggaagtg cctgggtccc cgcagacact 6240

tccagggatc tcaagctccc agcgggtgac agggctagag cctggcgtct cttacatctt 6300

ctccctgacg cctgtcctgg atggtgtgcg gggtcctgag gcatctgtca cacagacgcc 6360

agtgtgcccc cgtggcctgg cggatgtggt gttcctacca catgccactc aagacaatgc 6420

tcaccgtgcg gaggctacga ggagggtcct ggagcgtctg gtgttggcac ttgggcctct 6480

tgggccacag gcagttcagg ttggcctgct gtcttacagt catcggccct ccccactgtt 6540

cccactgaat ggctcccatg accttggcat tatcttgcaa aggatccgtg acatgcccta 6600

catggaccca agtgggaaca acctgggcac agccgtggtc acagctcaca gatacatgtt 6660

ggcaccagat gctcctgggc gccgccagca cgtaccaggg gtgatggttc tgctagtgga 6720

tgaacccttg agaggtgaca tattcagccc catccgtgag gcccaggctt ctgggcttaa 6780

tgtggtgatg ttgggaatgg ctggagcgga cccagagcag ctgcgtcgct tggcgccggg 6840

tatggactct gtccagacct tcttcgccgt ggatgatggg ccaagcctgg accaggcagt 6900

cagtggtctg gccacagccc tgtgtcaggc atccttcact actcagcccc ggccagagcc 6960

ctgcccagtg tattgtccaa agggccagaa gggggaacct ggagagatgg gcctgagagg 7020

acaagttggg cctcctggcg accctggcct cccgggcagg accggtgctc ccggccccca 7080

ggggcccccc ggaagtgcca ctgccaaggg cgagaggggc ttccctggag cagatgggcg 7140

tccaggcagc cctggccgcg ccgggaatcc tgggacccct ggagcccctg gcctaaaggg 7200

ctctccaggg ttgcctggcc ctcgtgggga cccgggagag cgaggacctc gaggcccaaa 7260

gggggagccg ggggctcccg gacaagtcat cggaggtgaa ggacctgggc ttcctgggcg 7320

gaaaggggac cctggaccat cgggcccccc tggacctcgt ggaccactgg gggacccagg 7380

accccgtggc cccccagggc ttcctggaac agccatgaag ggtgacaaag gcgatcgtgg 7440

ggagcggggt ccccctggac caggtgaagg tggcattgct cctggggagc ctgggctgcc 7500

gggtcttccc ggaagccctg gaccccaagg ccccgttggc ccccctggaa agaaaggaga 7560

aaaaggtgac tctgaggatg gagctccagg cctcccagga caacctgggt ctccgggtga 7620

gcagggccca cggggacctc ctggagctat tggccccaaa ggtgaccggg gctttccagg 7680

gcccctgggt gaggctggag agaagggcga acgtggaccc ccaggcccag cgggatcccg 7740

ggggctgcca ggggttgctg gacgtcctgg agccaagggt cctgaagggc caccaggacc 7800

cactggccgc caaggagaga agggggagcc tggtcgccct ggggaccctg cagtggtggg 7860

acctgctgtt gctggaccca aaggagaaaa gggagatgtg gggcccgctg ggcccagagg 7920

agctaccgga gtccaagggg aacggggccc acccggcttg gttcttcctg gagaccctgg 7980

ccccaaggga gaccctggag accggggtcc cattggcctt actggcagag caggaccccc 8040

aggtgactca gggcctcctg gagagaaggg agaccctggg cggcctggcc ccccaggacc 8100

tgttggcccc cgaggacgag atggtgaagt tggagagaaa ggtgacgagg gtcctccggg 8160

tgacccgggt ttgcctggaa aagcaggcga gcgtggcctt cgggggggcac ctggagttcg 8220

ggggcctgtg ggtgaaaagg gagaccaggg agatcctgga gaggatggac gaaatggcag 8280

ccctggatca tctggaccca agggtgaccg tggggagccg ggtcccccag gacccccggg 8340

acggctggta gacacaggac ctggagccag agagaaggga gagcctgggg accgcggaca 8400

agagggtcct cgagggccca agggtgatcc tggcctccct ggagcccctg gggaaagggg 8460

cattgaaggg tttcggggac ccccaggccc acaggggggac ccaggtgtcc gaggcccagc 8520

aggagaaaag ggtgaccggg gtccccctgg gctggatggc cggagcggac tggatgggaa 8580

accaggagcc gctgggccct ctgggccgaa tggtgctgca ggcaaagctg gggacccagg 8640

gagagacggg cttccaggcc tccgtggaga acaaggcctc cctggcccct ctggtccccc 8700

tggattaccg ggaaagccag gcgaggatgg gaaacctggc ctgaatggaa aaaacggaga 8760

acctggggac cctggagaag acgggaggaa gggagagaaa ggagattcag gcgcctctgg 8820

gagagaaggt cgtgatggcc ccaagggtga gcgtggagct cctggtatcc ttggacccca 8880

ggggcctcca ggcctcccag ggccagtggg ccctcctggc cagggttttc ctggtgtccc 8940

aggaggcacg ggccccaagg gtgaccgtgg ggagactgga tccaaagggg agcagggcct 9000

ccctggagag cgtggcctgc gaggagagcc tggaagtgtg ccgaatgtgg atcggttgct 9060

ggaaactgct ggcatcaagg catctgccct gcgggagatc gtggagacct gggatgagag 9120

ctctggtagc ttcctgcctg tgcccgaacg gcgtcgaggc cccaaggggg actcaggcga 9180

acagggcccc ccaggcaagg agggccccat cggctttcct ggagaacgcg ggctgaaggg 9240

cgaccgtgga gaccctggcc ctcaggggcc acctggtctg gcccttgggg agaggggccc 9300

ccccgggcct tccggccttg ccggggagcc tggaaagcct ggtattcccg ggctcccagg 9360

cagggctggg ggtgtgggag aggcaggaag gccaggagag aggggagaac ggggagagaa 9420

aggagaacgt ggagaacagg gcagagatgg ccctcctgga ctccctggaa cccctgggcc 9480

ccccggaccc cctggcccca aggtgtctgt ggatgagcca ggtcctggac tctctggaga 9540

acagggaccc cctggactca agggtgctaa gggggagccg ggcagcaatg gtgaccaagg 9600

tcccaaagga gacaggggtg tgccaggcat caaaggagac cggggagagc ctggaccgag 9660

gggtcaggac ggcaacccgg gtctaccagg agagcgtggt atggctgggc ctgaagggaa 9720

gccgggtctg cagggtccaa gaggcccccc tggcccagtg ggtggtcatg gagaccctgg 9780

accacctggt gccccgggtc ttgctggccc tgcaggaccc caaggacctt ctggcctgaa 9840

gggggagcct ggagagacag gacctccagg acggggcctg actggaccta ctggagctgt 9900

gggacttcct ggaccccccg gcccttcagg ccttgtgggt ccacaggggt ctccaggttt 9960

gcctggacaa gtgggggaga cagggaagcc gggagcccca ggtcgagatg gtgccagtgg 10020

aaaagatgga gacagaggga gccctggtgt gccagggtca ccaggtctgc ctggccctgt 10080

cggacctaaa ggagaacctg gccccacggg ggcccctgga caggctgtgg tcgggctccc 10140

tggagcaaag ggagagaagg gagcccctgg aggccttgct ggagacctgg tgggtgagcc 10200

gggagccaaa ggtgaccgag gactgccagg gccgcgaggc gagaagggtg aagctggccg 10260

tgcaggggag cccggagacc ctggggaaga tggtcagaaa ggggctccag gacccaaagg 10320

tttcaagggt gacccaggag tcggggtccc gggctcccct gggcctcctg gccctccagg 10380

tgtgaaggga gatctgggcc tccctggcct gcccggtgct cctggtgttg ttgggttccc 10440

gggtcagaca ggccctcgag gagagatggg tcagccaggc cctagtggag agcggggtct 10500

ggcaggcccc ccagggagag aaggaatccc aggacccctg gggccacctg gaccaccggg 10560

gtcagtggga ccacctgggg cctctggact caaaggagac aagggagacc ctggagtagg 10620

gctgcctggg ccccgaggcg agcgtgggga gccaggcatc cggggtgaag atggccgccc 10680

cggccaggag ggaccccgag gactcacggg gccccctggc agcaggggag agcgtgggga 10740

gaagggtgat gttgggagtg caggactaaa gggtgacaag ggagactcag ctgtgatcct 10800

ggggcctcca ggcccacggg gtgccaaggg ggacatgggt gaacgagggc ctcggggctt 10860

ggatggtgac aaaggacctc ggggagacaa tggggaccct ggtgacaagg gcagcaaggg 10920

agagcctggt gacaagggct cagccgggtt gccaggactg cgtggactcc tgggacccca 10980

gggtcaacct ggtgcagcag ggatccctgg tgacccggga tccccaggaa aggatggagt 11040

gcctggtatc cgaggagaaa aaggagatgt tggcttcatg ggtccccggg gcctcaaggg 11100

tgaacgggga gtgaagggag cctgtggcct tgatggagag aagggagaca agggagaagc 11160

tggtccccca ggccgccccg ggctggcagg acacaaagga gagatggggg agcctggtgt 11220

gccgggccag tcgggggccc ctggcaagga gggcctgatc ggtcccaagg gtgaccgagg 11280

ctttgacggg cagccaggcc ccaagggtga ccagggcgag aaaggggagc ggggaacccc 11340

aggaattggg ggcttcccag gccccagtgg aaatgatggc tctgctggtc ccccagggcc 11400

acctggcagt gttggtccca gaggccccga aggacttcag ggccagaagg gtgagcgagg 11460

tccccccgga gagagagtgg tgggggctcc tggggtccct ggagctcctg gcgagagagg 11520

ggagcagggg cggccagggc ctgccggtcc tcgaggcgag aagggagaag ctgcactgac 11580

ggaggatgac atccggggct ttgtgcgcca agagatgagt cagcactgtg cctgccaggg 11640

ccagttcatc gcatctggat cacgacccct ccctagttat gctgcagaca ctgccggctc 11700

ccagctccat gctgtgcctg tgctccgcgt ctctcatgca gaggaggaag agcgggtacc 11760

ccctgaggat gatgagtact ctgaatactc cgagtattct gtggaggagt accaggaccc 11820

tgaagctcct tgggatagtg atgacccctg ttccctgcca ctggatgagg gctcctgcac 11880

tgcctacacc ctgcgctggt accatcgggc tgtgacaggc agcacagagg cctgtcaccc 11940

ttttgtctat ggtggctgtg gagggaatgc caaccgtttt gggacccgtg aggcctgcga 12000

gcgccgctgc ccaccccggg tggtccagag ccaggggaca ggtactgccc aggactgatc 12060

gataccgtcg acctcgagac ctagaaaaac atggagcaat cacaagtagc aatacagcag 12120

ctaccaatgc tgattgtgcc tggctagaag cacaagagga ggaggaggtg ggttttccag 12180

tcacacctca ggtaccttta agaccaatga cttacaaggc agctgtagat cttagccact 12240

ttttaaaaga aaaggggga ctggaagggc taattcactc ccaacgaaga caagatatcc 12300

ttgatctgtg gatctaccac acacaaggct acttccctga ttggcagaac tacacaccag 12360

ggccagggat cagatatcca ctgacctttg gatggtgcta caagctagta ccagttgagc 12420

aagagaaggt agaagaagcc aatgaaggag agaacacccg cttgttacac cctgtgagcc 12480

tgcatgggat ggatgacccg gagagagaag tattagagtg gaggtttgac agccgcctag 12540

catttcatca catggcccga gagctgcatc cggactgtac tgggtctctc tggttagacc 12600

agatctgagc ctgggagctc tctggctaac tagggaaccc actgcttaag cctcaataaa 12660

gcttgccttg agtgcttcaa gtagtgtgtg cccgtctgtt gtgtgactct ggtaactaga 12720

gatccctcag acccttttag tcagtgtgga aaatctctag cagggcccgt ttaaacccgc 12780

tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccgtg 12840

ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt 12900

gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc 12960

aaggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatggct 13020

tctgaggcgg aaagaaccag ctggggctct aggggtatc cccacgcgcc ctgtagcggc 13080

gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc 13140

ctagcgcccg ctcctttcgc tttcttccct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc 13200

cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc 13260

gaccccaaaa aacttgatta gggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg 13320

gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact 13380

ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat tttgccgatt 13440

tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttaattctgt 13500

ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt ccccaggctc cccagcaggc agaagtatgc 13560

aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag 13620

gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc 13680

cgcccatccc gcccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa 13740

ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc cagaagtagt 13800

gaggaggctt ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct cccgggagct tgtatatcca 13860

ttttcggatc tgatcagcac gtgttgacaa ttaatcatcg gcatagtata tcggcatagt 13920

ataatacgac aaggtgagga actaaaccat ggccaagttg accagtgccg ttccggtgct 13980

caccgcgcgc gacgtcgccg gagcggtcga gttctggacc gaccggctcg ggttctcccg 14040

ggacttcgtg gaggacgact tcgccggtgt ggtccgggac gacgtgaccc tgttcatcag 14100

cgcggtccag gaccaggtgg tgccggacaa caccctggcc tgggtgtggg tgcgcggcct 14160

ggacgagctg tacgccgagt ggtcggaggt cgtgtccacg aacttccggg acgcctccgg 14220

gccggccatg accgagatcg gcgagcagcc gtgggggcgg gagttcgccc tgcgcgaccc 14280

ggccggcaac tgcgtgcact tcgtggccga ggagcaggac tgacacgtgc tacgagattt 14340

cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg 14400

ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttcgcccacc ccaacttgtt 14460

tattgcagct tataatggtt acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc 14520

atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt 14580

ctgtataccg tcgacctcta gctagagctt ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt 14640

gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 14700

agcctggggt gcctaatgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc 14760

tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 14820

aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt 14880

cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga 14940

atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 15000

taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa 15060

aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 15120

tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 15180

gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 15240

cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 15300

cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt 15360

atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 15420

tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 15480

ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 15540

acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 15600

aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 15660

aaactcacgt taagggattt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 15720

tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 15780

cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 15840

catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 15900

ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 15960

aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat 16020

ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 16080

caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 16140

attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa 16200

agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 16260

actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 16320

ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 16380

ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 16440

gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 16500

atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 16560

cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 16620

gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 16680

gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 16740

ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgac 16777

REIVINDICACIONES

1. Células autólogas modificadas genéticamente para usar en un método para tratar a un paciente que padece una deficiencia de colágeno tipo VII (C7), en donde dicho método comprende:

(i) poner en contacto células, obtenidas de la dermis o epidermis del paciente con deficiencia de C7, con un vector lentiviral de transducción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica COL7A1 o una variante funcional de la misma, para formar las células modificadas genéticamente autólogas que tienen un número de copias del vector, en donde dicho vector lentiviral tiene un número de copias del vector de transducción en el intervalo de 0.1 a 5.0 copias por célula;

(ii) cultivar dichas células modificadas genéticamente autólogas; y

(iii) administrar una cantidad efectiva de las células modificadas genéticamente al paciente con deficiencia de C7,

en donde el vector lentiviral de transducción comprende además (a) una repetición terminal larga (LTR) 5' modificada, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) al menos un elemento del tracto de polipurina central lentiviral, y (c) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis.

2. Las células modificadas genéticamente autólogas para el uso de la reivindicación 1, en donde las células se seleccionan de fibroblastos y queratinocitos.

3. Las células modificadas genéticamente autólogas para el uso de la reivindicación 1, en donde la deficiencia de C7 es epidermólisis ampollosa distrófica.

4. Las células modificadas genéticamente autólogas para el uso de la reivindicación 1, en donde la deficiencia de C7 es una epidermólisis ampollosa distrófica, epidermólisis ampollosa distrófica recesiva (RDEB), epidermólisis ampollosa distrófica dominante (DDEB), Hallopeau-Siemens, RDEB no Hallopeau-Siemens, RDEB inversa, RDEB pretibial, RDEB acral o RDEB centrípeta.

5. Las células modificadas genéticamente autólogas para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho vector lentiviral de transducción está en forma de una partícula de vector lentiviral.

6. Las células modificadas genéticamente autólogas para el uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde las células modificadas genéticamente se van a administrar al paciente por inyección, vía tópica, oral o insertadas en una matriz biocompatible.

7. Un fibroblasto modificado genéticamente autólogo de un paciente que padece una deficiencia de colágeno tipo VII transducido con una partícula de vector lentiviral que comprende un gen *COL7A1* funcional o una variante funcional del mismo, y que expresa el colágeno tipo VII, en donde dicha partícula de vector lentiviral tiene un número de copias del vector de transducción en el intervalo de 0.1 a 5.0 copias por célula, en donde dicha partícula de vector lentiviral de transducción se construye a partir de un vector lentiviral de transferencia que comprende (a) una repetición terminal larga 5' modificada en LTR, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) un gen *COL7A1* funcional, (c) al menos un tracto de polipurina central lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis, en donde el gen *COL7A1* o la variante funcional del mismo se incorpora a las células para formar células modificadas genéticamente que tienen un gen *COL7A1* funcional.

8. Un vector lentiviral autoinactivante formado a partir de un vector de transferencia que comprende (a) una 5' terminal larga modificada en la LTR, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) el gen *COL7A1* o una variante funcional del mismo, (c) al menos un elemento del tracto de polipurina central lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, y, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis, en donde el PRE eliminado es un elemento regulador postranscripcional PRE de marmota (WPRE).

9. Un vector de transferencia que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 34.

10. Una partícula de vector lentiviral que comprende el vector lentiviral autoinactivante de la reivindicación 8 o el vector de transferencia de la reivindicación 9.

11. Una partícula de vector lentiviral construida a partir de un plásmido de expresión lentiviral pSMPUW que comprende (a) una repetición terminal larga 5' modificada en LTR, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) un gen *COL7A1* funcional, (c) al menos un tracto de polipurina central lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis.

12. Una línea celular de empaquetamiento de virus estable que produce la partícula de vector lentiviral de la reivindicación 10 o la reivindicación 11.

13. Una composición farmacéutica que comprende un fibroblasto obtenido de un paciente que padece RDEB o DDEB transducido con el vector lentiviral de la reivindicación 10 o la reivindicación 11.

14. Una célula transducida *in vitro* o *ex vivo* con el vector de la reivindicación 10 o la reivindicación 11.

15. Una población de células autólogas para usar en el tratamiento de un paciente que padece pseudosindactilia, en donde dicha población de células autólogas se va a obtener de dicho paciente y se va a transducir con una partícula de vector lentiviral que comprende un gen *COL7A1* funcional o una variante funcional del mismo, y que expresa el colágeno tipo VII, en donde dicha partícula de vector lentiviral tiene un número de copias del vector de transducción en el intervalo de 0.1 a 5.0 copias por célula, en donde dicha partícula de vector lentiviral de transducción se construye a partir de un vector lentiviral de transferencia que comprende (a) una repetición terminal larga 5' modificada en LTR, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) un gen *COL7A1* funcional, (c) al menos un tracto de polipurina central lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis, en donde se incorpora el gen *COL7A1* o la variante funcional del mismo a las células para formar células modificadas genéticamente que tienen un gen *COL7A1* funcional.

16. Un método para preparar una población aislada de células modificadas genéticamente que expresan colágeno tipo VII (C7) autólogas de un paciente que padece deficiencia de C7 que comprende: poner en contacto células, obtenidas de la dermis o epidermis del paciente con deficiencia de C7, con una partícula de vector lentiviral de transducción que comprende el gen *COL7A1* o una variante funcional del mismo, para formar células autólogas modificadas genéticamente que comprenden el gen *COL7A1* que tiene un número de copias del vector en donde dicha partícula de vector lentiviral tiene un número de copias del vector de transducción en el intervalo de 0.1 a 5.0 copias por célula, y cultivar dichas células autólogas modificadas genéticamente para obtener una población aislada de células modificadas genéticamente que expresan C7, en donde dicha partícula de vector lentiviral de transducción se construye a partir de un vector lentiviral de transferencia que comprende (a) una repetición terminal larga 5' modificada en LTR, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) un gen *COL7A1* funcional, (c) al menos un tracto de polipurina central lentiviral, y (d) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis, en donde el gen *COL7A1* o la variante funcional del mismo se incorpora a las células para formar células modificadas genéticamente que tienen un gen *COL7A1* funcional.

17. Una población aislada de células modificadas genéticamente que expresan colágeno tipo VII (C7) producida por el método de la reivindicación 16.

18. Una formulación farmacéutica que comprende la población aislada de la reivindicación 17.

19. Un método para aumentar el número de copias del transgén integradas por célula en fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos modificados genéticamente que comprende

(a) poner en contacto un vector lentiviral de transducción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un gen *COL7A1* o una variante funcional del mismo con un fibroblasto o queratinocito dérmico humano obtenido de un paciente con deficiencia de C7 para formar una primera composición de transducción;

(b) someter dicha primera composición de transducción a espinoculación para formar fibroblasto o queratinocito dérmico humano transducido;

(c) poner en contacto los fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos de la etapa (b) con un segundo vector lentiviral de transducción para formar una segunda composición de transducción; y

(d) someter dicha primera composición de transducción a espinoculación para formar fibroblasto o queratinocito dérmico humano transducido,

en donde el número de copias del transgén integradas de los fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos es al menos 5, 10, 15, 20, 25, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45 o 50 veces mayor en relación con fibroblastos o queratinocitos dérmicos humanos transducidos no sometidos a espinoculación o a una segunda etapa de transducción, y en donde el vector lentiviral de transducción comprende además (a) una repetición terminal larga 5' (LTR) modificada, en donde el promotor de la 5' LTR modificada es un promotor de citomegalovirus, (b) al menos un elemento del tracto de polipurina central lentiviral, y (c) una 3' LTR modificada, en donde la 3' LTR modificada comprende una deleción respecto a la 3' LTR de tipo natural, en donde se ha eliminado un elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis.

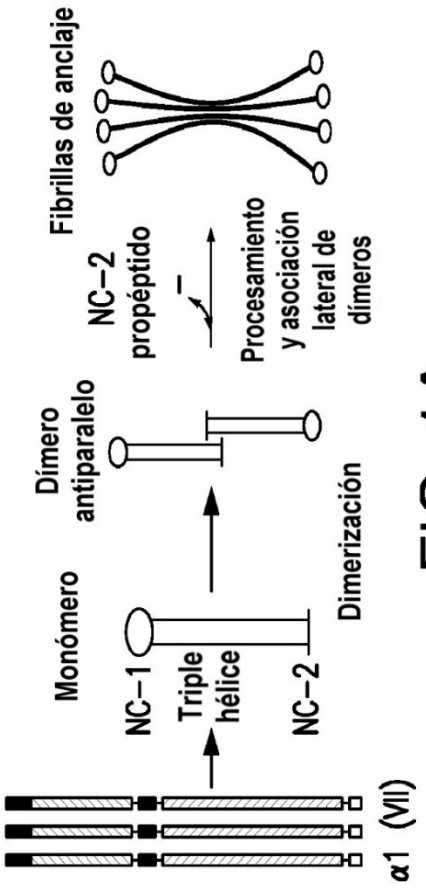

Monómero
NC–1
Triple hélice
NC–2
α1 (VII)
Dimerización
Dímero antiparalelo
NC–2 propéptido
Procesamiento y asociación lateral de dímeros
Fibrillas de anclaje

FIG. 1A

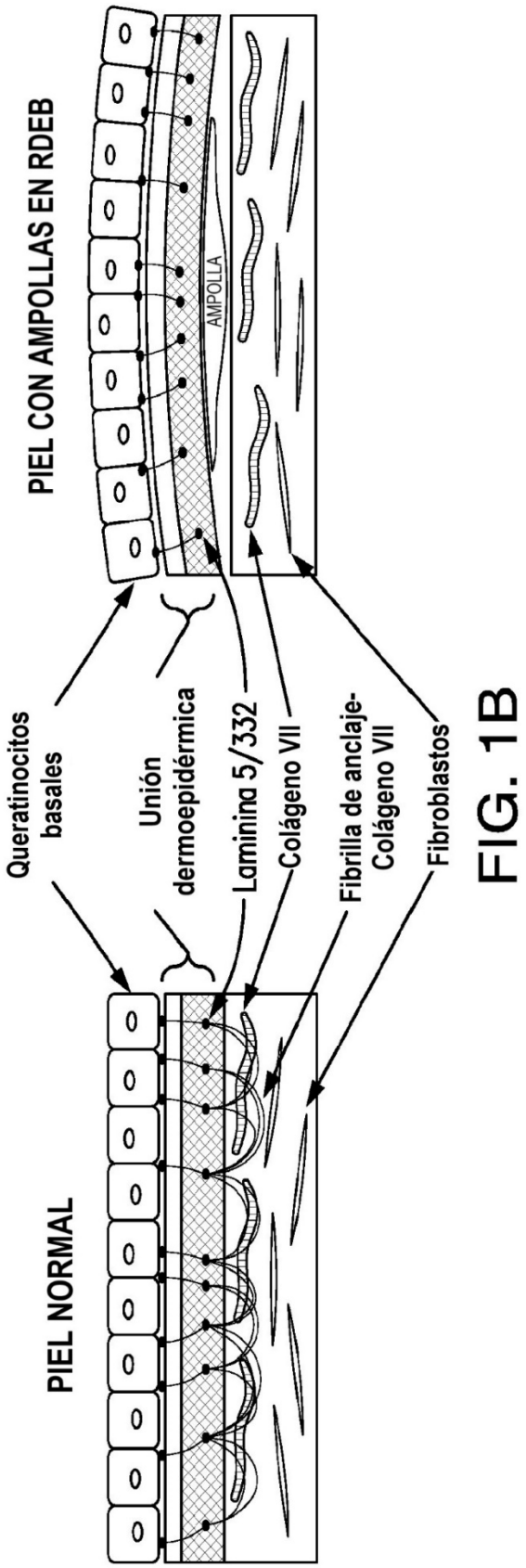

PIEL CON AMPOLLAS EN RDEB
AMPOLLA
PIEL NORMAL
Queratinocitos basales
Unión dermoepidérmica
Laminina 5/332
Colágeno VII
Fibrilla de anclaje-Colágeno VII
Fibroblastos

FIG. 1B

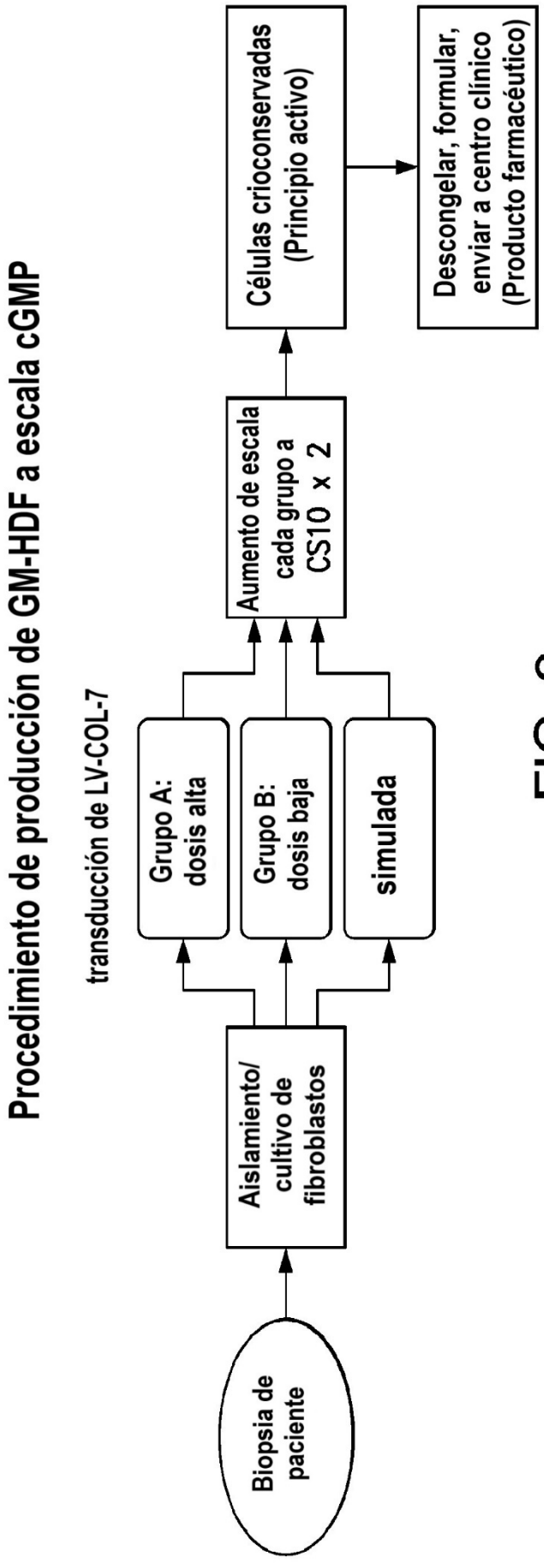

Procedimiento de producción de GM-HDF a escala cGMP
transducción de LV-COL-7
Biopsia de paciente
Aislamiento/ cultivo de fibroblastos
Grupo A: dosis alta
Grupo B: dosis baja
simulada
Aumento de escala cada grupo a CS10 x 2
Células crioconservadas (Principio activo)
Descongelar, formular, enviar a centro clínico (Producto farmacéutico)

FIG. 2

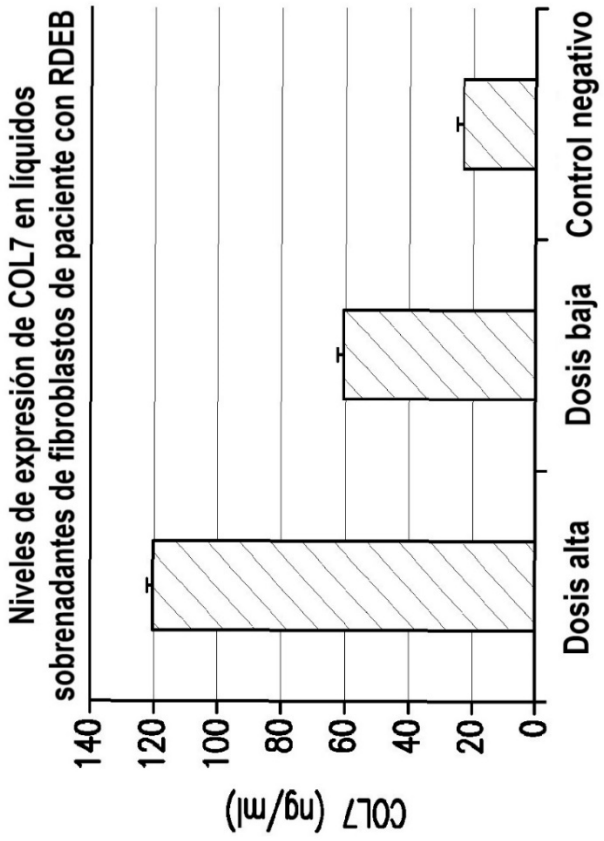

Niveles de expresión de COL7 en líquidos sobrenadantes de fibroblastos de paciente con RDEB
COL7 (ng/ml)
140
120
100
80
60
40
20
0
Dosis alta
Dosis baja
Control negativo
Grupo de transducción

FIG. 3B

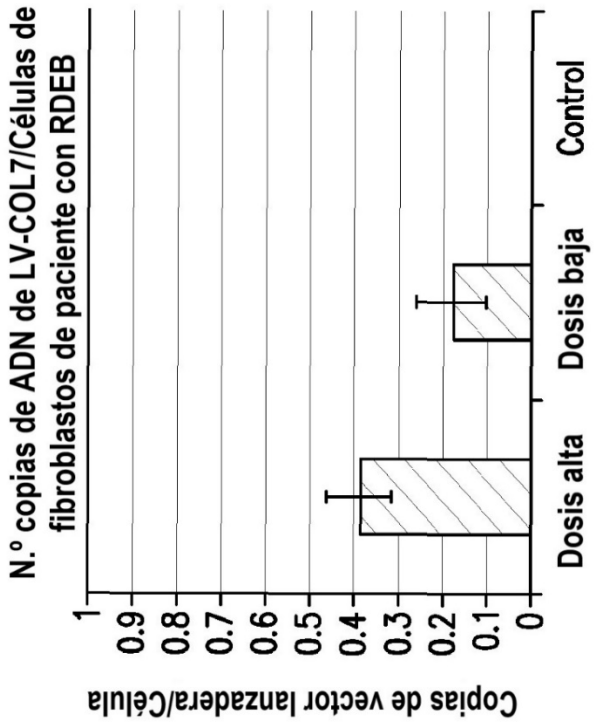

N.º copias de ADN de LV-COL7/Células de fibroblastos de paciente con RDEB
Copias de vector lanzadera/Célula
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Dosis alta
Dosis baja
Control
Grupo de transducción

FIG. 3A

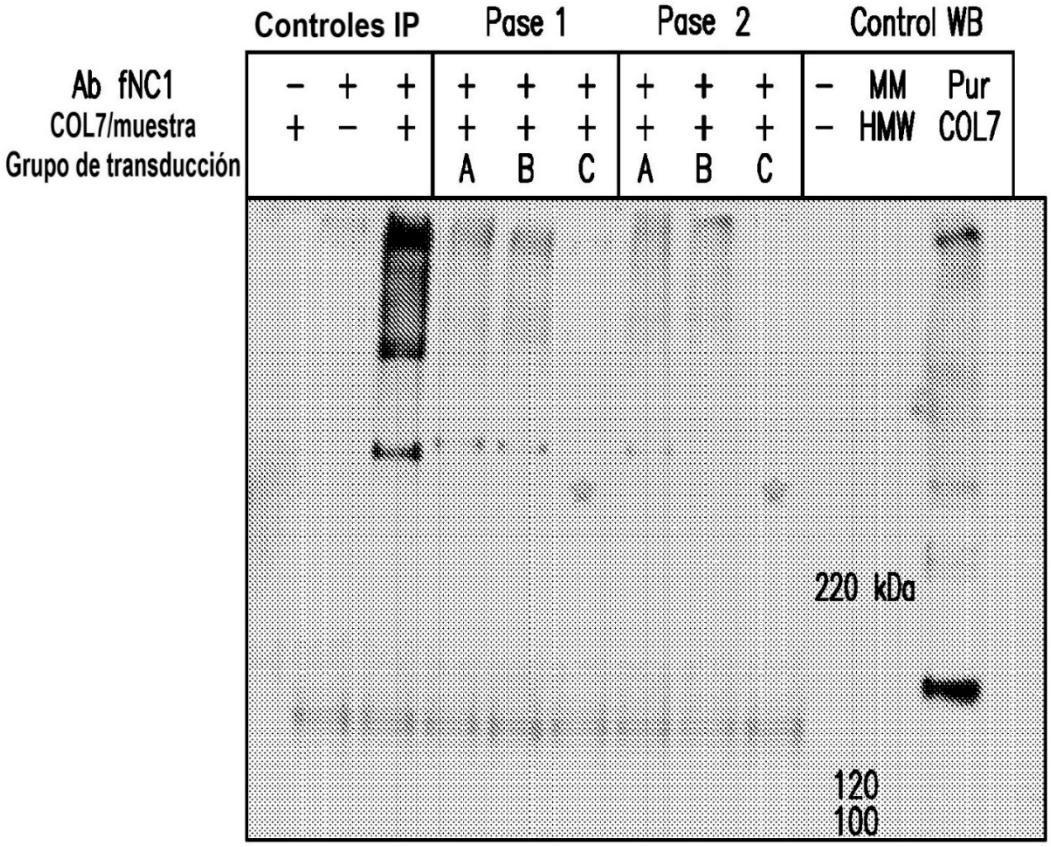

Controles IP
Pase 1
Pase 2
Control WB
Ab fNC1
COL7/muestra
Grupo de transducción
- + +
+ - +
+ + +
+ + +
A B C
+ + +
+ + +
A B C
- MM Pur
- HMW COL7
220 kDa
120
100

FIG. 3C

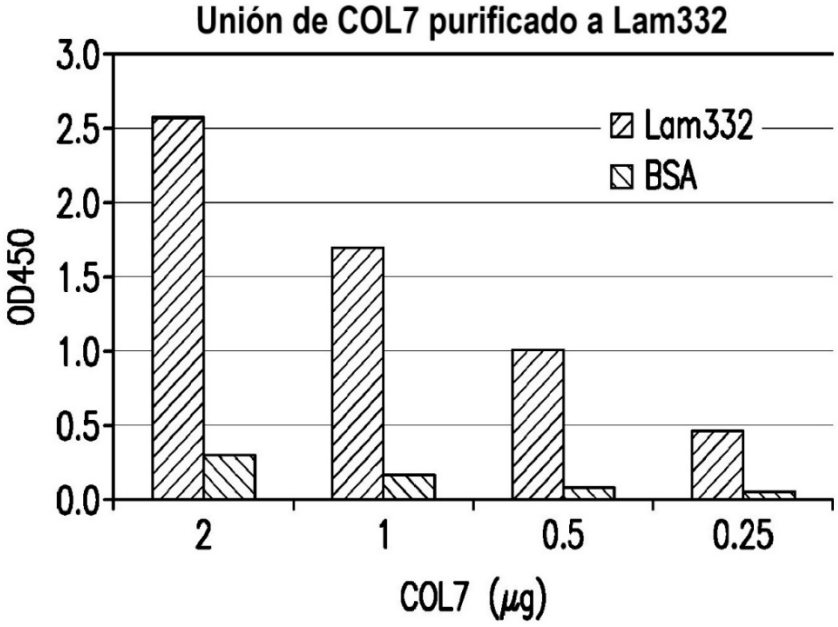

Unión de COL7 purificado a Lam332
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD450
Lam332
BSA
2
1
0.5
0.25
COL7 (μg)

FIG. 4A

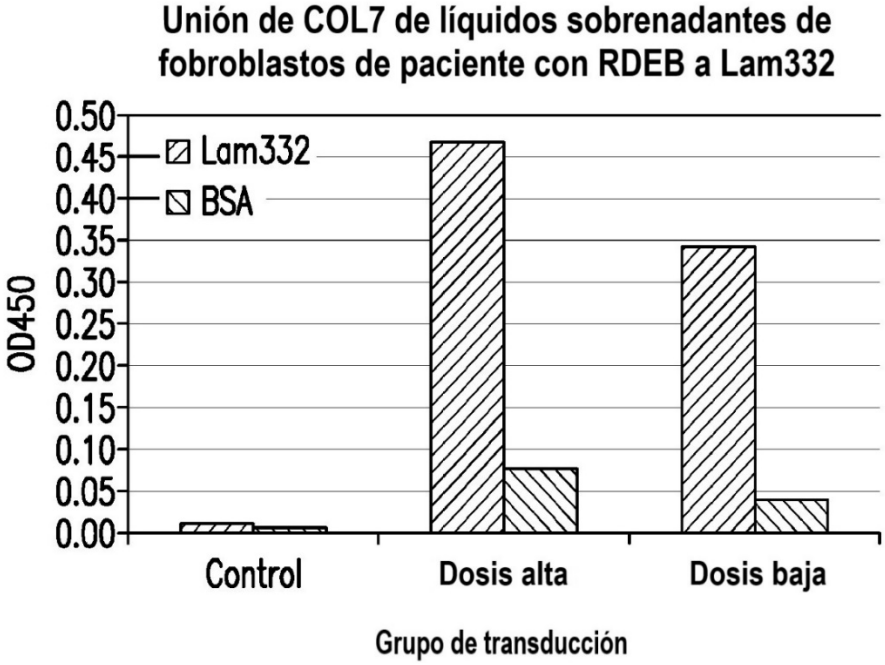

Unión de COL7 de líquidos sobrenadantes de fobroblastos de paciente con RDEB a Lam332
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
OD450
Lam332
BSA
Control
Dosis alta
Dosis baja
Grupo de transducción

FIG. 4B

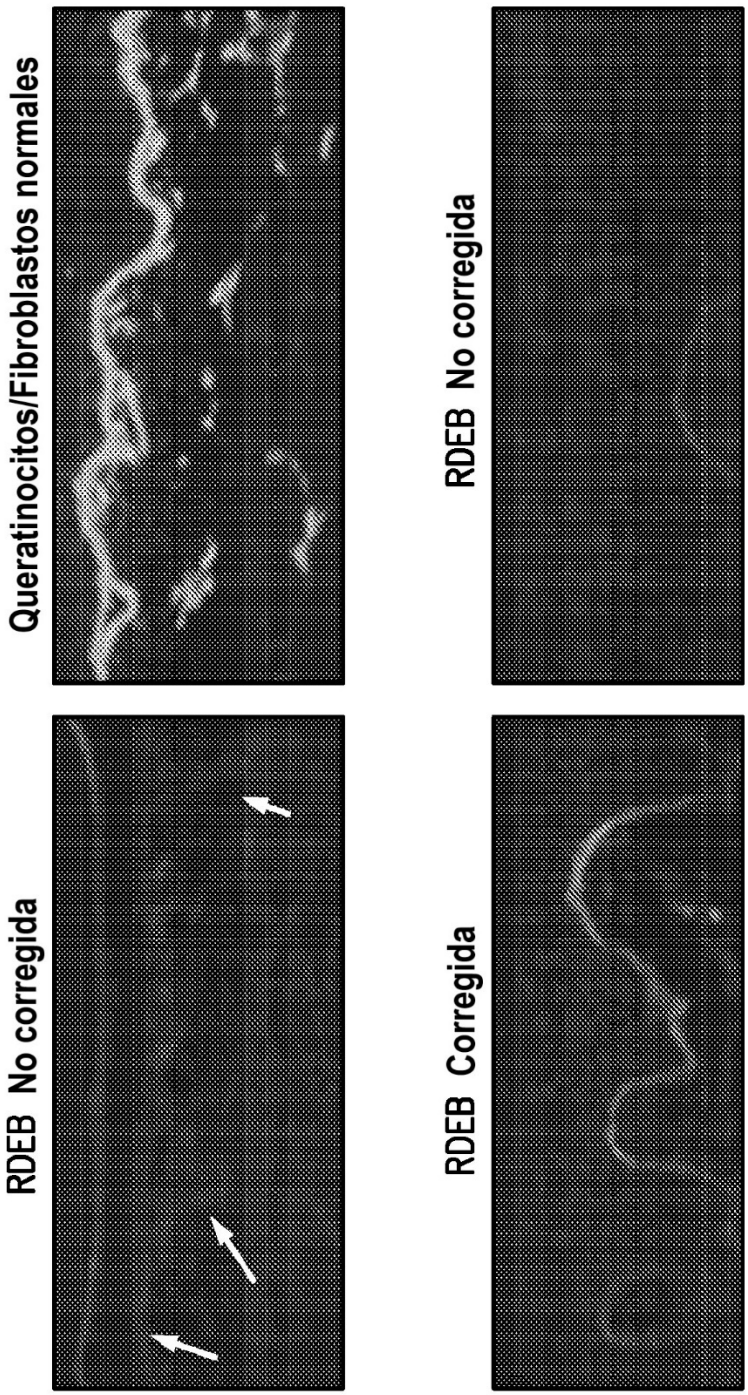

Queratinocitos/Fibroblastos normales
RDEB No corregida
RDEB No corregida
RDEB Corregida

FIG. 5

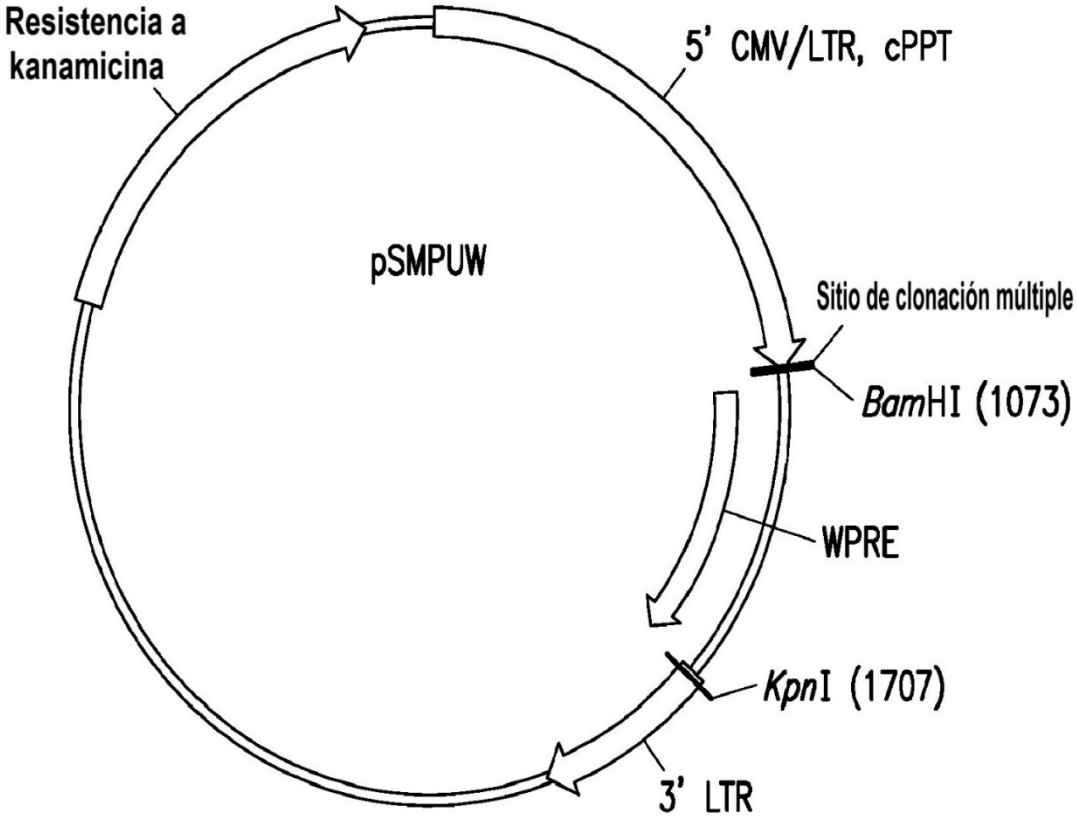

Resistencia a kanamicina
5' CMV/LTR, cPPT
pSMPUW
Sitio de clonación múltiple
BamHI (1073)
WPRE
KpnI (1707)
3' LTR

FIG. 6

Elemento	Nombre	Beneficios comparados con otros sistemas de 3ª generación
		ELEMENTOS AÑADIDOS
cPPT	Tracto de polipurina central	• Aumento de niveles de expresión génica
	Híbrido 3' LTR Poli(A)	• Aumento de seguridad: evita la transcripción a través de lectura • Aumento del título viral: transcrito de vector más estable en células de empaquetamiento
WPRE	WPRE	• Aumento del título viral
		ELEMENTOS ELIMINADOS
Δgag	Secuencia Gag	• Aumento de seguridad: reduce la homología de secuencia
RRE	Elemento de respuesta-Rev	• Aumento de seguridad: reduce la homología de secuencia

FIG. 7

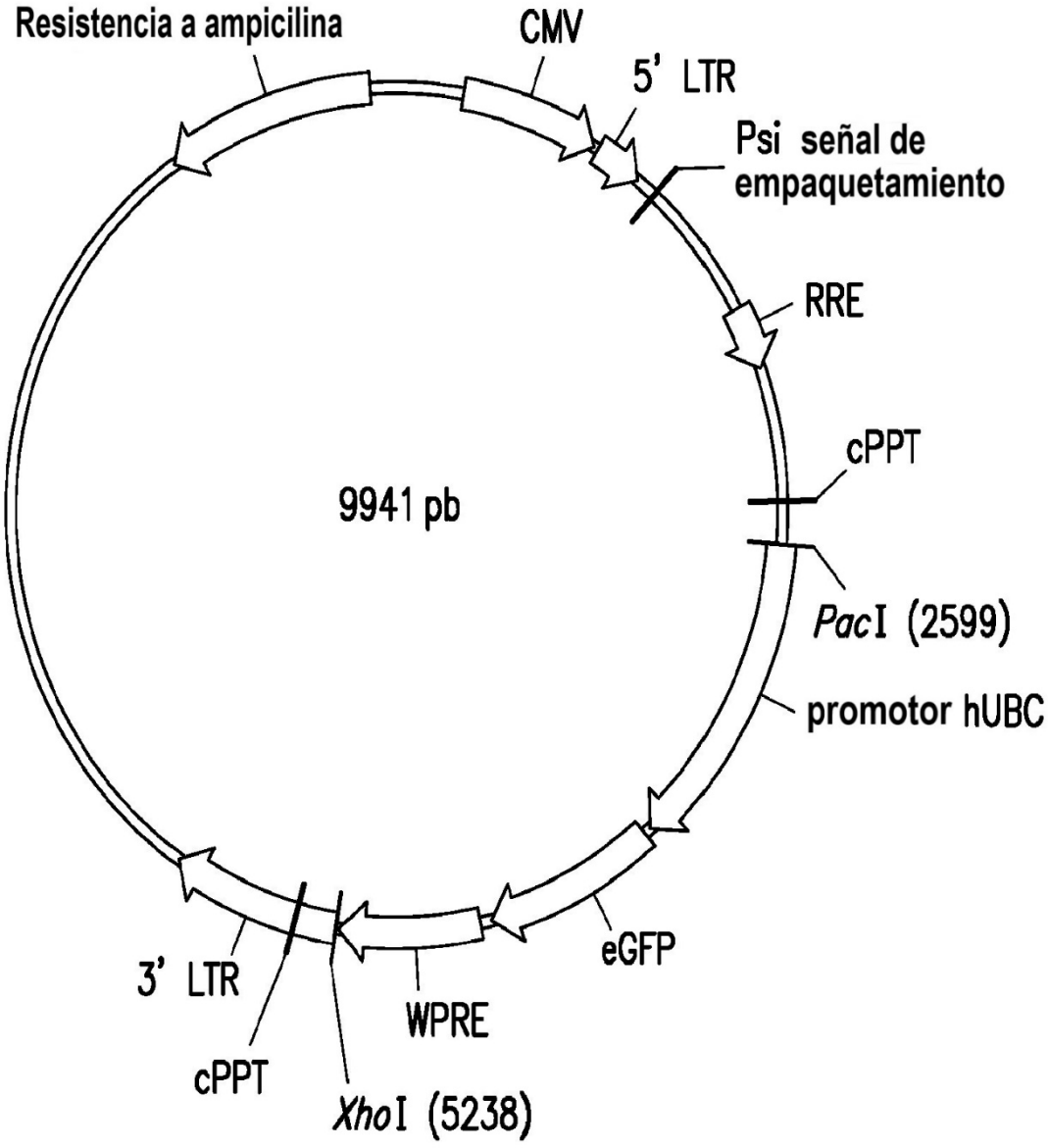
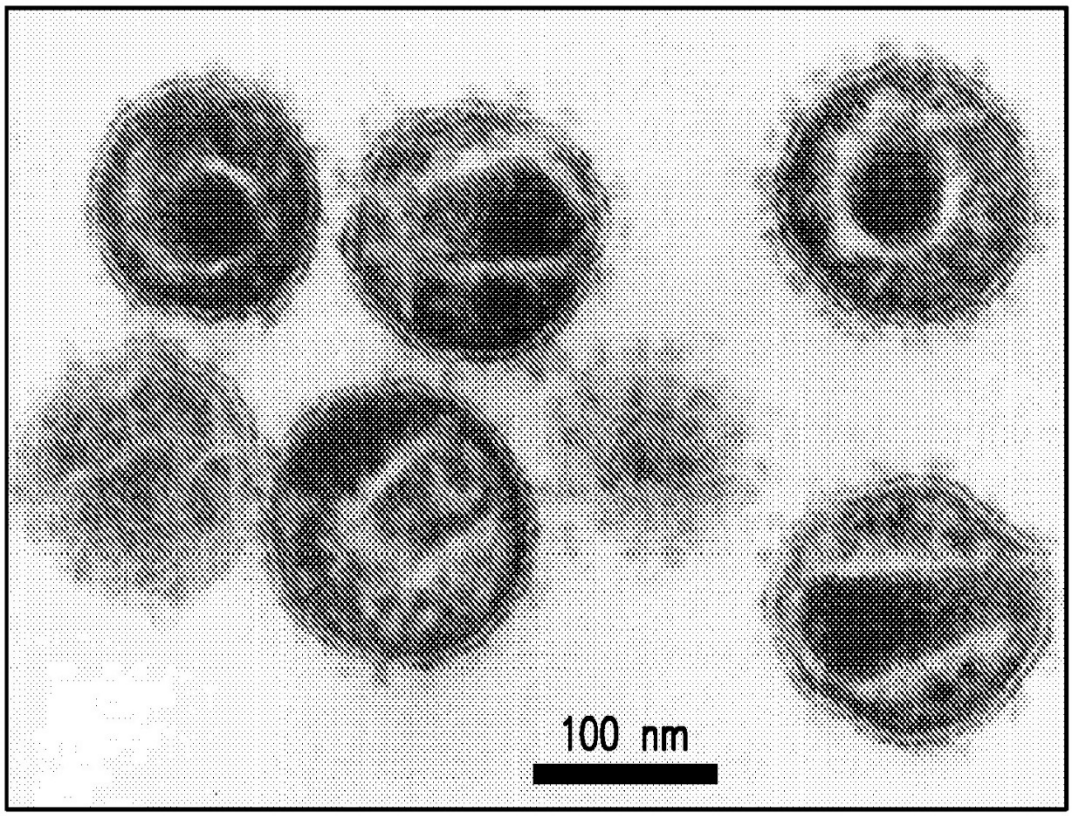

Resistencia a ampicilina
CMV
5' LTR
Psi señal de empaquetamiento
RRE
cPPT
9941 pb
PacI (2599)
promotor hUBC
eGFP
3' LTR
WPRE
cPPT
XhoI (5238)

FIG. 8



(Tomé 2013)

FIG. 9

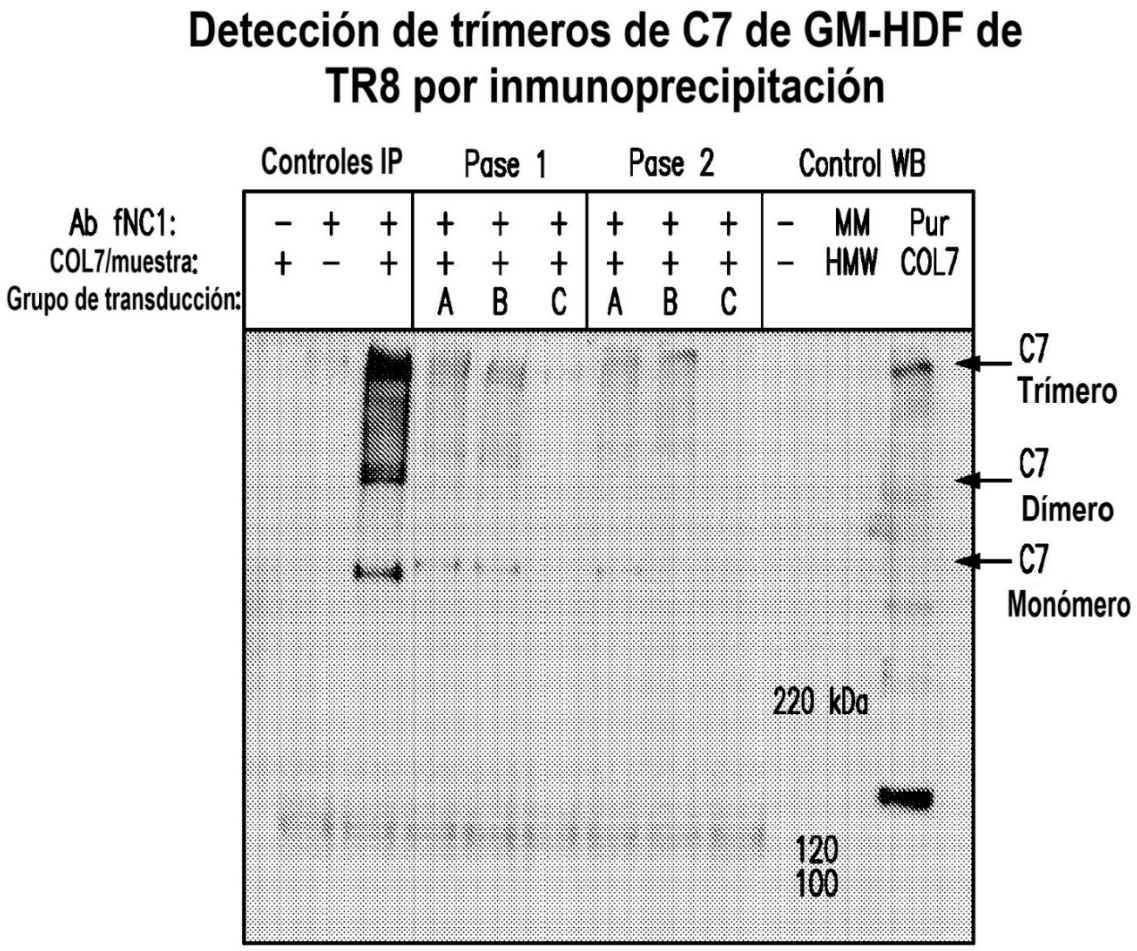

Detección de trímeros de C7 de GM-HDF de TR8 por inmunoprecipitación
Controles IP
Pase 1
Pase 2
Control WB
Ab fNC1:
COL7/muestra:
Grupo de transducción:
MM
HMW
Pur
COL7
A
B
C
C7 Trímero
C7 Dímero
C7 Monómero
220 kDa
120
100

FIG. 10

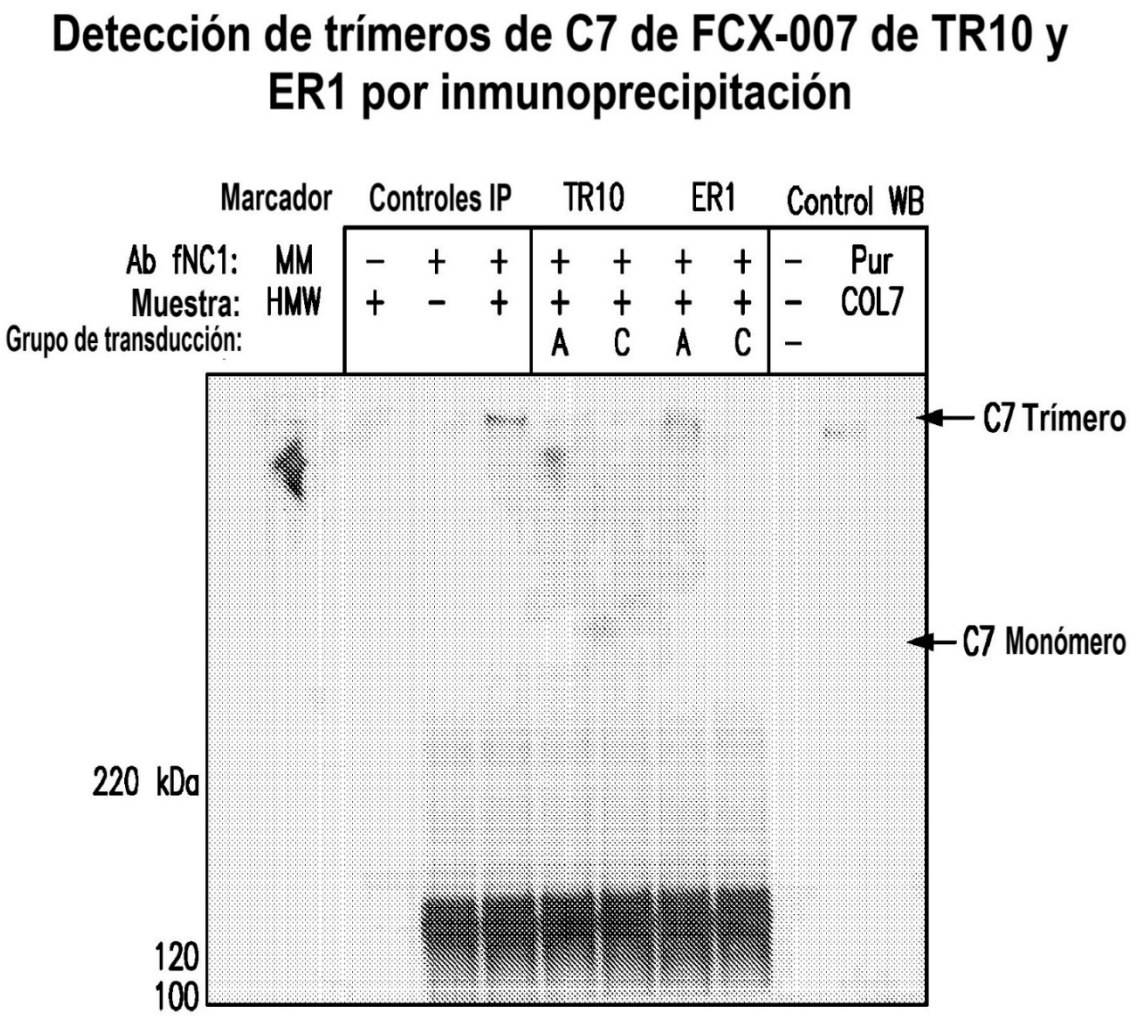

Detección de trímeros de C7 de FCX-007 de TR10 y ER1 por inmunoprecipitación
Marcador
Controles IP
TR10
ER1
Control WB
Ab fNC1: MM
Muestra: HMW
Grupo de transducción:
Pur
COL7
A
C
A
C
C7 Trímero
C7 Monómero
220 kDa
120
100

FIG. 11A

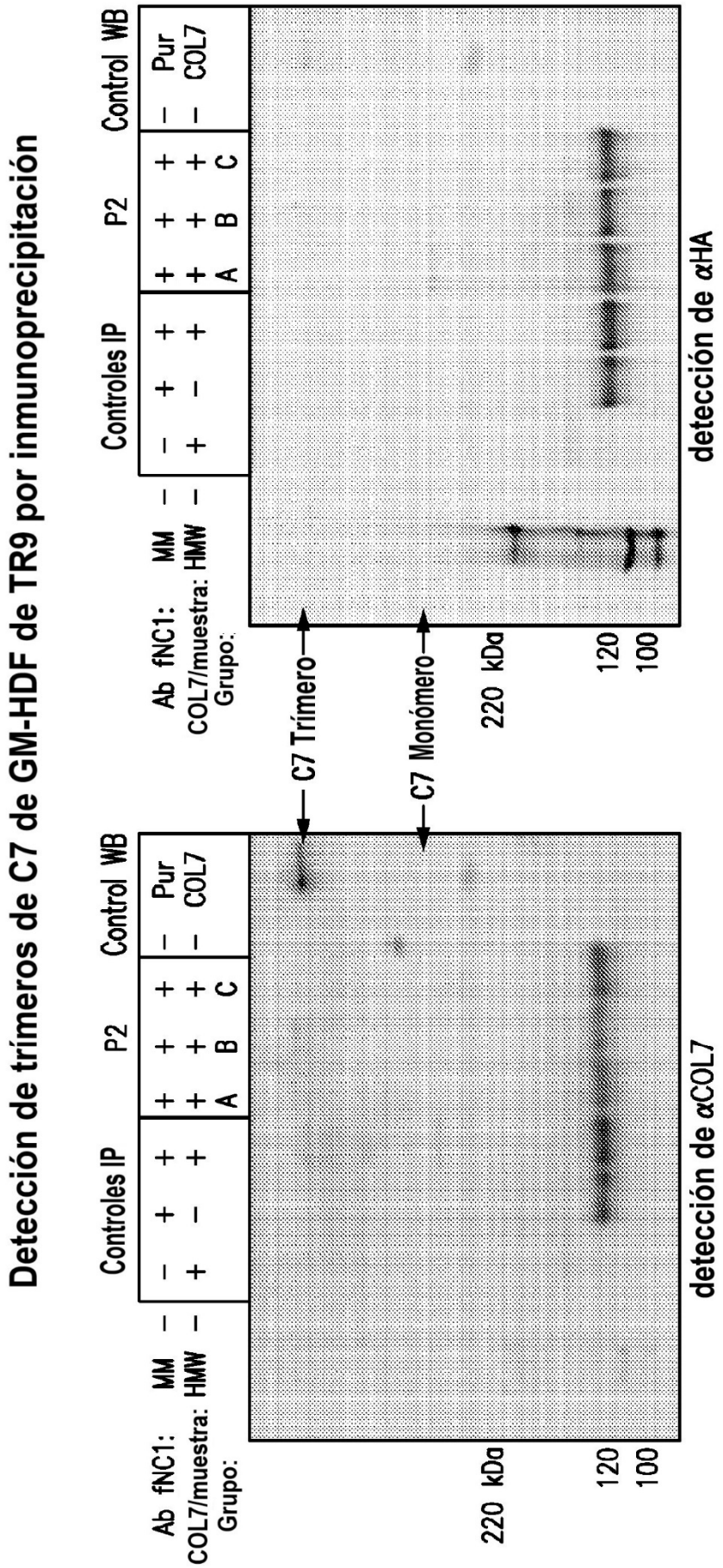

Detección de trímeros de C7 de GM-HDF de TR9 por inmunoprecipitación
Ab fNC1: MM
COL7/muestra: HMW
Grupo:
Controles IP
P2
Control WB
Pur COL7
A B C
C7 Trímero
C7 Monómero
220 kDa
120
100
detección de αCOL7
detección de αHA

FIG. 11B

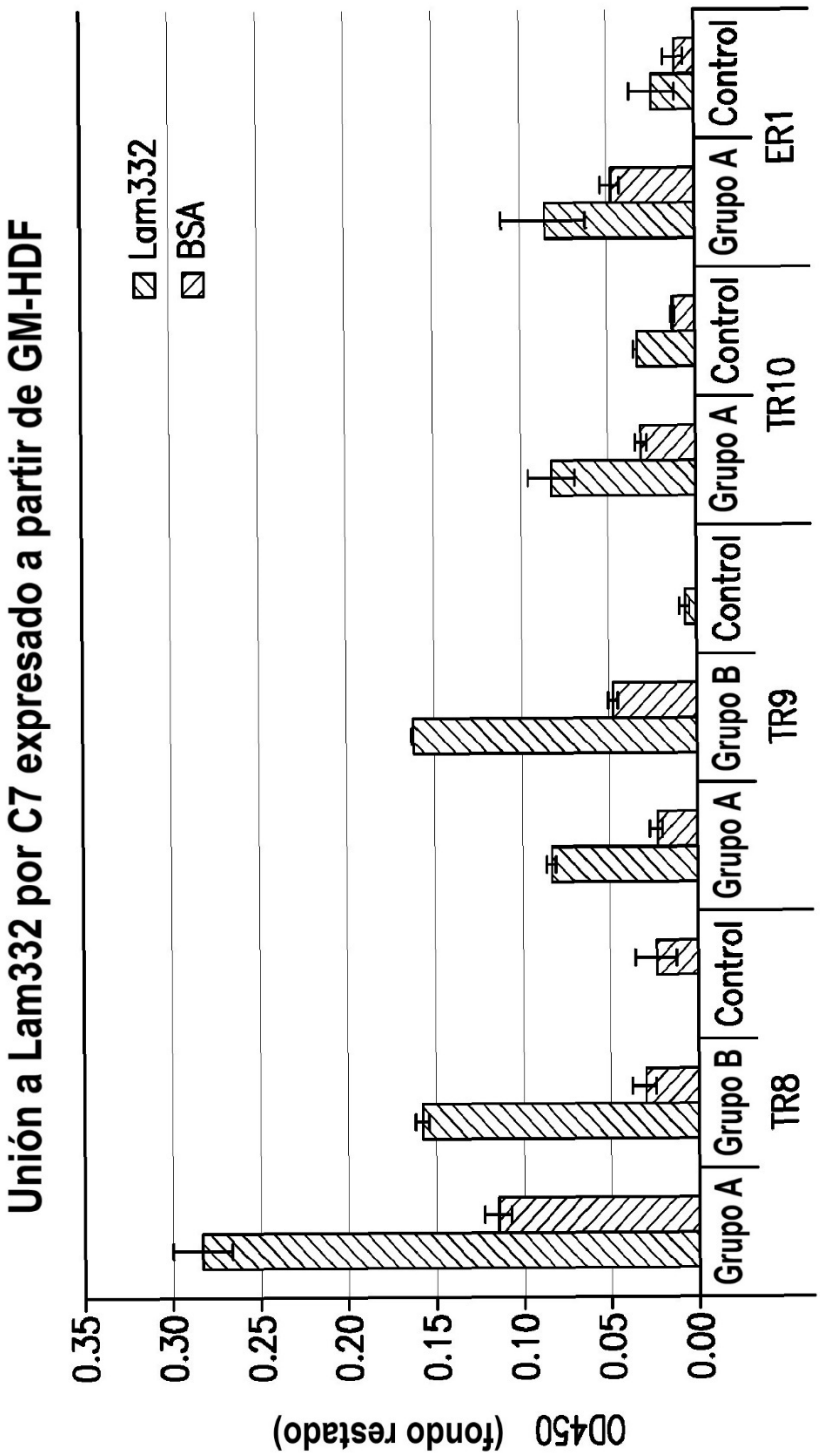

Unión a Lam332 por C7 expresado a partir de GM-HDF
Lam332
BSA
OD450 (fondo restado)
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Grupo A
Grupo B
Control
Grupo A
Grupo B
Control
Grupo A
Control
Grupo A
Control
TR8
TR9
TR10
ER1

FIG. 12

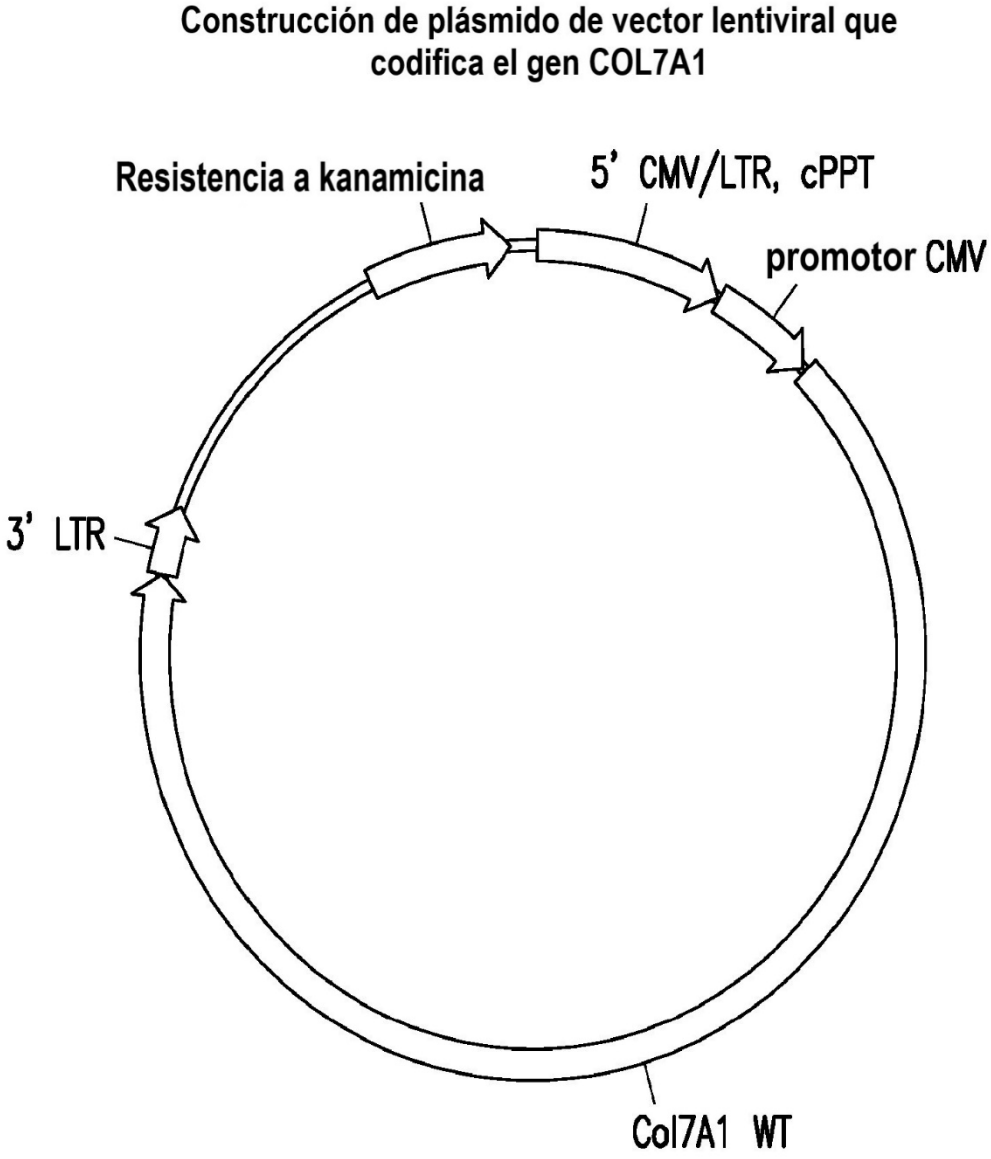

Construcción de plásmido de vector lentiviral que codifica el gen COL7A1
Resistencia a kanamicina
5' CMV/LTR, cPPT
promotor CMV
3' LTR
Col7A1 WT

FIG. 13

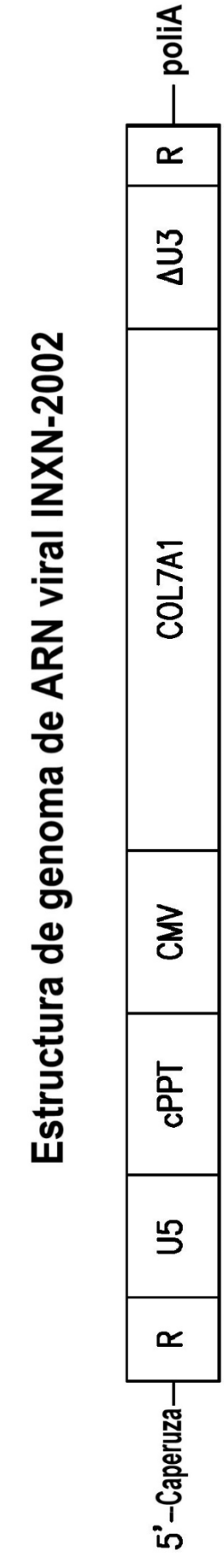

Estructura de genoma de ARN viral INXN-2002
5'–Caperuza
R
U5
cPPT
CMV
COL7A1
ΔU3
R
poliA

FIG. 14

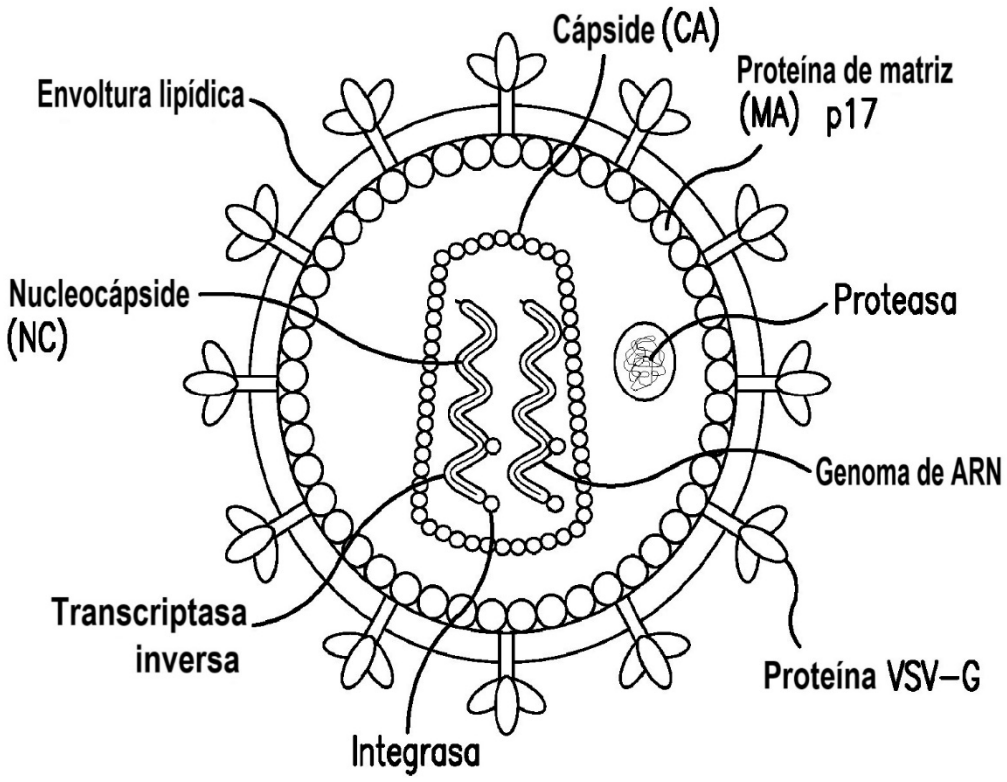

Esquema de estructura de partícula de vector INXN-2002
Cápside (CA)
Proteína de matriz
(MA) p17
Envoltura lipídica
Nucleocápside
(NC)
Proteasa
Genoma de ARN
Transcriptasa
inversa
Proteína VSV-G
Integrasa

FIG. 15

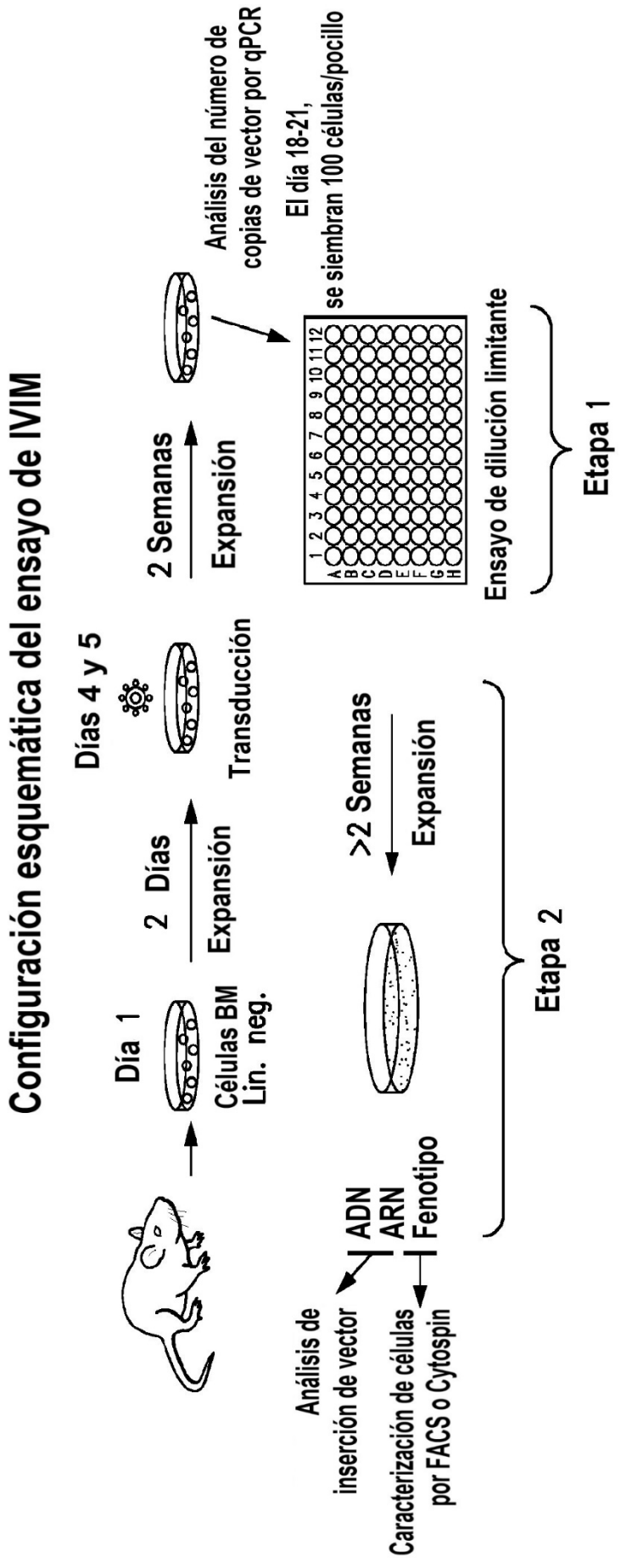

Configuración esquemática del ensayo de IVIM
Día 1
Células BM
Lin. neg.
2 Días
Expansión
Días 4 y 5
Transducción
2 Semanas
Expansión
Análisis del número de
copias de vector por qPCR
El día 18-21,
se siembran 100 células/pocillo
Ensayo de dilución limitante
Etapa 1
>2 Semanas
Expansión
Etapa 2
ADN
ARN
Fenotipo
Análisis de
inserción de vector
Caracterización de células
por FACS o Cytospin

FIG. 16

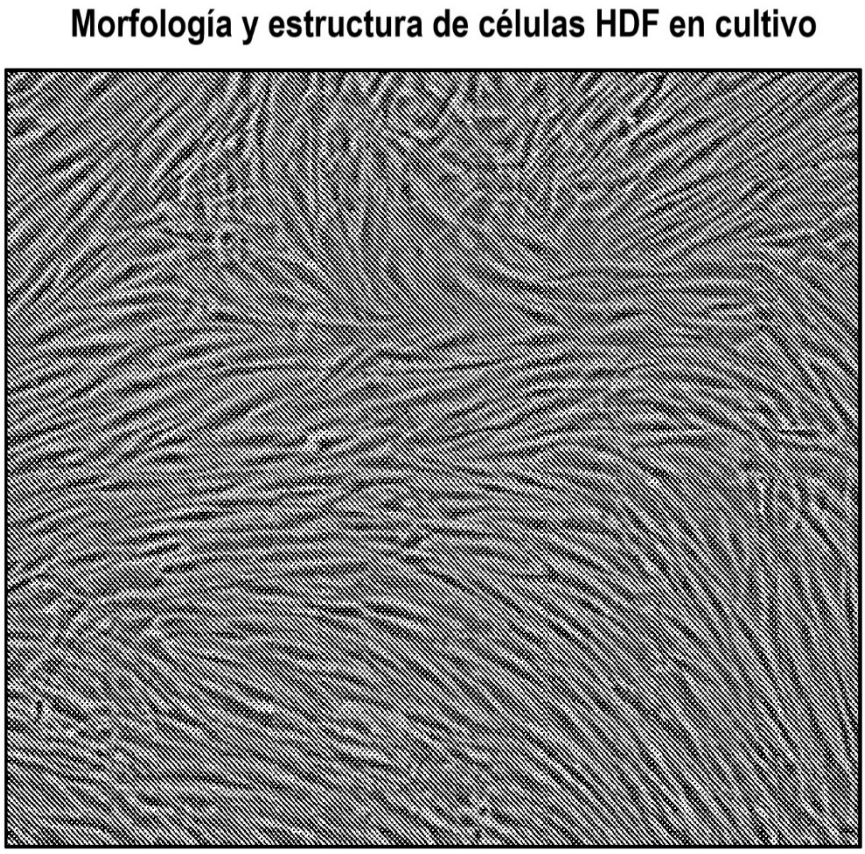


FIG. 17

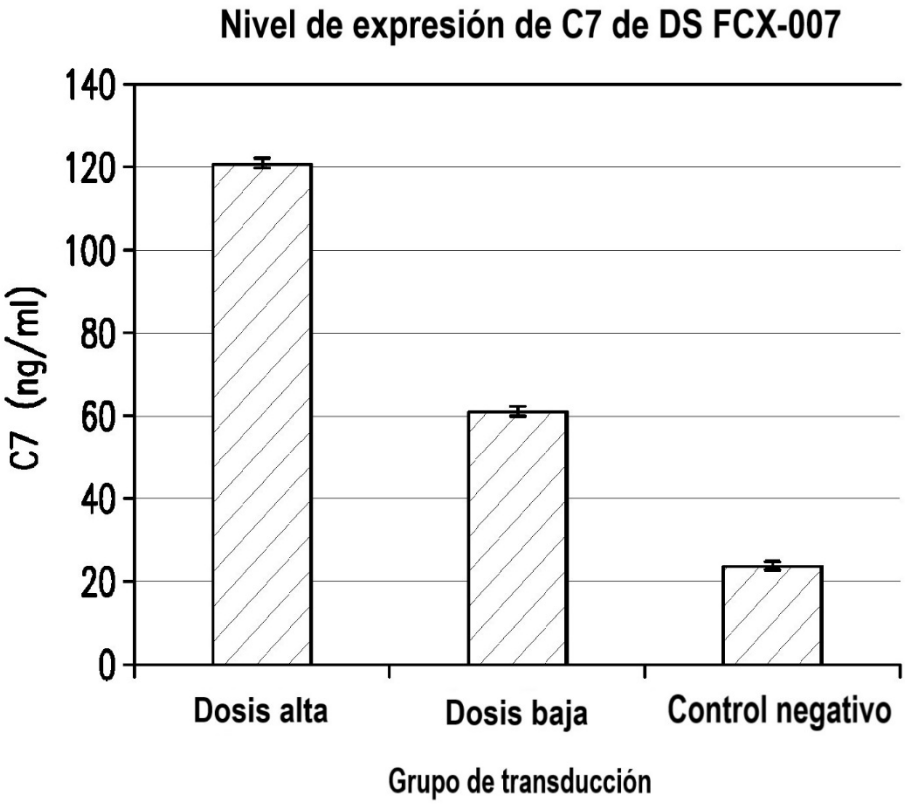

Nivel de expresión de C7 de DS FCX-007
140
120
100
80
60
40
20
0
C7 (ng/ml)
Dosis alta
Dosis baja
Control negativo
Grupo de transducción

FIG. 18

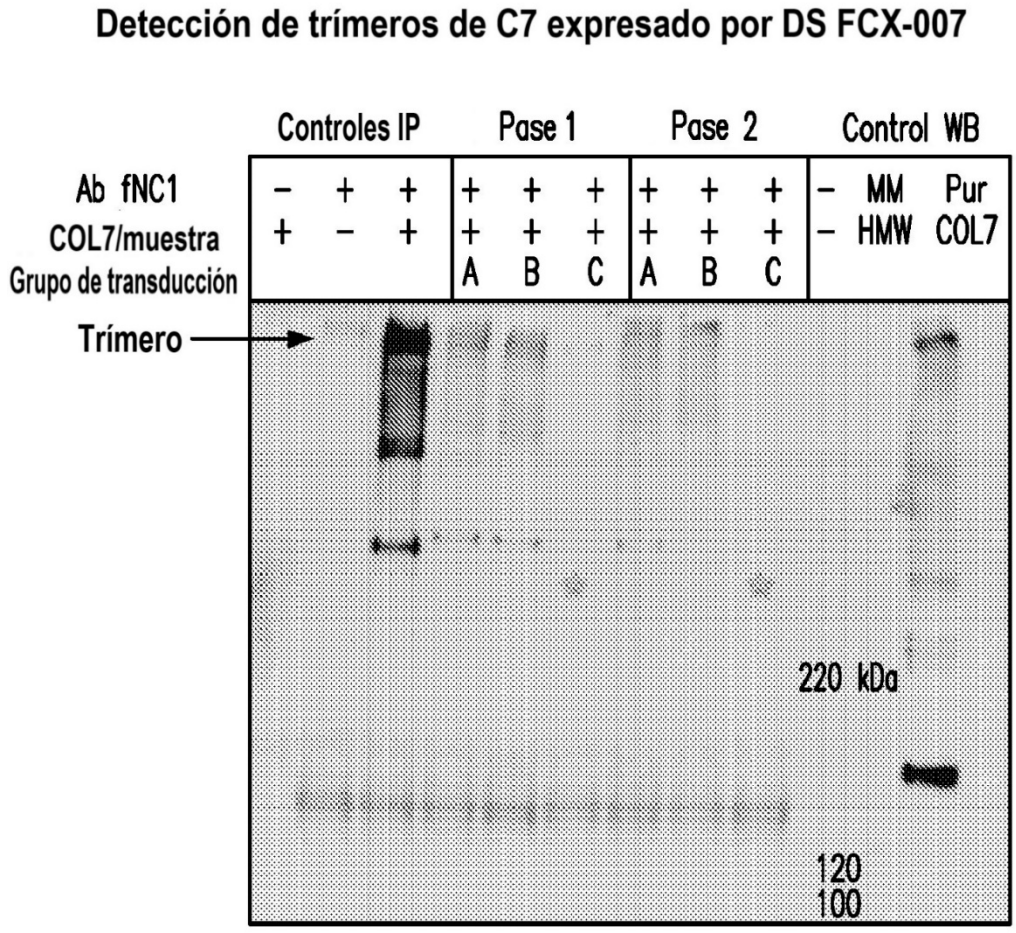

Detección de trímeros de C7 expresado por DS FCX-007
Controles IP
Pase 1
Pase 2
Control WB
Ab fNC1
COL7/muestra
Grupo de transducción
Trímero
MM
HMW
Pur
COL7
220 kDa
120
100

FIG. 19

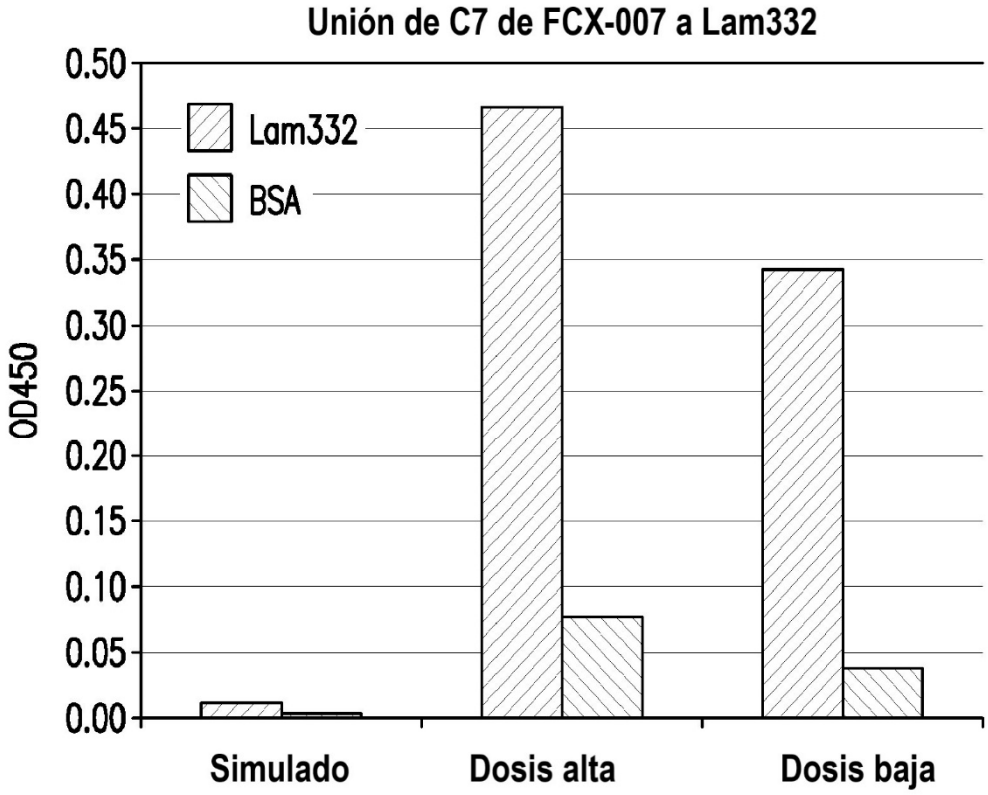

Unión de C7 de FCX-007 a Lam332
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
OD450
Lam332
BSA
Simulado
Dosis alta
Dosis baja

FIG. 20

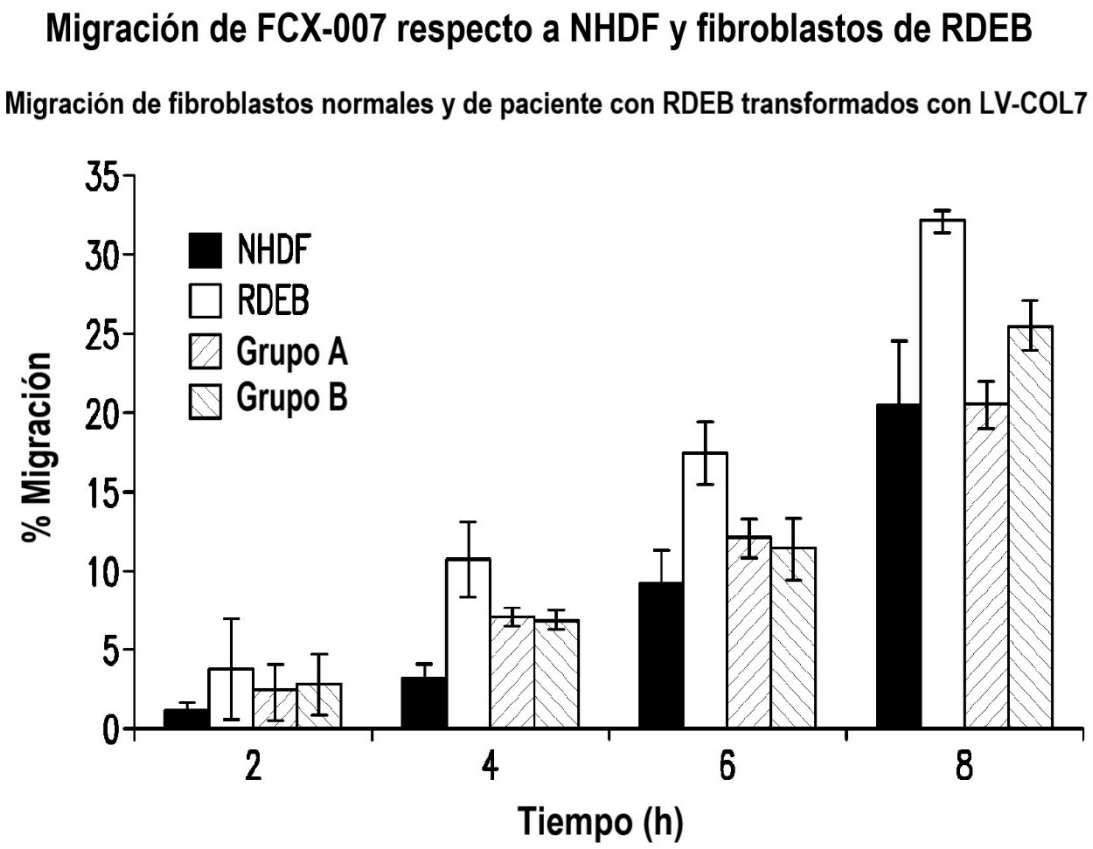


FIG. 21A

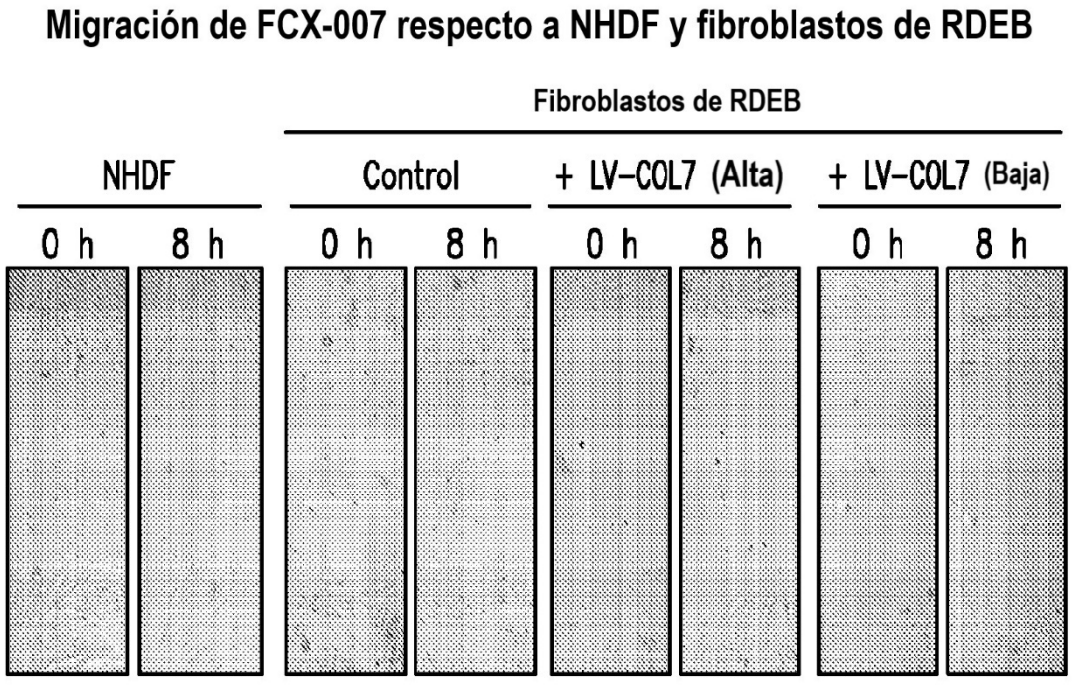


FIG. 21B

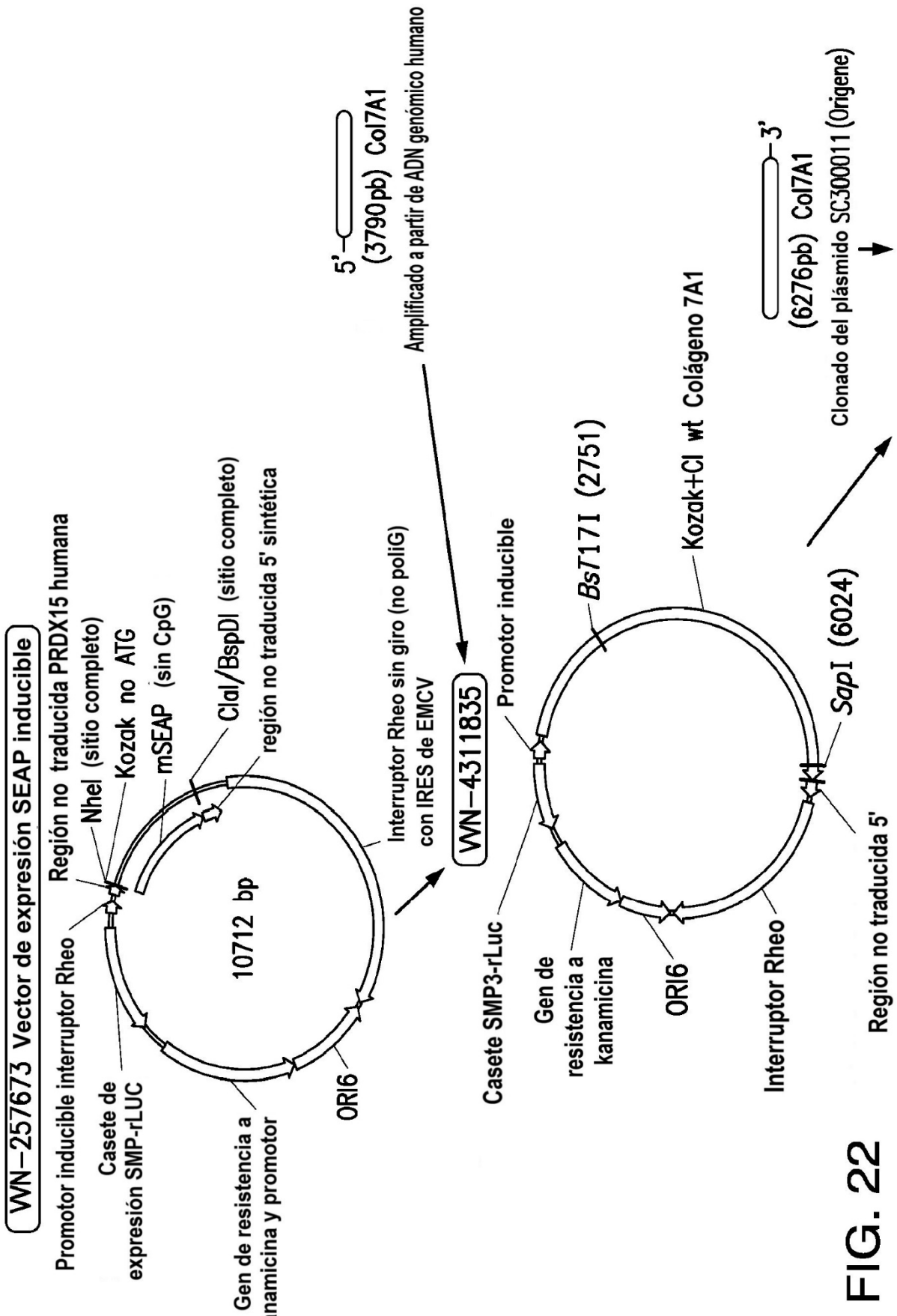

WN−257673 Vector de expresión SEAP inducible
Promotor inducible interruptor Rheo
Región no traducida PRDX15 humana
NheI (sitio completo)
Kozak no ATG
mSEAP (sin CpG)
ClaI/BspDI (sitio completo)
región no traducida 5' sintética
Casete de expresión SMP-rLUC
Gen de resistencia a kanamicina y promotor
ORI6
10712 bp
Interruptor Rheo sin giro (no poliG) con IRES de EMCV
5'
(3790pb) Col7A1
Amplificado a partir de ADN genómico humano
WN−4311835
Promotor inducible
Casete SMP3-rLuc
Gen de resistencia a kanamicina
ORI6
Interruptor Rheo
Región no traducida 5'
Bs7171 (2751)
Kozak+Cl wt Colágeno 7A1
SapI (6024)
3'
(6276pb) Col7A1
Clonado del plásmido SC300011 (Origene)

FIG. 22

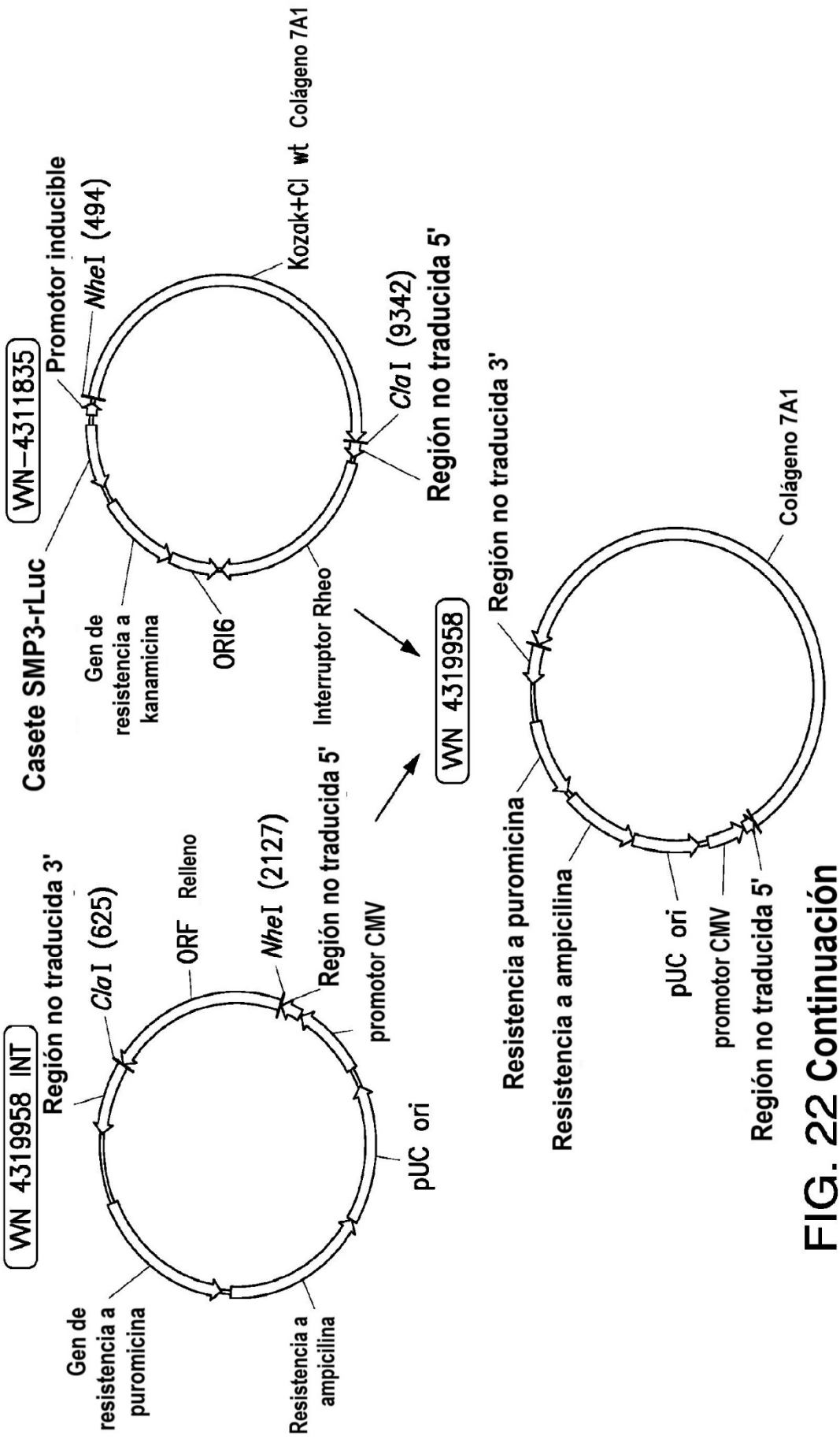


FIG. 22 Continuación

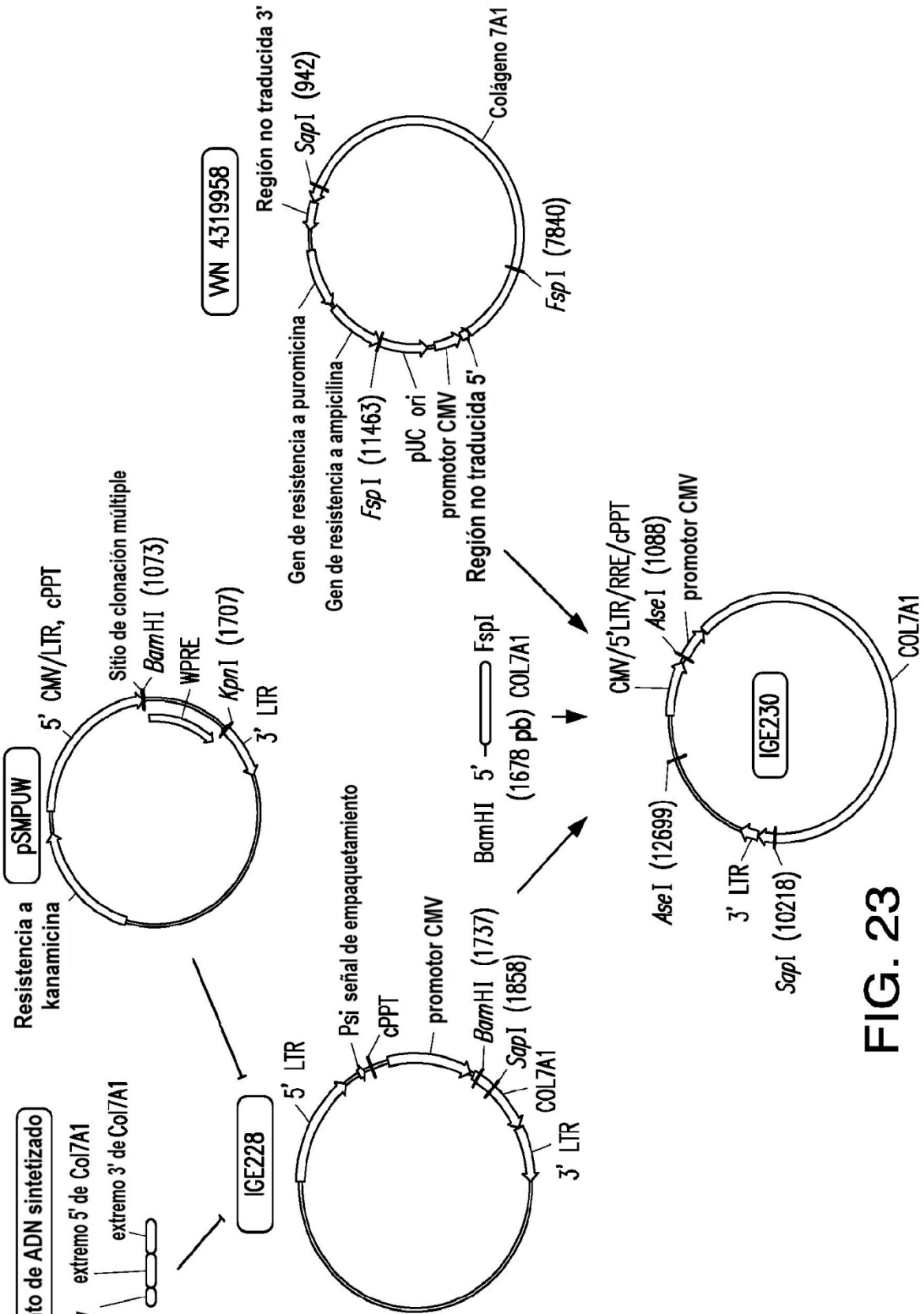

Fragmento de ADN sintetizado
promotor CMV
extremo 5' de Col7A1
extremo 3' de Col7A1
IGE228
5' LTR
Psi señal de empaquetamiento
cPPT
promotor CMV
BamHI (1737)
SapI (1858)
COL7A1
3' LTR
pSMPUW
Resistencia a kanamicina
5' CMV/LTR, cPPT
Sitio de clonación múltiple
BamHI (1073)
WPRE
KpnI (1707)
3' LTR
BamHI 5'
FspI
(1678 pb) COL7A1
VN 4319958
Gen de resistencia a puromicina
Gen de resistencia a ampicilina
FspI (11463)
pUC ori
promotor CMV
Región no traducida 5'
Región no traducida 3'
SapI (942)
Colágeno 7A1
FspI (7840)
CMV/5'LTR/RRE/cPPT
AseI (1088)
promotor CMV
IGE230
COL7A1
AseI (12699)
3' LTR
SapI (10218)

FIG. 23

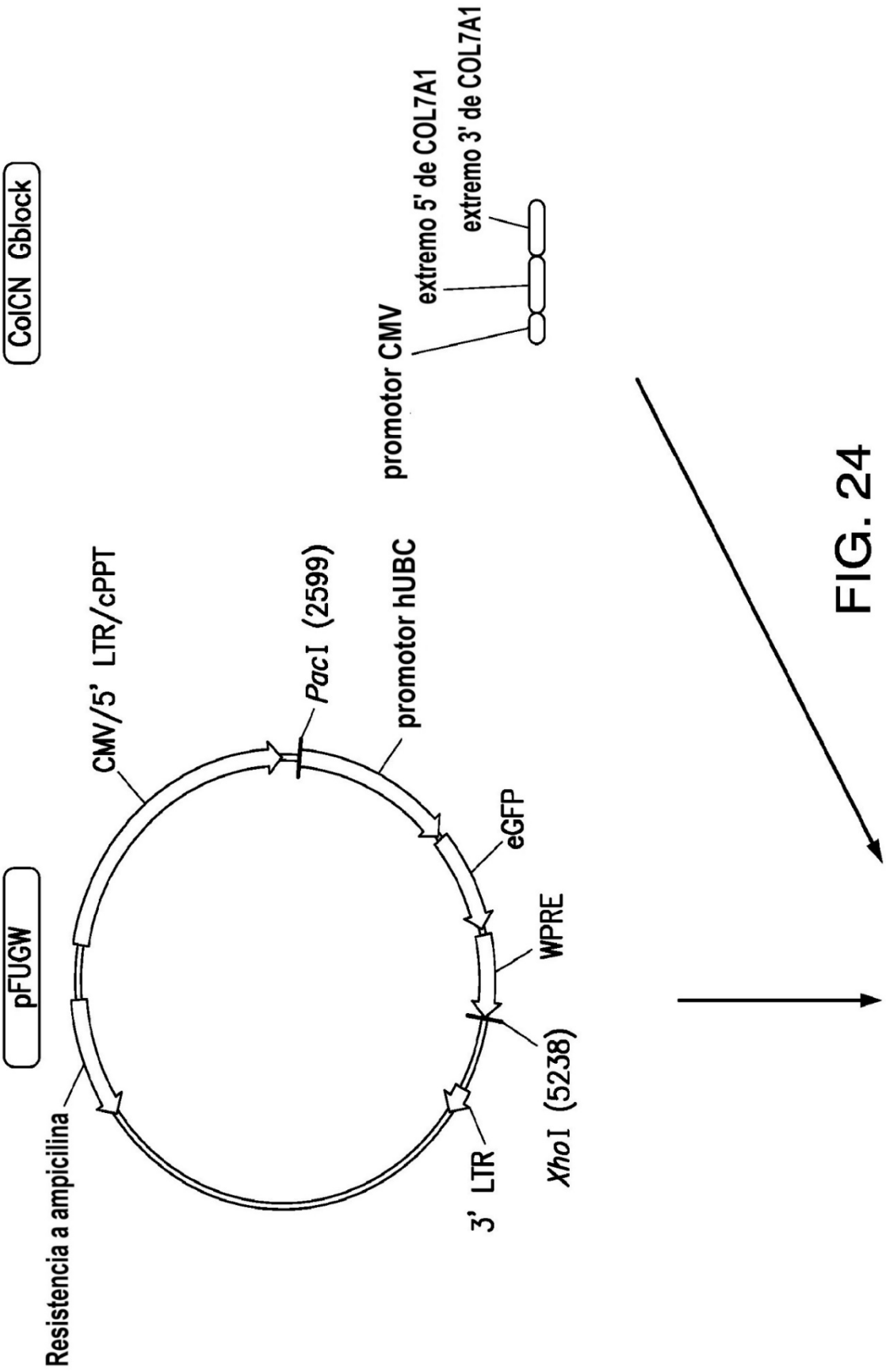

ColCN Gblock
promotor CMV
extremo 5' de COL7A1
extremo 3' de COL7A1
pFUGW
CMV/5' LTR/cPPT
PacI (2599)
promotor hUBC
eGFP
WPRE
XhoI (5238)
3' LTR
Resistencia a ampicilina

FIG. 24

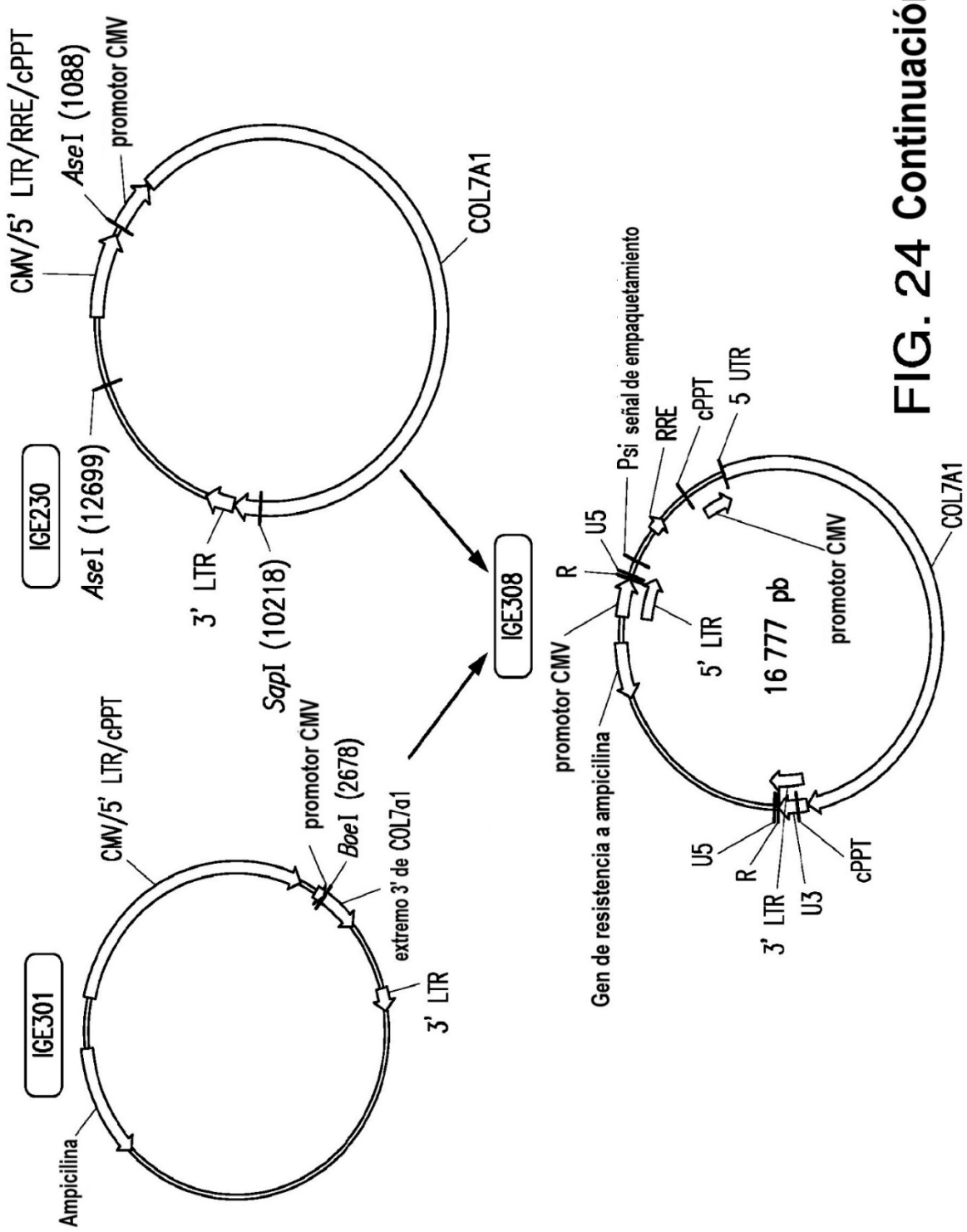


FIG. 24 Continuación

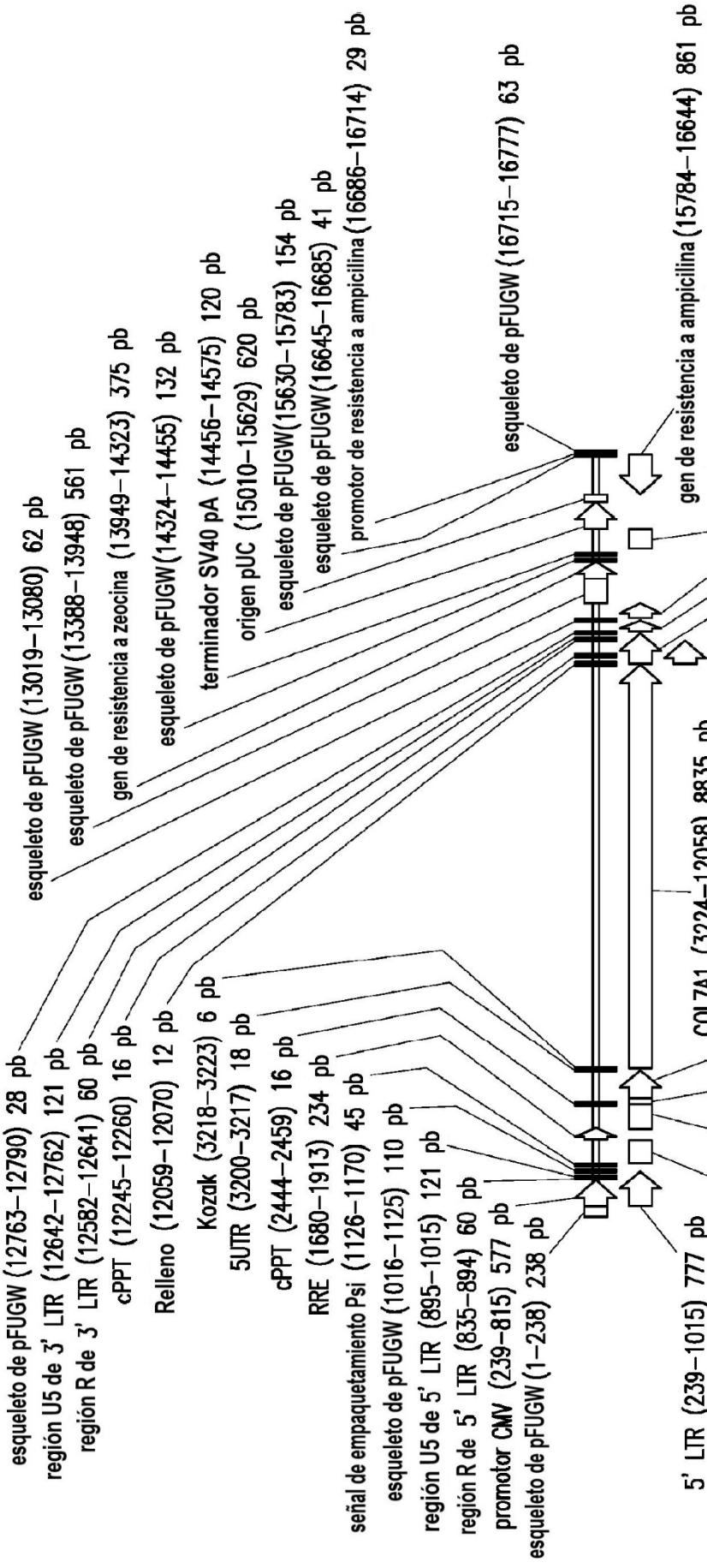

esqueleto de pFUGW (12763–12790) 28 pb
región U5 de 3' LTR (12642–12762) 121 pb
región R de 3' LTR (12582–12641) 60 pb
cPPT (12245–12260) 16 pb
Relleno (12059–12070) 12 pb
Kozak (3218–3223) 6 pb
5UTR (3200–3217) 18 pb
cPPT (2444–2459) 16 pb
RRE (1680–1913) 234 pb
señal de empaquetamiento Psi (1126–1170) 45 pb
esqueleto de pFUGW (1016–1125) 110 pb
región U5 de 5' LTR (895–1015) 121 pb
región R de 5' LTR (835–894) 60 pb
promotor CMV (239–815) 577 pb
esqueleto de pFUGW (1–238) 238 pb
5' LTR (239–1015) 777 pb
esqueleto de pFUGW (1171–1679) 509 pb
esqueleto de pFUGW (1914–2442) 529 pb
esqueleto de pFUGW (2460–2601) 142 pb
promotor CMV (2602–3199) 598 pb
esqueleto de pFUGW (13019–13080) 62 pb
esqueleto de pFUGW (13388–13948) 561 pb
gen de resistencia a zeocina (13949–14323) 375 pb
esqueleto de pFUGW (14324–14455) 132 pb
terminador SV40 pA (14456–14575) 120 pb
origen pUC (15010–15629) 620 pb
esqueleto de pFUGW (15630–15783) 154 pb
esqueleto de pFUGW (16645–16685) 41 pb
promotor de resistencia a ampicilina (16686–16714) 29 pb
esqueleto de pFUGW (16715–16777) 63 pb
COL7A1 (3224–12058) 8835 pb
gen de resistencia a ampicilina (15784–16644) 861 pb
esqueleto de pFUGW (14576–15009) 434 pb
origen F1 (13081–13387) 307 pb
terminador bGHpA (12791–13018) 228 pb
3' LTR (12071–12762) 692 pb
región U3 de 3' LTR (12071–12581) 511 pb

FIG. 25A

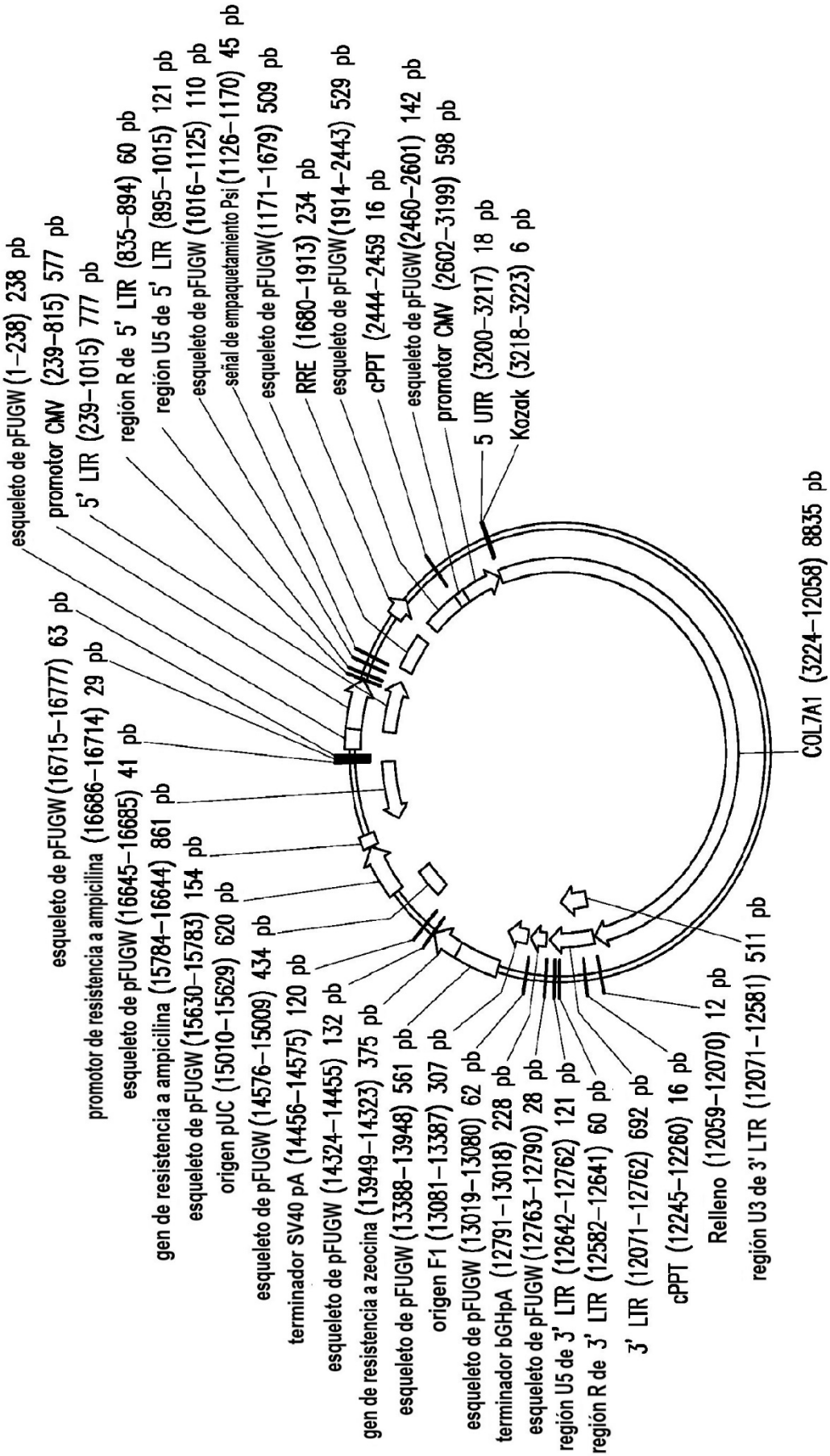

esqueleto de pFUGW (1–238) 238 pb
promotor CMV (239–815) 577 pb
5' LTR (239–1015) 777 pb
región R de 5' LTR (835–894) 60 pb
región U5 de 5' LTR (895–1015) 121 pb
esqueleto de pFUGW (1016–1125) 110 pb
señal de empaquetamiento Psi (1126–1170) 45 pb
esqueleto de pFUGW(1171–1679) 509 pb
RRE (1680–1913) 234 pb
esqueleto de pFUGW(1914–2443) 529 pb
cPPT (2444–2459 16 pb
esqueleto de pFUGW(2460–2601) 142 pb
promotor CMV (2602–3199) 598 pb
5 UTR (3200–3217) 18 pb
Kozak (3218–3223) 6 pb
COL7A1 (3224–12058) 8835 pb
región U3 de 3'LTR (12071–12581) 511 pb
Relleno (12059–12070) 12 pb
cPPT (12245–12260) 16 pb
3' LTR (12071–12762) 692 pb
región R de 3' LTR (12582–12641) 60 pb
región U5 de 3' LTR (12642–12762) 121 pb
esqueleto de pFUGW (12763–12790) 28 pb
terminador bGHpA (12791–13018) 228 pb
esqueleto de pFUGW (13019–13080) 62 pb
origen F1 (13081–13387) 307 pb
esqueleto de pFUGW (13388–13948) 561 pb
gen de resistencia a zeocina (13949–14323) 375 pb
esqueleto de pFUGW (14324–14455) 132 pb
terminador SV40 pA (14456–14575) 120 pb
esqueleto de pFUGW (14576–15009) 434 pb
origen pUC (15010–15629) 620 pb
esqueleto de pFUGW (15630–15783) 154 pb
gen de resistencia a ampicilina (15784–16644) 861 pb
esqueleto de pFUGW (16645–16685) 41 pb
promotor de resistencia a ampicilina (16686–16714) 29 pb
esqueleto de pFUGW (16715–16777) 63 pb

FIG. 25B

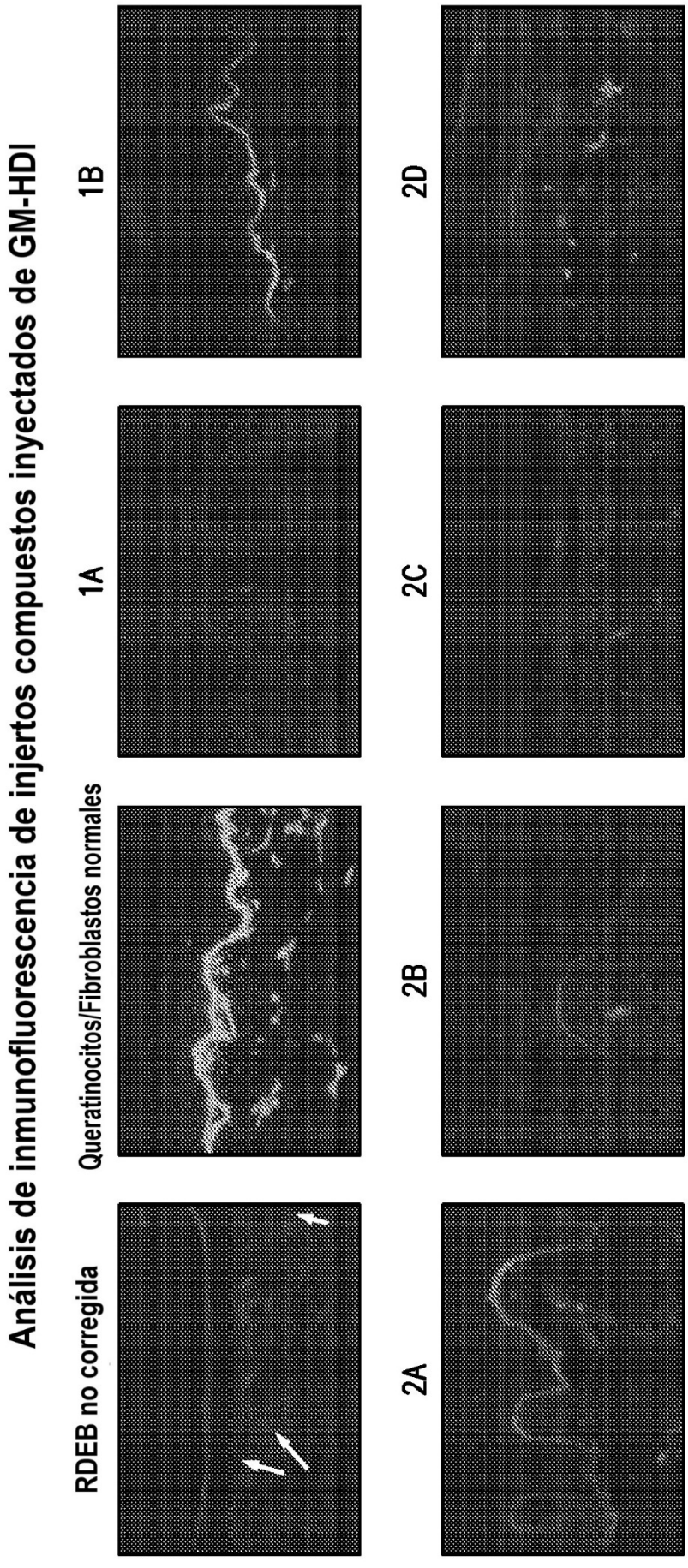

Análisis de inmunofluorescencia de injertos compuestos inyectados de GM-HDI
RDEB no corregida
Queratinocitos/Fibroblastos normales
1A
1B
2A
2B
2C
2D

FIG. 26

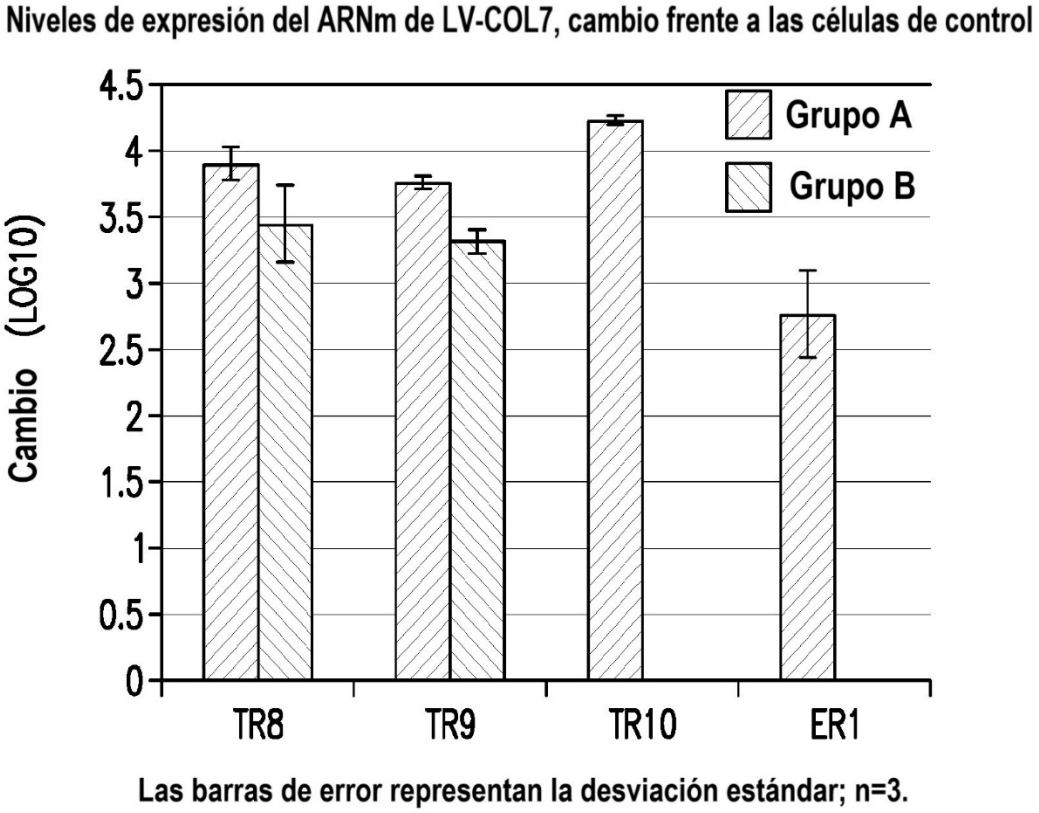

Niveles de expresión del ARNm de LV-COL7, cambio frente a las células de control
Cambio (LOG10)
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Grupo A
Grupo B
TR8
TR9
TR10
ER1
Las barras de error representan la desviación estándar; n=3.

FIG. 27

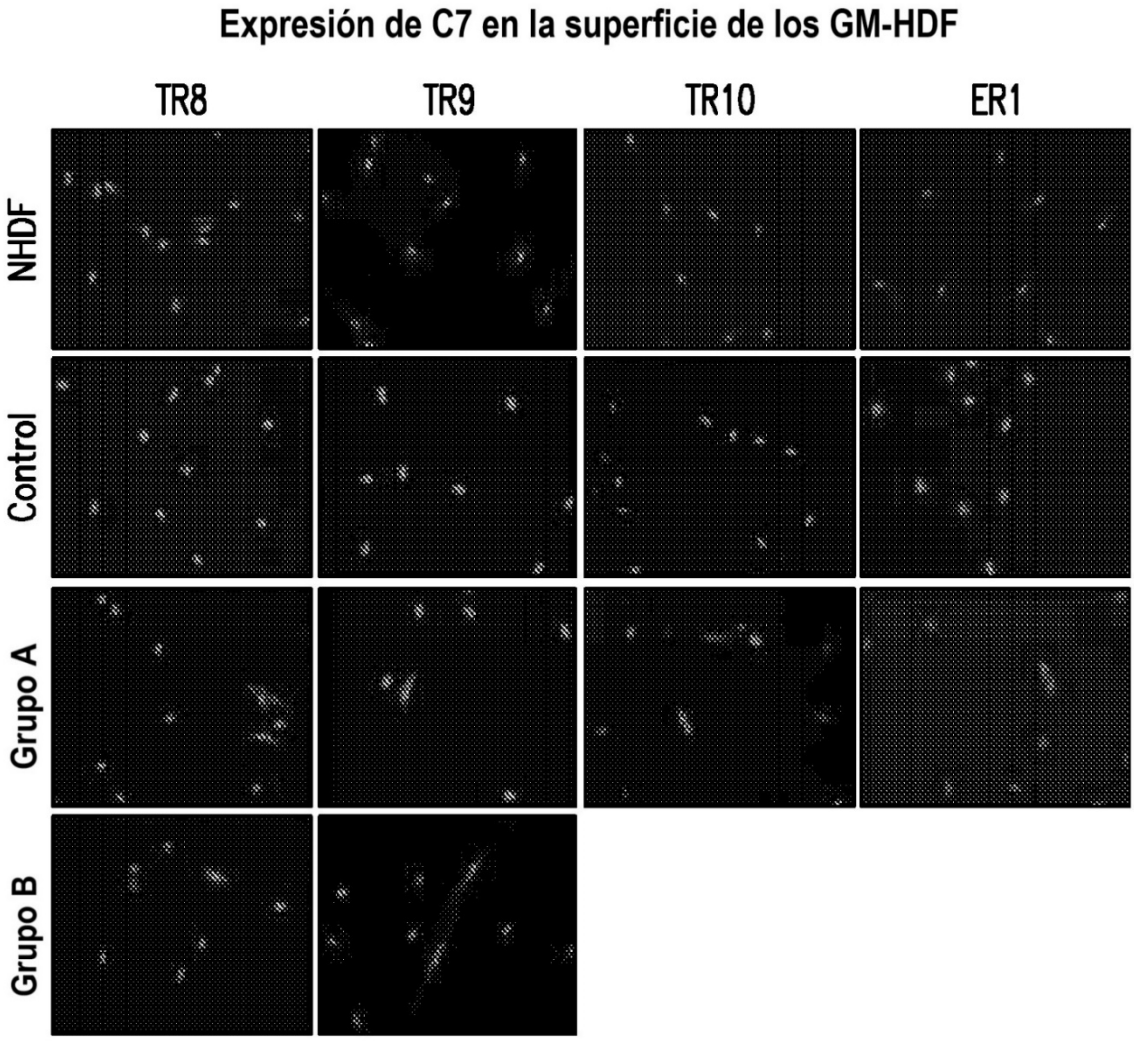

Expresión de C7 en la superficie de los GM-HDF
TR8
TR9
TR10
ER1
NHDF
Control
Grupo A
Grupo B

FIG. 28

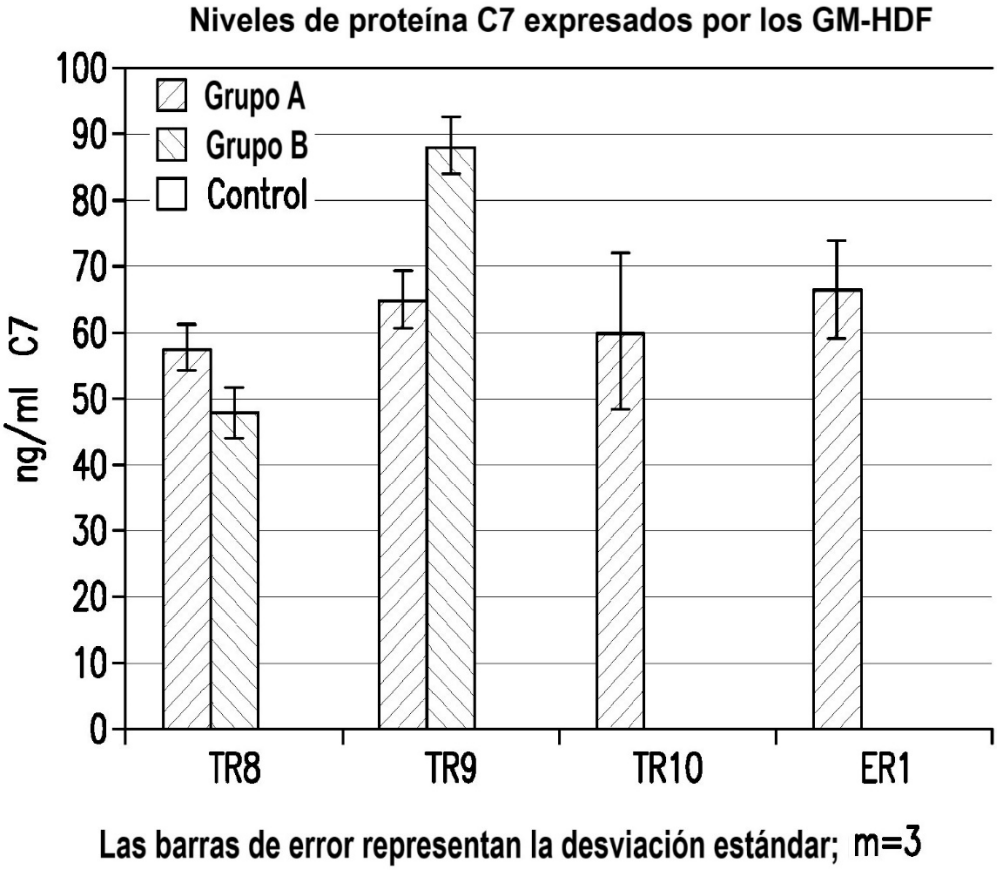

Niveles de proteína C7 expresados por los GM-HDF
Grupo A
Grupo B
Control
ng/ml C7
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
TR8
TR9
TR10
ER1
Las barras de error representan la desviación estándar; m=3

FIG. 29

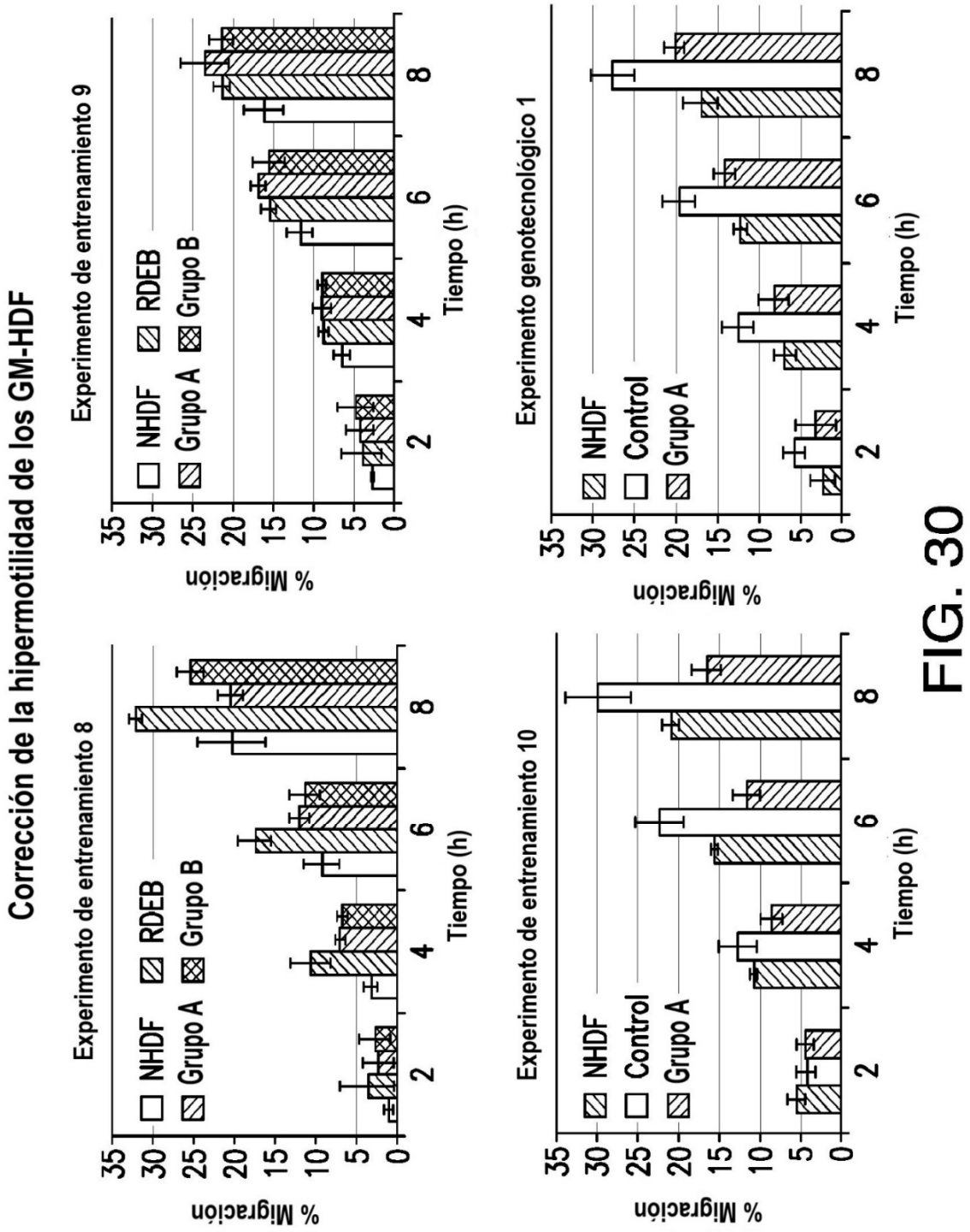

Corrección de la hipermotilidad de los GM-HDF
Experimento de entrenamiento 8
NHDF
RDEB
Grupo A
Grupo B
% Migración
Tiempo (h)
Experimento de entrenamiento 9
NHDF
RDEB
Grupo A
Grupo B
% Migración
Tiempo (h)
Experimento de entrenamiento 10
NHDF
Control
Grupo A
% Migración
Tiempo (h)
Experimento genotecnológico 1
NHDF
Control
Grupo A
% Migración
Tiempo (h)

FIG. 30

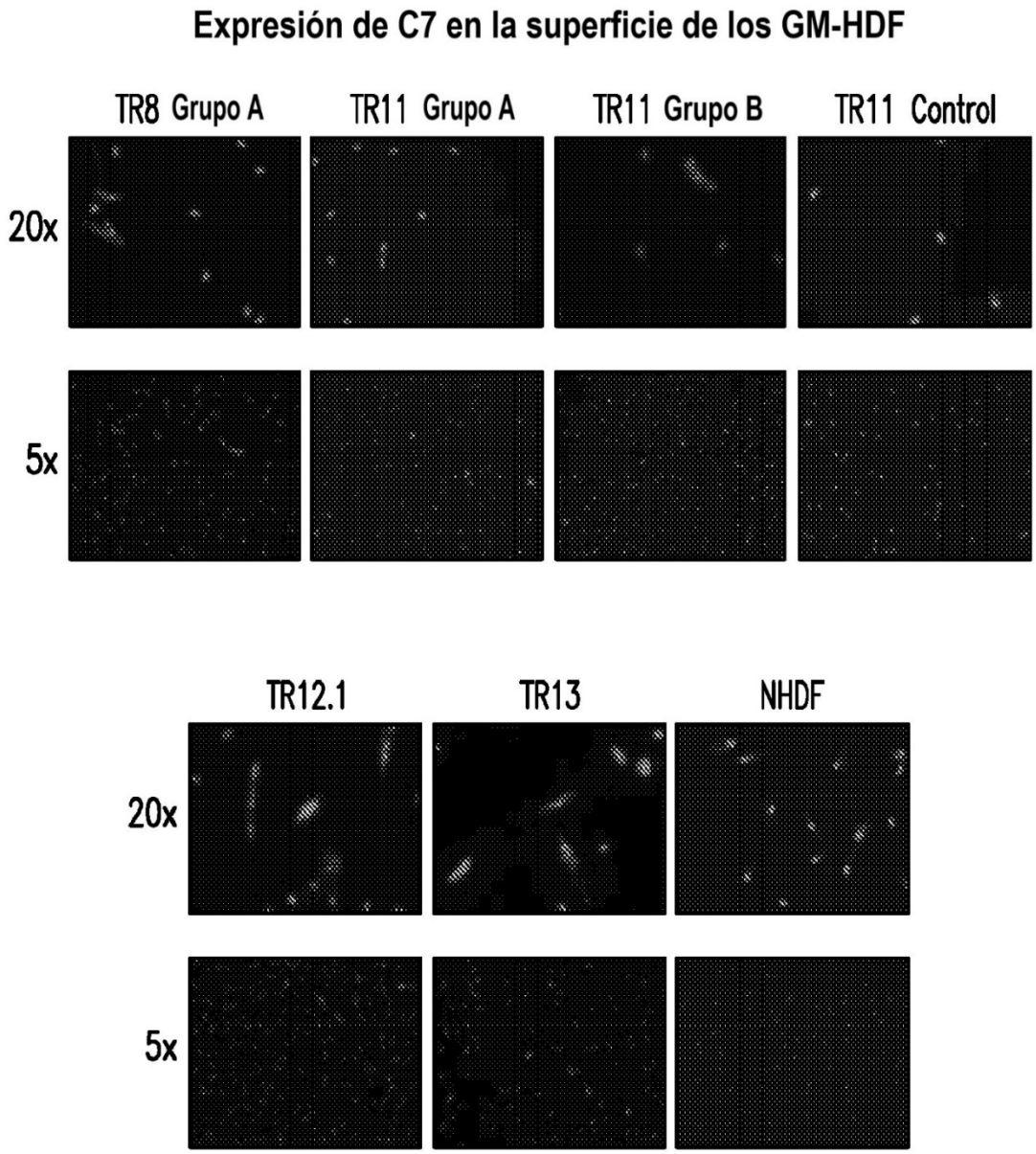

Expresión de C7 en la superficie de los GM-HDF
TR8 Grupo A
TR11 Grupo A
TR11 Grupo B
TR11 Control
20x
5x
TR12.1
TR13
NHDF
20x
5x

FIG. 31

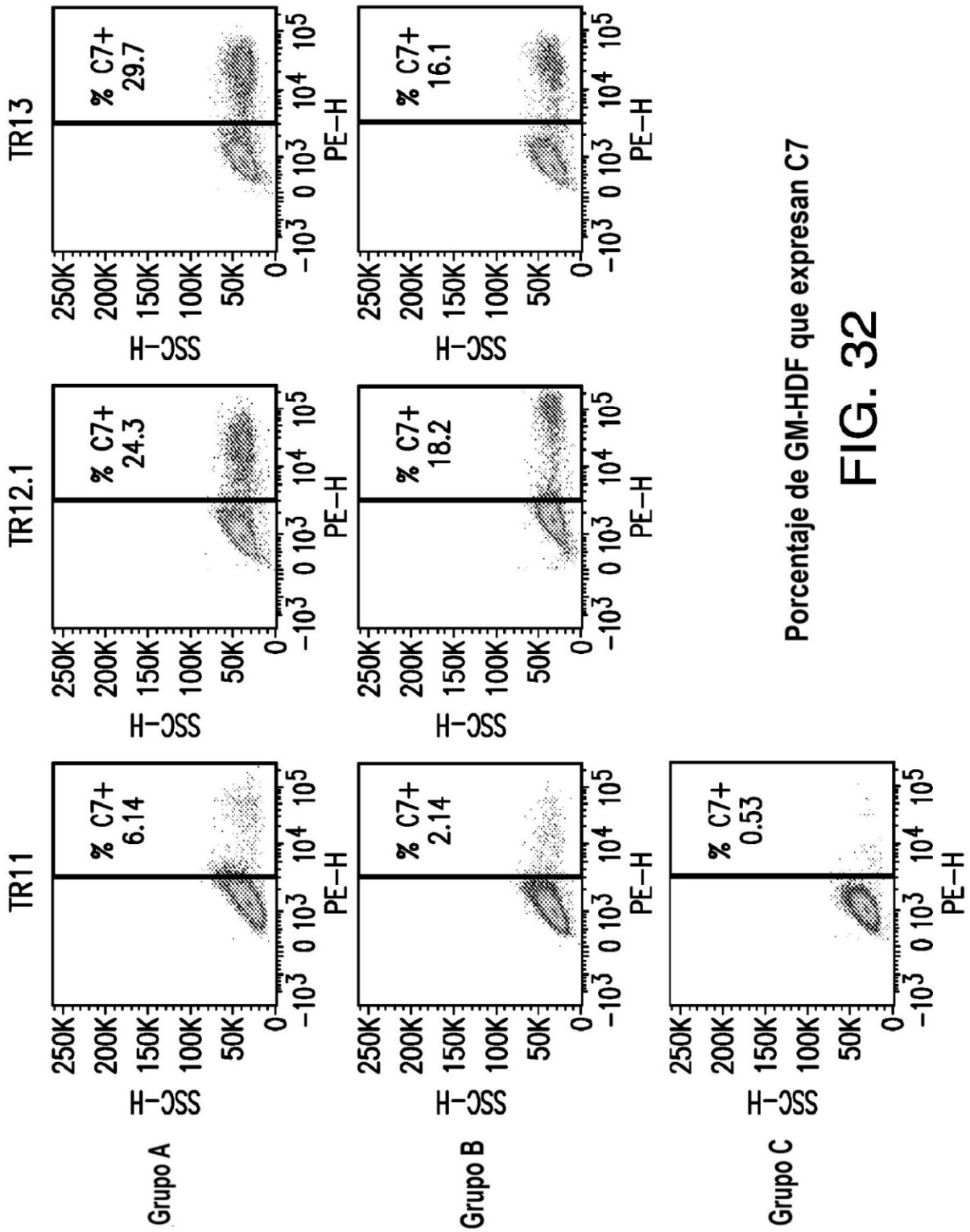

TR11
TR12.1
TR13
% C7+ 6.14
% C7+ 24.3
% C7+ 29.7
% C7+ 2.14
% C7+ 18.2
% C7+ 16.1
% C7+ 0.53
SSC-H
PE-H
250K
200K
150K
100K
50K
0
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
Grupo A
Grupo B
Grupo C
Porcentaje de GM-HDF que expresan C7

FIG. 32

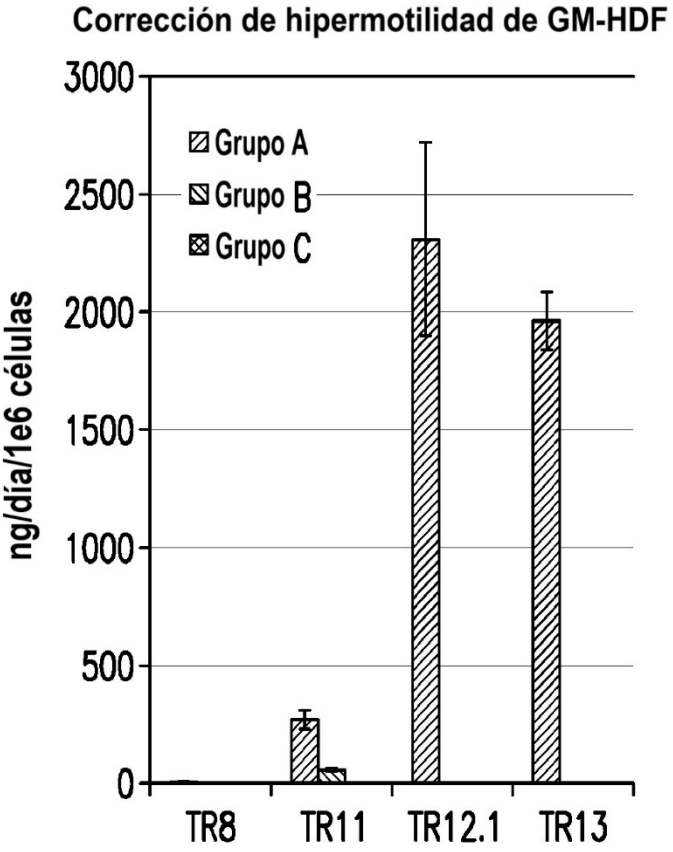

Corrección de hipermotilidad de GM-HDF
ng/día/1e6 células
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Grupo A
Grupo B
Grupo C
TR8
TR11
TR12.1
TR13

FIG. 33

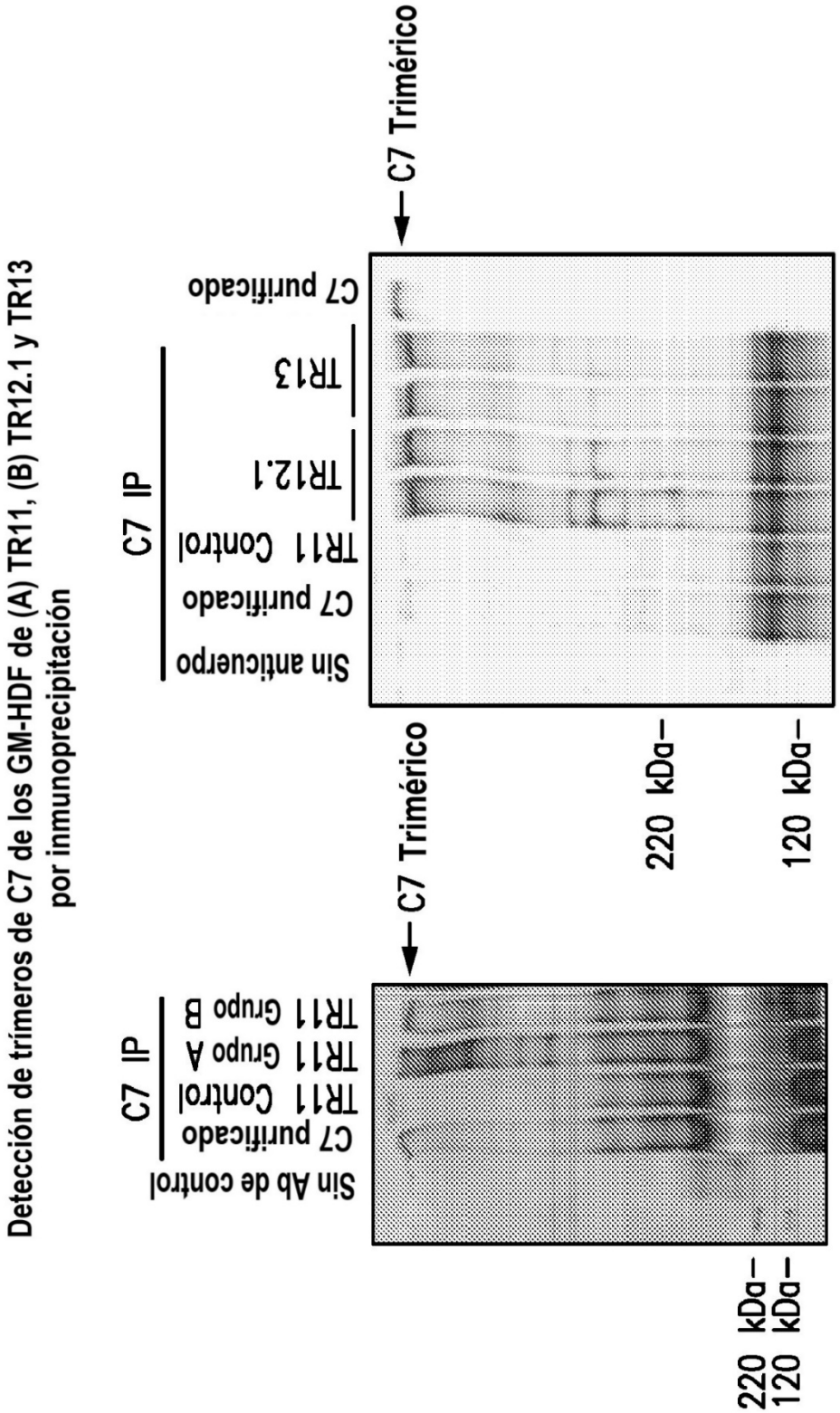

Detección de trímeros de C7 de los GM-HDF de (A) TR11, (B) TR12.1 y TR13 por inmunoprecipitación
C7 IP
Sin Ab de control
C7 purificado
TR11 Control
TR11 Grupo A
TR11 Grupo B
C7 Trimérico
220 kDa–
120 kDa–
C7 IP
Sin anticuerpo
C7 purificado
TR11 Control
TR12.1
TR13
C7 purificado
C7 Trimérico
220 kDa–
120 kDa–

FIG. 34

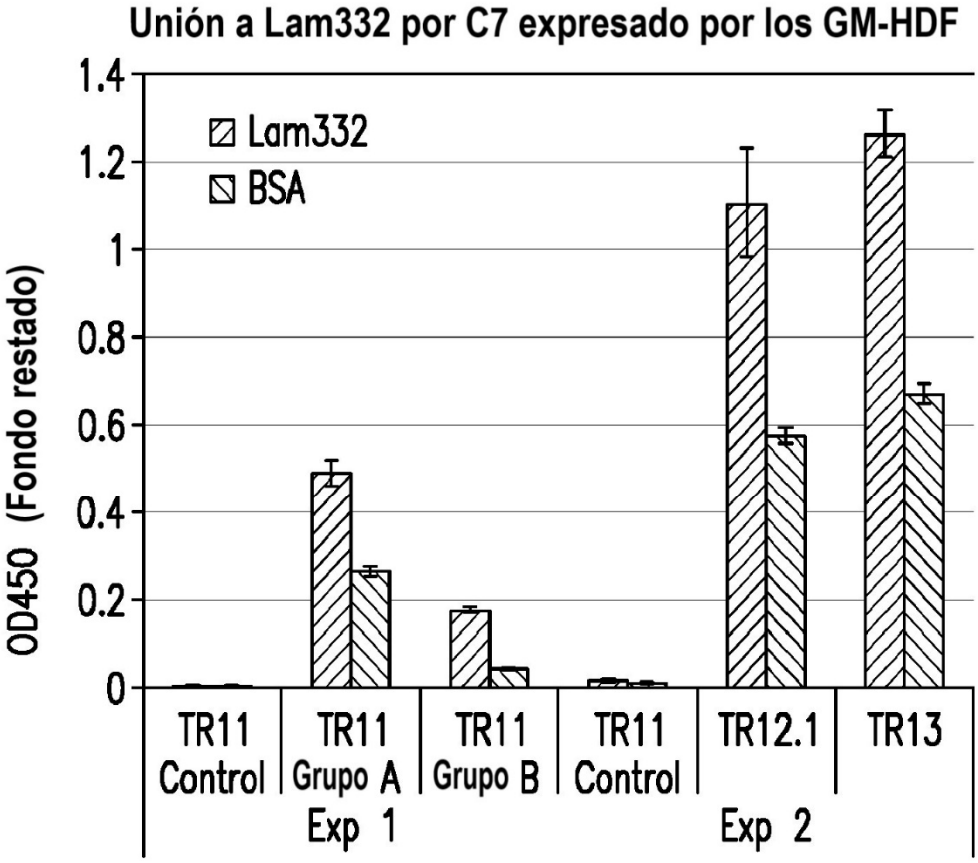

Unión a Lam332 por C7 expresado por los GM-HDF
OD450 (Fondo restado)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Lam332
BSA
TR11 Control
TR11 Grupo A
TR11 Grupo B
TR11 Control
TR12.1
TR13
Exp 1
Exp 2

FIG. 35

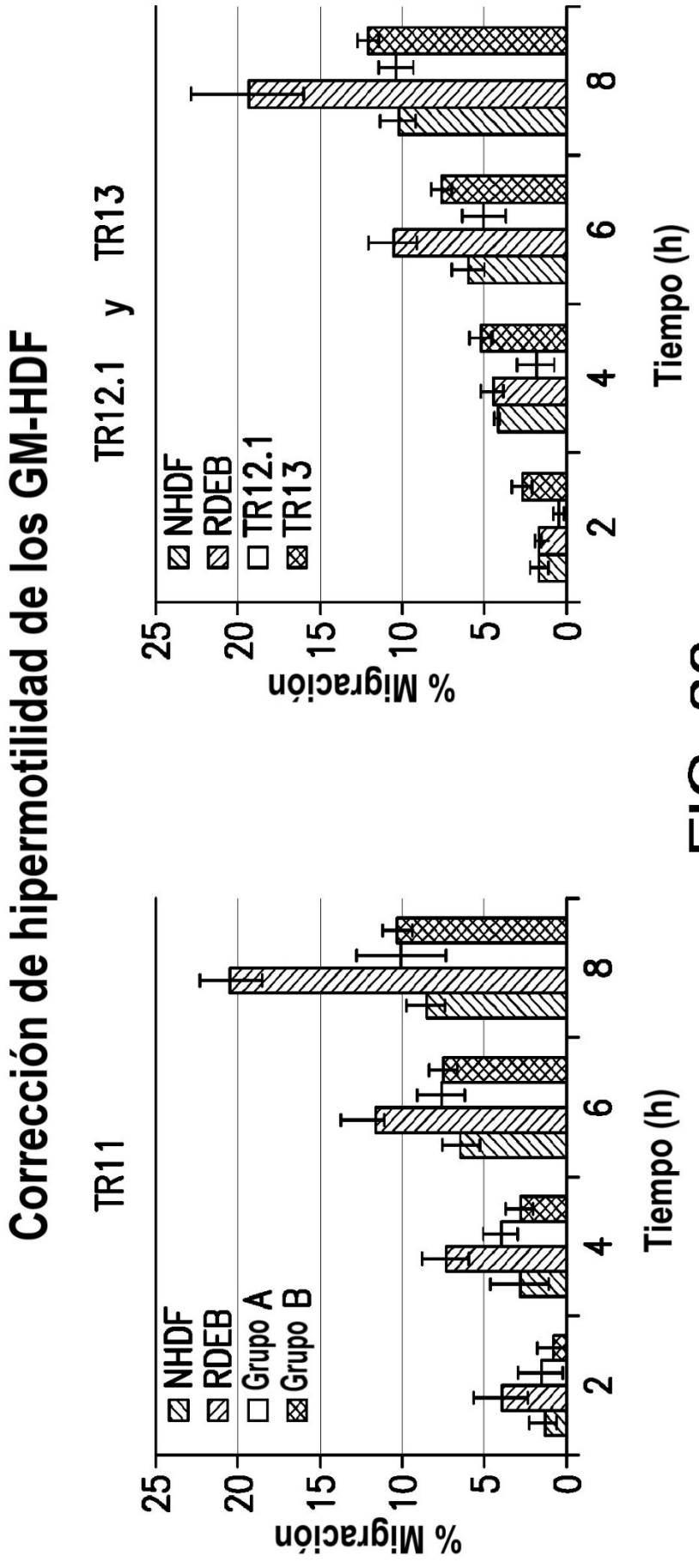

Corrección de hipermotilidad de los GM-HDF
TR11
NHDF
RDEB
Grupo A
Grupo B
% Migración
Tiempo (h)
TR12.1 y TR13
NHDF
RDEB
TR12.1
TR13
% Migración
Tiempo (h)

FIG. 36