



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 764 471**

⑮ Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2015 PCT/US2015/016057**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015 WO15123642**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2015 E 15749056 (6)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3105335**

④ Título: **Receptores de antígeno químérico y procedimientos de fabricación**

⑩ Prioridad:

14.02.2014 US 201461940339 P

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2020

⑦ Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
210 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

⑦ Inventor/es:

**COOPER, LAURENCE J.N.;
KORNGOLD, ANA BEATRIZ;
RABINOVICH, BRIAN A.;
SINGH, HARJEET y
OLIVARES, SIMON**

⑦ Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 764 471 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptores de antígeno químérico y procedimientos de fabricación

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de la biología molecular y la medicina. Más particularmente, se refiere a procedimientos para generar receptores de antígeno químérico (CAR).

10 Descripción de la técnica relacionada

La transferencia de células T adoptivas es una estrategia terapéutica prometedora que puede usarse para el tratamiento del cáncer. La transferencia de células T adoptivas implica aislar y expandir las células T específicas de antígeno que pueden matar selectivamente las células tumorales. Generalmente, las células T se eliminan de un sujeto 15 y se cultivan *in vitro*. Se puede introducir un receptor de antígeno químérico (CAR) en una célula T *in vitro* para dirigir la célula T, una vez reintroducida en el sujeto, para matar selectivamente las células tumorales en función de la expresión de un antígeno (*por ejemplo*, Wieczorek *et al.* 2013; Baya *et al.* 2013).

Un problema asociado con la transferencia adoptiva de células T es que existe una variabilidad significativa entre las 20 cuales CAR puede funcionar de manera más efectiva en ciertas poblaciones de pacientes, *por ejemplo*, para tratar un cáncer específico. Debido a la gran cantidad de CAR diferentes posibles que podrían generarse y que podrían exhibir actividad terapéutica contra un cáncer, actualmente es muy difícil para los médicos anticipar qué CAR puede mostrar actividad terapéutica contra un cáncer o subtipo de cáncer dado. Debido al importante potencial terapéutico de la transferencia de células T adoptivas, existe una clara necesidad de procedimientos mejorados para identificar y 25 generar nuevos CAR.

El documento US 2013/0266551 describe un CAR que contiene una señal co-estimuladora mediante la incorporación del dominio de señalización del receptor 4-1BB.

30 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención es tal y como se define en las reivindicaciones.

La presente descripción proporciona, en algunos aspectos, procedimientos para la generación de CAR. En algunos 35 aspectos, se proporcionan procedimientos para la generación de un gran número de CAR que se pueden evaluar para detectar actividad contra un cáncer o subtipo de cáncer en particular; de esta manera, se puede generar e identificar CAR que puede exhibir un potencial terapéutico mejorado contra un cáncer o subtipo de cáncer en particular. La presente invención proporciona CAR específicos. El CAR proporcionado en esta invención puede administrarse terapéuticamente a un sujeto o paciente humano, *por ejemplo*, para tratar un cáncer.

40 Los datos clínicos demuestran que un diseño particular de receptor de antígeno químérico (CAR) dirigido a las células T a un antígeno asociado a tumor dado (TAA) puede tener un potencial terapéutico variable en diferentes pacientes. Por ejemplo, los CAR específicos de CD19 de segunda generación activados a través de CD28/CD3zeta químérico o CD137/CD3-zeta pueden exhibir respuestas clínicas superiores cuando se administran células T genéticamente 45 modificadas autólogas a pacientes con leucemia de linaje B aguda, en lugar de crónica. Para abordar este problema, se describen en esta invención procedimientos para generar especies de CAR que pueden exhibir un efecto anti-tumoral mejorado para un tumor dado.

Por ejemplo, en esta invención se describen procedimientos que pueden usarse para generar y detectar una gran 50 cantidad de CAR para su capacidad para tratar un cáncer de un paciente dado; de esta manera, los procedimientos pueden usarse para personalizar una terapia para un paciente y seleccionar un CAR particular que muestre un potencial terapéutico mejorado para un paciente particular o un subconjunto de pacientes con un cáncer particular. Una estrategia clínica para la terapia génica puede utilizar la transferencia electrónica de plásmidos de ADN del sistema de transposón Sleeping Beauty (SB) (bella durmiente), *por ejemplo*, para reducir el coste y la complejidad de 55 fabricar diseños de CAR individuales para pequeños subconjuntos de pacientes. Estos procedimientos para personalizar las células T CAR + pueden utilizar la generación de una gran cantidad de moléculas CAR que se pueden examinar y evaluar su capacidad para beneficiar a un paciente determinado

En algunos aspectos, se describen procedimientos para el ensamblaje de alto rendimiento de moléculas CAR 60 utilizando un sistema de recombinación específico de sitio triple (también denominado Plataforma "EZ-CAR"). En algunas realizaciones, estos procedimientos pueden permitir la combinación rápida de 3 componentes de un CAR prototípico a partir de (i) el fragmento variable de cadena única (scFv) que define la especificidad, (ii) el

andamio/bisagra que agrega el scFv desde la superficie celular, y (iii) uno o más dominios de señalización intracelular. Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos a continuación, se generó un CAR específico de CD19 que se activa a través de CD28/CD3-zeta quimérico utilizando la plataforma EZ CAR en paralelo con células T CD + CD19RCD28mζ de grado clínico (CG CAR).

5

En algunas realizaciones, un CAR proporcionado en esta invención o generado por procedimientos según la presente descripción puede co-expresarse en una célula T con una IL-15 unida a membrana. De esta manera, la célula T puede sobrevivir o existir en un estado inactivo sin proliferación significativa. *in vitro* o *en vivo*. En contraste, como se describió anteriormente, las células T que expresan CAR morirán típicamente cuando se retiren las citocinas *in vitro* y esta muerte celular puede servir como una característica de seguridad en ciertos casos cuando las células T se administran clínicamente. La proliferación de células T se mide típicamente usando un ensayo de células autónomas. Por lo tanto, en contraste con ciertos CAR previamente identificados, donde las células T no pueden persistir *in vitro* sin estimulación antigénica, se proporcionan en esta invención CAR que pueden inducir citotoxicidad sin crecimiento autónomo *in vitro*. Dependiendo de la realización particular deseada, un CAR producido por los procedimientos de la presente descripción o proporcionado en esta invención puede expresarse en una célula T con o sin co-expresión en la célula T de una IL-15 unida a membrana.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a una composición que comprende: (a) una pluralidad de primeros vectores que codifican uno o más dominios de unión a antígeno distintos; (b) una pluralidad de segundos vectores que codifican uno o más dominios de bisagra distintos; y (c) una pluralidad de terceros vectores que codifican uno o más endodominiós distintos; donde al menos dos de los primeros, segundos y terceros vectores comprenden una pluralidad de dos o más vectores que codifican dominios de unión a antígeno distintos, dominios de bisagra y/o endodominiós, respectivamente, y además donde los vectores comprenden sitios para recombinación homóloga para permitir la generación de un cuarto vector que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR).

25

En la presente invención, como se usa en referencia a dominios de proteínas y polipéptidos tales como dominios de unión a antígeno, dominios de bisagra, dominios transmembrana y endodominiós, el término “distinto” significa dominios que tienen, que comprenden o que consisten en diferentes secuencias de polipéptidos (aminoácidos). Por ejemplo, dos dominios de unión a antígeno “distintos” pueden unirse al mismo antígeno (de hecho, incluso el mismo epítopo en ese antígeno); sin embargo, los dominios de unión a antígeno son “distintos” si sus composiciones de aminoácidos secuenciales difieren entre sí. Asimismo, dos dominios de unión a antígeno “distintos”, que difieren en la composición secuencial de aminoácidos, también pueden unirse específicamente a diferentes antígenos y epítopos. A la inversa, como se usa en esta invención, dos moléculas (polipéptidos) de secuencia de aminoácidos idéntica no son polipéptidos “distintos”.

35

En algunas realizaciones, la pluralidad de primeros vectores codifica una pluralidad de dominios de unión a antígeno distintos, la pluralidad de segundos vectores codifica un dominio bisagra, y la pluralidad de terceros vectores codifica una pluralidad de endodominiós distintos. En algunas realizaciones, la pluralidad de primeros vectores codifica una pluralidad de dominios de unión a antígeno distintos, la pluralidad de segundos vectores codifica una pluralidad de dominios de bisagra distintos, y la pluralidad de terceros vectores codifica un endodominió. En algunas realizaciones, la pluralidad de primeros vectores codifica un dominio de unión a antígeno, la pluralidad de segundos vectores codifica una pluralidad de dominios de bisagra distintos, y la pluralidad de terceros vectores codifica una pluralidad de endodominiós distintos. En algunas realizaciones, los dominios de unión a antígeno comprenden o consisten en scFv. Los terceros vectores pueden codificar un dominio transmembrana. Los segundos vectores pueden codificar un dominio transmembrana. En algunas realizaciones, la composición comprende además una pluralidad de quintos vectores que codifican uno o más dominios transmembrana; donde los primeros vectores, los segundos vectores, los terceros vectores y los quintos vectores comprenden sitios para la recombinación homóloga para generar un cuarto vector que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR). El primer vector puede comprender una primera secuencia y un segundo sitio de recombinación homóloga. El segundo vector puede comprender la segunda secuencia de recombinación homóloga y una tercera secuencia de recombinación homóloga. El tercer vector puede comprender la tercera secuencia de recombinación homóloga y una cuarta secuencia de recombinación homóloga. El tercer vector puede comprender la tercera secuencia de recombinación homóloga y una cuarta secuencia de recombinación homóloga. El cuarto vector comprende la primera secuencia de recombinación homóloga y la cuarta secuencia de recombinación homóloga. El primer vector, el segundo vector y/o el tercer vector pueden codificar una transposasa. La transposasa puede ser una transposasa de tipo salmónide (SB). En algunas realizaciones, 1, 2, 3, 4, o todo el primer vector, el segundo vector, el tercer vector, el cuarto vector y/o el quinto vector es un vector de transposición de Bella Durmiente (SB) o *piggyBac*. Alternativamente, en algunas realizaciones, el primer vector, el segundo vector, el tercer vector, el cuarto vector y/o el quinto vector no es un vector de transposición de Bella Durmiente (SB) o *piggyBac*; por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede generar un CAR sin usar un vector de Bella Durmiente (SB) o *piggyBac* y, a continuación, el CAR puede

insertarse posteriormente en un vector adecuado para transfectar células T (*por ejemplo*, insertado en un vector de la Bella Durmiente (SB) como se describe, *por ejemplo*, en Singh y col. 2015). Sin embargo, en algunas realizaciones, generar un CAR ya presente en un vector que sea adecuado para transfectar células T puede simplemente el proceso o reducir el número de etapas necesarias para generar un CAR y transfectar una célula T. Los distintos dominios de unión a antígeno pueden unirse selectivamente a diferentes antígenos. En algunas realizaciones, los dominios de unión a antígeno distintos se unen selectivamente al mismo antígeno. El dominio de unión a antígeno puede unirse selectivamente a CD19, antígeno universal (ratón), HER-3, GD2, Gp75, proteína CS1, mesotelina, fosfatidilserina, cMyc, CD22, CD4, CD44v6, CD45, CD28, CD3, CD3e, CD123, CD138, CD52, CD56, CD74, CD30, Gp75, CD38, CD33, CD20, fusión Her1/HER3, GD2, un carbohidrato, *Aspergilo*, ROR1, c-MET, EGFR, Dectin, Ebola, un hongo, 5 GP, HERV-K (HERVK), NY-ESO-1, VEGF-R2, TGF-b2R, IgG4, Biotina u O-AcGD2. Los dominios de unión a antígeno distintos pueden consistir o comprender scFv. La región de bisagra puede consistir o comprender el péptido 12 AA (GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCT; SEQ ID NO: 1), péptido t-20 AA, IgG4 Fc Δ EQ, IgG4 Fc Δ Q, (t-12AA + t-20AA), mKate, phiLov, dsRed, Venus, eGFP, CH3 HA, (CD8 α + t-20AA), Double t-20 AA, (t-20AA + CD8α), (CD8α + Leucine Zipper Basep1), (CD8α + Leucine Zipper Acid1), 2D3, CD8 α, o IgG4 Fc. Al menos uno de 10 los endodomelios puede comprender CD3ζ. Al menos uno de los endodomelios puede comprender uno o más dominios ITAM. En algunas realizaciones, al menos uno de los endodomelios comprende (CD28 + CD3ζ), (CD28 + CD27 + CD3ζ), (CD28 + OX40 + CD3ζ), (CD28 + 4-1BB + CD3ζ), (CD28 + CD27 + OX40 + CD3ζ), (CD28 + 4-1 BB + CD27 + CD3ζ), (CD28 + 4-1BB + OX40 + CD3ζ), (4-1BB + CD3ζ), (4-IBB + OX40 + CD3ζ), (4-1BB + CD27 + CD3ζ), (CD27 + CD3ζ), (CD27 + OX 40 + CD3ζ), (CD28Δ + CD3ζ), (CD28Δ + CD27 + CD3ζ), (CD28Δ + OX40 + CD3ζ), 15 (CD28Δ + 4-1BB + CD3ζ), (CD28Δ + 4-1BB + OX40 + CD3ζ), (CD28Δ + CD27 + OX40 + CD3ζ), (CD28Δ + 4-1BB + CD27 + CD3ζ), (4-1BB + ICOS + CD3ζ), (CD28 + ICOS + CD3ζ), (ICOS + CD3ζ), CD3ζ o CD28 solamente. En algunas realizaciones, los CAR pueden ser probados para actividad, *por ejemplo*, utilizando el iQue™ Screener (IntelliCyt, 20 Albuquerque, NM). En algunas realizaciones, los CAR pueden evaluarse para una o más características (*por ejemplo*, viabilidad, regulación ascendente de señales de activación, regulación ascendente de CD25, liberación de citocinas y/o destrucción celular) cuando se expresa en células como las células T utilizando una técnica como, *por ejemplo*, citometría de flujo. 25

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende una colección de vectores que codifican receptores de antígenos químéricos que codifican una pluralidad de dominios de unión a antígeno, dominios 30 de bisagra y endodomelios distintos, siendo aleatorizados los vectores de dicha colección con respecto a dichos dominios.

Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para producir una pluralidad de vectores que codifican cada uno un receptor de antígeno químérico (CAR) que comprende: (i) obtener la composición que 35 comprende una pluralidad de vectores de la presente invención (*por ejemplo*, como se describió anteriormente); y (ii) someter la composición a condiciones suficientes para permitir que los distintos dominios de unión a antígeno, dominios de bisagra y/o endodomelios comprendidos o codificados por dichos vectores se recombinen mediante recombinación homóloga para producir una pluralidad de cuartos vectores, donde cada uno de dichos cuartos vectores codifica un CAR. El procedimiento puede comprender además la expresión del CAR en una célula. El procedimiento 40 puede comprender además probar la actividad del CAR. En algunas realizaciones, uno o más de los primeros vectores codifica una región scFv. En algunas realizaciones, uno o más de los terceros vectores codifica un dominio transmembrana. En algunas realizaciones, uno o más de los segundos vectores codifica un dominio transmembrana. El procedimiento puede comprender además la incorporación aleatoriamente mediante recombinación de un quinto vector que codifica un dominio transmembrana con dichos primeros vectores, segundos vectores y terceros vectores 45 para formar dicho cuarto vector. En algunas realizaciones, dichos primeros vectores y dicho segundo vector están unidos aleatoriamente a partir de una pluralidad de vectores que codifican una pluralidad de regiones scFv distintas y una pluralidad de regiones de bisagra distintas. En algunas realizaciones, dichos primeros vectores y dichos terceros vectores están unidos aleatoriamente a partir de una pluralidad de vectores que codifican una pluralidad de regiones scFv distintas y una pluralidad de endodomelios distintos. En algunas realizaciones, dichos segundos vectores y dichos 50 terceros vectores están unidos aleatoriamente a partir de una pluralidad de vectores que codifican una pluralidad de regiones de bisagra distintas y una pluralidad de endodomelios distintos. En algunas realizaciones, dichos primeros vectores, dichos segundos vectores y dichos terceros vectores se unen aleatoriamente a partir de una pluralidad de vectores que codifican una pluralidad de regiones scFv distintas, una pluralidad de regiones de bisagra distintas y una pluralidad de endodomelios distintos. El procedimiento puede comprender además la generación de dichos cuartos 55 vectores mediante la unión aleatoria de dichos primeros vectores a partir de una primera biblioteca de vectores que codifican una pluralidad de regiones scFv, la unión aleatoria de dichos segundos vectores a partir de una segunda biblioteca de vectores que codifican una pluralidad de regiones scFv y la unión de dichos terceros vectores de una tercera biblioteca de vectores que codifican una pluralidad de endodomelios, para formar dicho cuarto vector que codifica el CAR. Los primeros vectores pueden comprender una primera secuencia y un segundo sitio de 60 recombinación homóloga. Los segundos vectores pueden comprender la segunda secuencia de recombinación homóloga y una tercera secuencia de recombinación homóloga. Los terceros vectores pueden comprender la tercera secuencia de recombinación homóloga y una cuarta secuencia de recombinación homóloga. Los terceros vectores

pueden comprender la tercera secuencia de recombinación homóloga y una cuarta secuencia de recombinación homóloga. Los cuartos vectores pueden comprender la primera secuencia de recombinación homóloga y la cuarta secuencia de recombinación homóloga. Los primeros vectores, los segundos vectores y/o los terceros vectores pueden codificar una transposasa. En algunas realizaciones, un sexto vector codifica una transposasa, y donde el 5 procedimiento comprende introducir, electroporar o transfectar uno o más de dichos cuartos vectores y dicho sexto vector en una célula. La transposasa puede ser una transposasa de tipo salmónide (SB). El procedimiento puede comprender además cultivar o proporcionar células transfectadas con el CAR en presencia de células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) que pueden estimular la expansión de las células T que expresan CAR. En algunas 10 realizaciones, cada una de la región scFv, la región bisagra y el endodominio están codificados en un vector de transposón de Bella Durmiente (SB) o *piggyBac*. En algunas realizaciones, cada uno del primer vector, el segundo vector y/o el tercer vector están unidos aleatoriamente por dicha recombinación a partir de una pluralidad de vectores que codifican múltiples regiones scFv distintas, las regiones de bisagra y los endodomios. En algunas realizaciones, dichos primeros vectores, los segundos vectores y los terceros vectores contienen cada uno un transposón; y donde dicha unión por recombinación homóloga comprende recombinación específica del sitio. En algunas realizaciones, los 15 primeros vectores y los segundos vectores tienen cada uno un primer sitio de recombinación homóloga; y donde los segundos vectores y los terceros vectores tienen cada uno un segundo sitio de recombinación homólogo. En algunas realizaciones, los primeros vectores tienen un tercer sitio de recombinación, y donde los cuartos vectores tienen un cuarto sitio de recombinación, donde el tercer sitio de recombinación y el cuarto sitio de recombinación pueden permitir la recombinación homóloga en una célula. La célula puede ser una célula T tal como, *por ejemplo*, una célula T alfa 20 beta, una célula T gamma delta, o célula NK, o célula NKT. En algunas realizaciones, la célula es una célula pluripotente tal como, *por ejemplo*, una célula madre o una célula madre pluripotente inducida. En algunas realizaciones, la célula se deriva de una célula madre, una célula madre pluripotente inducida o una célula madre. La célula puede ser una célula T o una célula NK derivada de una célula madre pluripotente inducida. En algunas realizaciones, dichos dominios de unión a antígeno distintos incluyen al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más scFv que 25 reconocen selectivamente diferentes antígenos. En algunas realizaciones, dichos dominios de unión a antígeno distintos incluyen al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más scFv que reconocen selectivamente (es decir, se unen específicamente) el mismo antígeno. En algunas realizaciones, los dominios de unión a antígeno se unen selectivamente (específicamente) a CD19, antígeno universal (ratón), HER-3, GD2, Gp75, proteína CS1, mesotelina, fosfatidilserina, cMyc, CD22, CD4, CD44v6, CD45, CD28, CD3, CD3e, CD123, CD138, CD52, CD56, CD74, CD30, 30 Gp75, CD38, CD33, CD20, Her1/HER3 fusion, GD2, un carbohidrato, *Aspergilo*, ROR1, c-MET, EGFR, Dectin, Ebola, un hongo, GP, HERV-K, NY-ESO-1, VEGF-R2, TGF-b2R, IgG4, Biotina u O-AcGD2. En algunas realizaciones, dichos dominios de unión a antígeno comprenden o consisten en scFv. La región bisagra puede codificar el péptido 12 AA (GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCT, SEQ ID NO: 1), péptido t-20 AA, IgG4 Fc Δ EQ, IgG4 Fc Δ Q, (t-12AA + t-20AA), mKate, phiLov, dsRed, Venus, eGFP, CH3 HA, (CD8 α + t-20AA), Doble t-20 AA, (t-20AA + 35 CD8α), (CD8α + Leucina Zipper Basep1), (CD8α + Leucina Cremallera Acid1), 2D3, CD8 α o IgG4 Fc. El endodominio puede codificar CD3ζ. El endodominio puede codificar uno o más dominios ITAM. En algunas realizaciones, el endodominio codifica (CD28 + CD3ζ), (CD28 + CD27 + CD3ζ), (CD28 + OX40 + CD3ζ), (CD28 + 4-1BB + CD3ζ), (CD28 + CD27 + OX40 + CD3ζ), (CD28 + 4-1BB + CD27 + CD3ζ), (CD28 + 4-1BB + OX40 + CD3ζ), (4-1BB + CD3ζ), (4-1BB + OX40 + CD3ζ), (4-1BB + CD27 + CD3ζ), (CD27 + CD3ζ), (CD27 + OX 40 + CD3ζ), (CD28Δ + CD3ζ), (CD28Δ + CD3ζ), (CD28Δ + CD27 + CD3ζ), (CD28Δ + OX40 + CD3ζ), (CD28Δ + 4-1BB + CD3ζ), (CD28Δ + 4-1BB + OX40 + CD3ζ), (CD28Δ + 4-1BB + CD27 + CD3ζ), (4-1BB + ICOS + CD3ζ), (CD28 + ICOS + CD3ζ), (ICOS + 40 CD3ζ), CD3ζ o CD28 solamente. En algunas realizaciones, los CAR pueden ser probados para actividad, *por ejemplo*, utilizando el iQue™ Screener (IntelliCyt, Albuquerque, NM). En algunas realizaciones, los CAR pueden evaluarse para una o más características (*por ejemplo*, viabilidad, regulación ascendente de señales de activación, regulación 45 ascendente de CD25, liberación de citocinas y/o destrucción celular) cuando se expresa en células como las células T utilizando una técnica como, *por ejemplo*, citometría de flujo. En algunas realizaciones, dicha actividad comprende la capacidad del CAR para unirse selectivamente a una célula cancerosa, unirse selectivamente a un patógeno, unirse selectivamente a una célula implicada en una enfermedad autoinmune, o promover la activación de una célula T, destrucción de una célula T, diferenciación de una célula T, proliferación de una célula T, desdiferenciación de una 50 célula T, movimiento de una célula T, producción de citocinas por una célula T o destrucción por una célula T.

En algunas realizaciones, la célula cancerosa es un cáncer de ovario, un linfoma, un carcinoma de células renales, un tumor maligno de células B, CLL, B-ALL, ALL, una leucemia, un tumor maligno de células B o linfoma, linfoma de células del manto, un linfoma indolente de células B, linfoma de Hodgkin, AML, cáncer cervical, cáncer de mama, 55 cáncer colorrectal, cáncer de ovario, neuroblastoma, cáncer de piel, melanoma, cáncer de pulmón, osteosarcoma, glioma, un tumor derivado del epitelio, cáncer de próstata o cáncer pediátrico. El patógeno puede ser un virus, un hongo o una bacteria. En algunas realizaciones, dicha prueba comprende imágenes de células individuales, genética de células individuales, evaluación de células T individuales o poblaciones de células T; medición de muerte específica o muerte en serie, expresión génica, expresión de proteínas, movimiento hacia o lejos de un objetivo, proliferación, 60 muerte celular inducida por activación, secreción de citocinas o secreción de quimiocinas. El procedimiento puede comprender además seleccionar un CAR único de dicha pluralidad de vectores basándose en una propiedad del CAR único. El procedimiento puede comprender además administrar terapéuticamente el CAR individual a un sujeto. El

sujeto puede ser un mamífero tal como, *por ejemplo*, un humano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende o que consiste en CAR 213 (SEQ ID NO: 5).

5

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a una célula T transformada que expresa el polipéptido que comprende o que consiste en CAR 213 (SEQ ID NO: 5). La célula puede ser una célula inmortalizada. La célula T puede ser una célula T alfa beta, una célula T gamma delta, célula NK, célula NKT, célula madre, células derivadas de células madre, incluidas las células del sistema inmunitario.

10

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una preparación farmacéutica que comprende la célula T transformada de la presente invención.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno 15 químérico que comprende o consiste en CAR 213 (SEQ ID NO: 5). El ácido nucleico puede estar comprendido en una célula T tal como, *por ejemplo*, una célula T alfa beta, una célula T gamma delta, una célula NK, una célula NKT, una célula madre o una célula T derivada de una célula pluripotente. La célula T puede estar comprendida en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 Otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición que comprende una biblioteca de diferentes vectores de codificación CAR, los vectores de dicha biblioteca se aleatorizan en términos de dominios de unión a antígeno distintos, dominios de bisagra y/o endodominiós. En algunas realizaciones, la biblioteca se aleatorizó en términos de dominios de unión a antígeno distintos, dominios de bisagra y endodominiós. En algunas realizaciones, la biblioteca se aleatorizó en términos de dominios y endodominiós de unión a antígeno distintos. En algunas 25 realizaciones, la biblioteca se aleatorizó en términos de dominios de unión a antígeno distintos y dominios de bisagra. En algunas formas de realización, la biblioteca se aleatorizó en términos de dominios y endodominiós de bisagra de antígeno distintos.

30 Los ejemplos de dominios de unión a antígeno, regiones de bisagras, dominios transmembrana y endodominiós que se usan en los procedimientos de la presente descripción para generar un CAR se muestran a continuación en la tabla 1. Los dominios de unión a antígeno, las regiones de bisagras, los dominios transmembrana y los endodominiós se proporcionan simplemente en la tabla 1 como ejemplos no limitantes, y se anticipa que se puede seleccionar prácticamente cualquier dominio de unión a antígeno (*por ejemplo*, dirigido a una célula cancerosa, bacterias, hongos, virus o células infectadas por virus) según se desee para la aplicación clínica particular. En la tabla 1, se proporciona 35 el objetivo del dominio de unión a antígeno (*por ejemplo*, "CD19" puede referirse a una región scFv que se une selectivamente a CD19). En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste en un scFv que se une selectivamente al antígeno. Si lo desea, una porción de scFv (*por ejemplo*, parte de la región variable de scFv) puede ser aleatorizada si se desea. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno se une selectivamente a una proteína. Alternativamente, el dominio de unión al antígeno puede unirse selectivamente a un 40 carbohidrato expresado en un objetivo tal como, *por ejemplo*, un hongo, virus, bacteria o célula cancerosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno comprende o consiste en Dectin-1, que puede unirse selectivamente a β -glucanos y carbohidratos que se encuentran en las paredes celulares fúngicas. En algunas realizaciones, el CAR puede unirse selectivamente a un virus, *por ejemplo*, el CAR puede unir una proteína viral tal como una proteína de envoltura de hepatitis (*por ejemplo*, Krebs y col. 2013). En algunas realizaciones, el antígeno 45 es una citocina. El dominio de unión al antígeno puede unirse selectivamente a una proteína, carbohidrato o azúcar. En algunas realizaciones, un CAR se genera a partir de una pluralidad de dominios de unión a antígeno que se unen selectivamente a un solo objetivo, antígeno, o los dominios de unión a antígeno pueden tener antígenos superpuestos. En algunas realizaciones, se genera un CAR a partir de una pluralidad de dominios de unión a antígeno que se unen selectivamente a diferentes objetivos o antígenos. El endodomnio en un CAR puede dar como resultado una señal 50 inhibitoria (*por ejemplo*, PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, ITIM, SHP-1, LAIR-1, TIGIT, Siglecs) o una señal estimuladora (*por ejemplo*, CD27, CD28, ICOS, CD134, CD137, LCK, DAP10, ITAM, ZAP-70, LAT, SLP-76, citocinas, así como receptores de citocinas, así como combinaciones y mutaciones) en una célula que expresa el CAR tal como, *por ejemplo*, una célula T o una célula asesina natural (NK). Cuando la región de unión al antígeno reconoce selectivamente un antígeno, el endodomnio puede causar o promover la célula (*por ejemplo*, Célula T o célula NK) 55 que comprende el CAR para activar la muerte celular, migrar, diferenciar, desdiferenciar o inducir una señal apoptótica en la célula. La señal apoptótica puede comprender o consistir en una señal apoptótica CTLA4 y/o una señal apoptótica PD1 (muerte proteica 1). En algunas realizaciones, se puede expresar más de un CAR distinto en una célula tal como, *por ejemplo*, una célula T o una célula NK. Por ejemplo, un primer CAR y un segundo CAR pueden expresarse en una célula, donde el primer CAR se une selectivamente a un antígeno en una célula sana e induce una señal inhibidora a 60 través de un primer endodomnio (*por ejemplo*, reduciendo la probabilidad de que la célula T o la célula NK dañen la célula sana) y la segunda CAR se une selectivamente a un antígeno en una célula objetivo (*por ejemplo*, células cancerosas, hongos, células infectadas por virus, bacterias) e induce una señal estimuladora a través de un segundo

endodomino (*por ejemplo*, promoviendo o causando la muerte celular de la célula objetivo por la célula T o la célula NK). Un CAR generado a través de los procedimientos de la presente invención puede insertarse en una célula objetivo tal como, *por ejemplo*, una célula T o una célula NK, como ADN integrante (*por ejemplo*, utilizando electroporación y recombinación homóloga a través de un vector o sistema de transposasa/transposición) o como ADN o ARN no integrante (*por ejemplo*, entrega viral de un ARNm usando un vector viral tal como, *por ejemplo*, un lentivirus o retrovirus). En algunas realizaciones, la célula T que codifica un CAR según la presente invención es una célula inmortalizada; tales células inmortalizadas pueden funcionar y pueden usarse para evaluar o medir el potencial terapéutico o la toxicidad del CAR. De esta manera, muchos CAR pueden seleccionarse para un perfil farmacológico deseado, toxicidad hacia células enfermas o patógenos, falta de toxicidad en células sanas y/o eficacia terapéutica.

10

Tabla 1. Moléculas de ADN que pueden combinarse como dominios de unión a antígeno-dominios de señalización de bisagra para generar CAR.

Dominio de unión a antígeno (<i>por ejemplo</i>, un ScFv que se une selectivamente a un objetivo enumerado a continuación)
CD19 (ratón) (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 8)
CD19 (humano) (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 9)
CD19 (humanizado)
Antígeno Universal (ratón) (Rushworth y col. 2014)
CD22 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Jabbour y col. 2014 o Kong y col. 2014)
CD4 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Humblet-Baron y col. 2015)
CD44v6 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Leung 2010 o Verel 2002)
CD45 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Shin y col. 2011)
CD28 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Czerwiński et al. 2015)
CD3 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 10)
CD3e (<i>por ejemplo</i> , scFv del anticuerpo monoclonal SPV-T3b, Life Technologies, Carlsbad, CA),
CD123 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 11)
CD138 (<i>por ejemplo</i> , scFv del sol y col. 2007)
CD52 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Wang y col. 2015)
CD56 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Kaufmann y col. 1997)
CD74 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Kaufman y col.//., 2013)
CD30 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 12)
Gp75 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Patel y col. 2008)
CD38 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Weers y col. 2011)
CD33 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Manero et al., 2013)
CD20 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Le Garff-Tavernier y col. 2014 o Winiarska et al, 2014)
Her1/HER3 fusion (<i>por ejemplo</i> , scFv de Sarup y col. 2008)
HER-3 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 13)
GD2 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 14)
Carbohidratos (tal como un carbohidrato Aspergillus), <i>por ejemplo</i> , scfv de Styren y col. 1991)
ROR1 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 15)
c-MET (<i>por ejemplo</i> , scFv de Zhuang y col. 2014)
cMyc (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 16)
EGFR (<i>por ejemplo</i> , scFv de Funakoshi y col. 2014)
Dectina <i>por ejemplo</i> , Ectodominio Dectin 1, SEQ ID NO: 17)
Sitio de unión a la lectina-1
Virus del Ébola (<i>por ejemplo</i> , scFv de Audet y col. 2014 o Qiu y col. 2012)
Antígenos fúngicos (<i>por ejemplo</i> , scFv de Guimaraes y col. 2011)

Dominio de unión a antígeno (por ejemplo, un ScFv que se une selectivamente a un objetivo enumerado a continuación)
GP (Qiu <i>et al.</i> , 2012)
Gp75 (<i>por ejemplo</i> , TA99, SEQ ID NO: 18)
HERV-K (HERVK) (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 19)
NY-ESO-1 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Schultz-Thater <i>y col.</i> 2000)
VEGF-R2 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Zhang <i>y col.</i> 2002)
TGF-b2R (<i>por ejemplo</i> , scFv de Leung, 2011)
IgG4 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Curtin <i>y col.</i> 2015)
Biotina (<i>por ejemplo</i> , scFv de Vincent <i>y col.</i> 1993)
O-AcGD2 (<i>por ejemplo</i> , scFv de Goldberg <i>y col.</i> 2014 o Ahmed <i>y col.</i> 2014)
Proteína CS1 (<i>por ejemplo</i> , Elotuzumab o huLuc63, SEQ ID NO: 20)
Mesotelina (<i>por ejemplo</i> , utilizando SS-1 scFv, SEQ ID NO: 21)
Fosfatidilserina (<i>por ejemplo</i> , scFv de Gerber <i>y col.</i> 2011)

Bisagra/Andamio
12 AA (péptido) (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 1)
t-20 AA (péptido) (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 22)
CD8 α (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 23)
IgG4 Fc (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 24)
2D3 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 25)
IgG4 Fc Δ EQ (IgG4Fc N40Q) (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 26)
IgG4 Fc Δ Q (IgG4Fc L18E N40Q) (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 27)
t-12AA + t-20AA
mKate (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 28)
phiLov (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 29)
dsRed (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 30)
Venus (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 31)
eGFP (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 32)
CH3 HA (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 33)
mTFP-1 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 34)
CD8 α + t-20AA
Doble t-20 AA
t-20AA + CD8 α
CD8 α + Leucine Zipper Basep1 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 35)
CD8 α + ácido de cremallera de leucina1 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 36)
Dominio transmembrana:
CD28 (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 37)
CD137 (4-1BB) (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 38)
CD8 α (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 39)
CD3 ζ (<i>por ejemplo</i> , SEQ ID NO: 40)

Endo-dominio (dominio de señalización)
CD28 + CD3 ζ
CD28 + CD27 + CD3 ζ
CD28 + OX40 + CD3 ζ
CD28 + 4-1BB + CD3 ζ
CD28 + CD27 + OX40 + CD3 ζ
CD28 + 4-1BB + CD27 + CD3 ζ
CD28 + 4-1BB + OX40 + CD3 ζ
4-1BB + CD3 ζ
4-1BB + OX40 + CD3 ζ
4-1BB + CD27 + CD3 ζ
CD27 + CD3 ζ
CD27 + OX 40 + CD3 ζ
CD28 Δ + CD3 ζ
CD28 Δ + CD27 + CD3 ζ
CD28 Δ + OX40 + CD3 ζ
CD28 Δ + 4-1BB + CD3 ζ
CD28 Δ + 4-1BB + OX40 + CD3 ζ
CD28 Δ + CD27 + OX40 + CD3 ζ
CD28 Δ + 4-1BB + CD27 + CD3 ζ
4-1BB + ICOS + CD3 ζ
CD28 + ICOS + CD3 ζ
ICOS + CD3 ζ
CD3 ζ
Solo CD28

ζ - zeta; Δ - mutante; Nota = 4-1BB también se conoce como CD137; "+" se refiere a la fusión de las diferentes regiones.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, se pueden usar los siguientes dominios de unión a antígeno, bisagras/andamios, dominios transmembrana y endodomios, como se muestra en la tabla 2. Ejemplos de secuencias incluidas en dominios de señalización, *por ejemplo*, en la tabla 1 o en la tabla 2, incluyen CD27 (SEQ ID NO: 41), CD28 (SEQ ID NO: 42), CD28 Δ (SEQ ID NO: 43), CD134 (OX40) (SEQ ID NO: 44), CD137 (41BB) (SEQ ID NO: 45), ICOS (SEQ ID NO: 46) y CD3 zeta (SEQ ID NO: 47). Los ejemplos de dominios scFv Anti-EGFR como se enumeran en la tabla 2 incluyen Nimotuximab (SEQ ID NO: 48) y Cetuximab (SEQ ID NO: 49). Un ejemplo de una scFv Anti-Fosfatidilserina como se enumera en la tabla 2 es Bavituximab (SEQ ID NO: 50).

10

Tabla 2: Ejemplo de bibliotecas utilizadas para generar CAR

scFv
<i>Proteína anti-CS1</i>
<i>Anti-mesotelina (SS-1)</i>
<i>Anti-CD123</i>
<i>Humano anti-CD19</i>
<i>Ratón anti-CD19</i>
<i>Anti-CD3</i>
<i>Anti-CD30</i>
<i>Anti-dectina</i>
<i>Anti-G2D</i>
<i>Anti-Gp75</i>

scFV
<i>Anti-HERVK</i>
<i>Anti- CD22</i>
<i>Anti -ROR-1</i>
<i>Anti -EGFR</i>
<i>Anti -HEB-3</i>
<i>Anti -Fosfatidilserina</i>
Bisagra/Andamio
t-12 AA (péptido)
t-20 AA (péptido)
CD8 α
IgG4 Fc
IgG4Fc Δ EQ
IgG4Fc Δ Q
t-12AA + t-20AA
mKate
phiLov
dsRed
Venus
eGFP
CH3 HA
CD8 α + t-20AA
Doble t-20 AA
t-20AA + CD8 α
CD8 α + Base de cremallera de leucina p1
CD8 α + ácido de cremallera de leucina 1
Dominio transmembrana:
CD28
4-1BB
CD3 ζ
Dominio de señalización
CD28 + CD3 ζ
CD28 + CD27 + CD3 ζ
CD28 + OX40 + CD3 ζ
CD28 + 4-1BB + CD3 ζ
CD28 + CD27 + OX40 + CD3 ζ
CD28 + 4-1BB + CD27 + CD3 ζ
CD28 + 4-1BB + OX40 + CD3 ζ
4-1BB + CD3 ζ
4-1BB + OX40 + CD3 ζ
4-1BB + CD27 + CD3 ζ
CD28 Δ + CD3 ζ
CD28 Δ + CD27 + CD3 ζ
CD28 Δ + OX40 + CD3 ζ
CD28 Δ + 4-1BB + CD3 ζ
CD28 Δ + 4-1BB + OX40 + CD3 ζ
CD28 Δ + CD27 + OX40 + CD3 ζ
CD28 Δ + 4-1BB + CD27 + CD3 ζ

Dominio transmembrana:
4-1BB + ICOS + CD3 ζ
CD28 + ICOS + CD3 ζ
ICOS + CD3 ζ
CD3 ζ
<i>Solo CD28</i>

El término "receptores de antígeno químérico (CAR)" o "CAR", como se usa en esta invención, incluye receptores de células T artificiales, receptores de células T químéricas o inmunorreceptores químéricos. Los CAR son generalmente 5 receptores diseñados que pueden insertar una especificidad artificial en una célula efectora inmune particular. Los CAR pueden emplearse para impartir la especificidad de un anticuerpo monoclonal sobre una célula T, permitiendo así que se genere un gran número de células T específicas, por ejemplo, para uso en terapia celular adoptiva. En realizaciones específicas, los CAR dirigen la especificidad de la célula a un antígeno asociado a tumor, por ejemplo. En realizaciones preferidas, los CAR comprenden un endodomnio (que comprende un dominio de activación intracelular), un dominio 10 transmembrana, una región de bisagra o andamio, y un dominio extracelular que comprende un dominio de direcciónamiento (*por ejemplo*, un scFv derivado de un anticuerpo monoclonal). En algunas realizaciones, el dominio de direcciónamiento extracelular puede ser un ligando de un receptor (*por ejemplo*, un péptido que se une selectivamente a un receptor de proteína). En algunas realizaciones, uno puede apuntar a células malignas redirigiendo la especificidad de las células T usando un CAR específico para las células malignas (*por ejemplo*, 15 mediante el uso de un scFv anti-CD19 para atacar a una célula cancerosa de linaje B).

En la tabla 1 se muestran ejemplos de regiones scFv, regiones de bisagra/andamio, dominios transmembrana y endodomios, y también se proporcionan ejemplos de secuencias relacionadas en esta invención. Tenga en cuenta en la tabla 1 que las regiones scFv pueden referirse a una pluralidad de regiones scFv para un objetivo particular (*por ejemplo*, "CD19" en la tabla 1 puede referirse a una única secuencia de anticuerpo monoclonal, o en algunas realizaciones preferidas, puede referirse a una pluralidad de regiones scFv derivadas de anticuerpos monoclonales que se dirigen selectivamente a CD19). Se anticipa que los procedimientos de la presente descripción pueden usarse para generar un CAR que comprende, *por ejemplo*, una fusión de cualquier combinación de una región scFv, bisagra/andamio, dominio transmembrana y endodomnio de la tabla 1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el CAR 20 puede comprender una región scFv que se dirige selectivamente a CD19 (*por ejemplo*, derivado de un ratón, humano o anticuerpo monoclonal humanizado) fusionado a una región de bisagra/andamio IgG4 Fc, un dominio transmembrana CD28 y un endodomnio que comprende CD28 y CD3 ζ . En algunas realizaciones, el CAR puede comprender una región scFv que se dirige selectivamente a ROR1 fusionado a la región bisagra/andamio Fc de IgG4, un dominio transmembrana CD28 y un endodomnio que comprende CD28 y CD3 ζ . En algunas realizaciones, el CAR 25 puede comprender una región scFv que se dirige selectivamente a ROR1 fusionado a la región bisagra/andamio Fc de IgG4, un dominio transmembrana CD28 y un endodomnio que comprende 4-1BB y CD3 ζ . En algunas realizaciones, el CAR puede comprender una región scFv que se dirige selectivamente a CD19 (*por ejemplo*, derivado de un ratón, humano o anticuerpo monoclonal humanizado) fusionado a la región bisagra/andamio Fc de IgG4, un dominio transmembrana CD28 y un endodomnio que comprende CD28 y CD3 ζ . En algunas realizaciones, el CAR 30

35 Como se usa en esta invención, el término "antígeno" es una molécula capaz de unirse a un anticuerpo o receptor de células T. Generalmente se puede usar un antígeno para inducir una respuesta inmune humoral y/o una respuesta inmune celular que conduzca a la producción de linfocitos B y/o T.

40 Como se usa en esta invención, "un" o "uno/a" pueden significar uno o más. Tal como se utilizan en las reivindicaciones, cuando se utilizan junto con la expresión "que comprende", las palabras "un" o "uno/a" pueden significar uno o más de uno.

45 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refieren solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o". Tal como se utiliza en esta invención, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

50 Como se usa en esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el procedimiento que se emplea para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede comprenderse mejor al referirse a una o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en esta invención.

- 5 **FIG. 1.** Los vectores de clonación utilizados para reensamblar CAR utilizando tres plásmidos donantes que expresan (i) scFv específico, (ii) bisagra extracelular y (iii) endodominios. Esta estrategia se adaptará para generar paneles de CAR que difieren en las regiones de bisagra, transmembrana e intracelular. Ingeniería de moléculas CAR a partir de componentes scFv, IgG4 Fc (bisagra grande); o CD8a (bisagra media) o péptido solamente (bisagra pequeña) y combinaciones de CD3ζiv con diferentes dominios de señalización utilizando el sistema de sitio de triple recombinación.
- 10 Una biblioteca de scFv y distintos andamios y dominios de señalización codificados en tres plásmidos donantes (clones de entrada), se recombinan en el vector de ADN de expresión. Esta estrategia generó múltiples especies CAR en el formato de dominio(s) de señalización scFv-B-scaffold-C.

FIGS. 2A-B: (FIG. 2A) Expresión de CAR (Fc) y CD8⁺ en células T después de 66 días tras la electroporación por citometría de flujo. Las células se expandieron en un APC cargado con antígeno CD19 (clon 4) (**FIG. 2B**) La lisis de CD19⁺ EL-4 se comparó con la lisis de fondo de CD19^{neg} EL-4 utilizando el ensayo de liberación de cromo de 4 h por células CD19CAR + T de grado clínico (CG) Células T CD19CAR + por sitios de triple recombinación (EZ CAR) y CAR^{neg} células T. El CAR^{neg} T se expandió con clon # 4 de aAPC derivado de K562 irradiado y anti-CD3 (OKT3) cargado.

20 **FIG. 3:** Diseños de CAR. CAR 212 = SEQ ID NO: 4; CAR 213 = SEQ ID NO: 5; CAR 214 = SEQ ID NO: 56; CAR 215 = SEQ ID NO: 57; CAR 216 = SEQ ID NO: 58; CAR 217 = SEQ ID NO: 2; CAR 218 = SEQ ID NO: 59; CAR 193 = SEQ ID NO: 55.

25 **FIG. 4:** Plásmidos de seguimiento de Bella Durmiente

FIG. 5: Expresión CAR.

30 **FIG. 6:** Cinética de Expresión CAR

FIG. 7: Fenotipo

FIGS. 8A-B: El fenotipo extendido se muestra en la FIG. 8A y la FIG. 8B.

35 **FIG. 9:** Análisis de transferencia Western

FIG. 10: Cinética de expansión.

FIG. 11: Expansión de pliegue: Células totales

40 **FIG. 12:** Expansión de pliegue: CAR + células T.

FIG. 13: Citotoxicidad

45 **FIG. 14:** 4-1BB CAR: Citotoxicidad

FIG. 15: Dominio TM: Citotoxicidad

50 **FIG. 16:** Espaciador (IgG4 vs CD8): Citotoxicidad

FIG. 17: Producción de IFN-γ.

FIG. 18: 4-1BB CAR: Producción de IFN-γ

55 **FIG. 19:** Dominio TM: Producción de IFN-γ

FIG. 20: Espaciador (IgG4 vs CD8): Producción de IFN-γ.

60 **FIG. 21:** Seguridad: PCR para transposasa SB11.

FIG. 22: Seguridad: Número de copia CAR (qPCR).

FIG. 23: Seguridad: Crecimiento autónomo. Como se muestra en la figura, se observó una falta de crecimiento autónomo.

FIG. 24: Diseño de CAR. Se proporciona un ejemplo de un CAR en el lado derecho de la figura.

5

FIG. 25: CD3-zeta. Consulta = SEQ ID NO: 51; Sujeto - top = SEC ID N.º: 52; Sujeto - medio = SEQ ID NO: 53; Sujeto - inferior = SEQ ID NO: 54.

FIG. 26: Diseños de CAR.

10

FIG. 27: CAR.

FIG. 28: Expresión CAR.

15

FIG. 29: Cinética de expansión.

FIG. 30: Cinética de expansión.

FIG. 31: Citotoxicidad

20

FIG. 32: Citotoxicidad

FIG. 33: Marcadores de memoria. Se muestra el porcentaje de expresión de CD27, CD62L, CD28 y CCR7 en células CAR + T (construcciones de expresión que se muestran en la figura 26).

25

FIG. 34: Producción de IFN- γ .

FIG. 35: Producción de IFN- γ (PMA-Ion)

30

FIG. 36: Crecimiento autónomo.

FIG. 37: Número de copia de CAR.

FIG. 38: Número de copia de CAR.

35

FIG. 39: Número de copia de CAR.

FIGS. 40A-E: Se realizó la transfección de células 293-HEK con plásmidos que transportan el ADN de CAR (pSBSO EZ CAR) por lipofectamina. Las células transfectadas se analizaron por citometría de flujo después de teñirlas con anticuerpos anti-Fc o anti-idiotípicos (antiCD19svFv).

FIGS. 41A-B: FIG. 41A, Nalm-6; Células EL-4 CD19 +; células tumorales de pacientes con MCL y CLL (objetivos) y se modificaron previamente para expresar GFP. Las células objetivo 5×10^3 se incubaron con una concentración creciente de células T CD19RlgG4CD28CAR, células T CD19RCD8aCD28 CAR y células CAR neg T (utilizadas como control) durante 4 horas. Después de 4 horas, las células fueron adquiridas por iQue de IntelliCyt y los análisis de datos se realizaron en su software patentado. **FIG. 42B.** Los gráficos representan el porcentaje de muerte de las células CAR T contra las células tumorales. La relación entre las células efectoras y las células objetivo varió de 0 a 40 células.

50 **FIG. 42:** Las células objetivo 5×10^3 (EL-4 CD19 + informador de células B de granzima B) se incubaron con una concentración creciente de células T CD19RlgG4CD28CAR de grado clínico, células CAR T EZ CD19RCD8aCD28 y células CAR neg T (utilizadas como control) durante 4 y 10 horas. Después del tiempo de incubación, las células fueron adquiridas por iQue de IntelliCyt y los análisis de datos se realizaron en su software patentado. Los gráficos representan el porcentaje de muerte de las células CAR T contra las células tumorales. La relación entre las células efectoras y las células objetivo varió de 0 a 20 células.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Se describen en esta invención procedimientos para generar receptores de antígeno quimérico (CAR). El 60 procedimiento utiliza una pluralidad de vectores que codifican cada uno un dominio de unión a antígeno (*por ejemplo*, una región scFv), una región bisagra, una región transmembrana y/o un endodomnio. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un primer vector codifica el dominio de unión al antígeno, un segundo vector codifica la región bisagra,

y una tercera región codifica un endodomnio. En algunas realizaciones, la región transmembrana se codifica en el segundo vector, en el tercer vector o en un cuarto vector. En algunas realizaciones preferidas, los vectores pueden recombinarse de forma homóloga para formar un ácido nucleico que codifica un CAR que comprende el dominio de unión al antígeno, la región bisagra, la región transmembrana y el endodomnio. De esta manera, muchos CAR pueden 5 generarse y seleccionarse para una actividad deseada tales como, *por ejemplo*, reconocimiento selectivo y destrucción de una célula cancerosa que expresa un antígeno que se une selectivamente por el CAR. El CAR puede entonces expresarse en una célula como una célula T o una célula asesina natural (NK) como un ácido nucleico integrante (*por ejemplo*, un ADN integrado en el genoma del huésped usando una transposasa/transposición) o como un ácido nucleico no integrante (*por ejemplo*, un ARNm entregado a través de un vector viral como un lentivirus o retrovirus). La célula 10 T o la célula NK que expresa el CAR puede administrarse en una preparación farmacéutica o excipiente a un sujeto como un paciente humano para tratar o prevenir una enfermedad (*por ejemplo*, un cáncer, una infección por hongos, una infección bacteriana o una infección viral).

I. Generación de biblioteca

15 Las bibliotecas que codifican una pluralidad de regiones scFv, regiones de bisagra/andamio, dominios transmembrana y endodomios (dominios de señalización) pueden generarse mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia. En algunas realizaciones, hay múltiples posibilidades disponibles para dos o tres de las regiones scFv, regiones de bisagra/andamio y endodomios (dominios de señalización). En algunas realizaciones, hay múltiples 20 posibilidades disponibles para dos, tres o todas las regiones scFv, regiones de bisagra/andamio, dominios transmembrana y endodomios (dominios de señalización). Se proporcionan ejemplos de regiones scFv, regiones de bisagra/andamio, dominios transmembrana y endodomios (dominios de señalización), *por ejemplo*, en la tabla 1. En algunas realizaciones, la biblioteca puede codificar una pluralidad de scFv que se dirigen a diferentes antígenos, tales como antígenos múltiples contra el cáncer o dirigidos a tumores; en otras realizaciones, la biblioteca puede codificar 25 una pluralidad de scFv diferentes que se unen selectivamente a un único objetivo (*por ejemplo*, un solo antígeno anticancerígeno como CD19, etc.). De esta manera, los procedimientos se pueden usar para identificar qué construcción de direccionamiento tumoral puede funcionar de manera más efectiva para una muestra celular dada (*por ejemplo*, para ser utilizado en una medicina personalizada) o los procedimientos pueden ser utilizados para identificar nuevos CAR que funcionen de manera más eficaz en la orientación de un antígeno dado. La región scFv 30 generalmente comprende una cadena ligera variable (VL) y una cadena pesada variable (VH) derivada de un anticuerpo. En algunas realizaciones, porciones de las regiones VL y VH pueden ser aleatorizadas si se desea. Los procedimientos generales para generar bibliotecas incluyen, *por ejemplo*, la generación de bibliotecas de levadura, bacterianas, bibliotecas de fagos, células B infiltrantes, hibridomas (incluso de humanos y roedores), o bibliotecas de llamas, camellos, bibliotecas equinas y procedimientos in silico (véase, *por ejemplo*, Lennard, 2002).

35 En algunas realizaciones, los diferentes vectores que codifican el scFv, la región de bisagra/andamio, el dominio transmembrana y el endodomnio se fusionan para formar un único vector que codifica un CAR. La fusión puede ocurrir mediante recombinación homóloga mediada por transposición.

40 Por ejemplo, en algunas realizaciones, los vectores que codifican el scFv, la región de bisagra/andamio, el dominio transmembrana y/o el endodomnio pueden ser plásmidos de ADN de *Bella Durmiente* (SB) o *piggyBac*. Los plásmidos de ADN de *Bella Durmiente* (SB) y *piggyBac* se describen, *por ejemplo*, en Maiti y col. (2013), Singh y col. (2008) y Huls y col. (2013) En algunas realizaciones, el transposición está mediado por una transposasa (SB) de tipo Tc1 de tipo salmónido. En algunas realizaciones preferidas, el vector que codifica el CAR se transfecta o incorpora a las células 45 T de un sujeto, como un paciente humano con cáncer, a través de los procedimientos descritos en Singh y col. 2014 o Huls y col. Por ejemplo, los vectores de ADN derivados del sistema de *Bella Durmiente* (SB) se pueden usar para evitar gastos y dificultades de fabricación asociadas con la transducción de células T con vectores virales recombinantes. Después de la electroporación, el transposición/transposasa puede mejorar la eficiencia de integración de los plásmidos utilizados para expresar CAR y otros transgenes en las células T. El sistema SB combinado con 50 células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) puede propagarse selectivamente y producir células CAR(+) T adecuadas para la aplicación en humanos. En algunas realizaciones, la transferencia electrónica sincrónica de dos plásmidos de ADN, un transposición SB (que codifica un CAR de interés) y una transposasa SB (*por ejemplo*, SB11) puede ser seguido por la recuperación de integrantes estables mediante adiciones cada 7 días (ciclo de estimulación) de aAPC irradiada con y en presencia de IL-2 e IL-21 humana recombinante soluble. Por ejemplo, se pueden realizar 55 4 ciclos (28 días de cultivo continuo) para generar números clínicamente atractivos de células T que expresen de manera estable un CAR de interés. El uso de un sistema transposición/transposasa puede utilizarse para la administración de células T que expresan un CAR como se describe, *por ejemplo*, en Hackett y col.

II. Receptores de antígeno químérico

60 Las realizaciones de la presente descripción implican la generación e identificación de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido receptor de antígeno químérico específico de antígeno (CAR). En algunas realizaciones, el CAR se

humaniza para reducir la inmunogenicidad (hCAR).

En algunas realizaciones, el CAR puede reconocer un epítopo compuesto por el espacio compartido entre uno o más antígenos. Los receptores de reconocimiento de patrones, tales como dectina 1, pueden usarse para derivar 5 especificidad a un antígeno de carbohidrato. En ciertas realizaciones, la región de unión puede comprender regiones de determinación complementarias de un anticuerpo monoclonal, regiones variables de un anticuerpo monoclonal y/o fragmentos de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, la región de unión es un scFv. En otra realización, un péptido (*por ejemplo*, una citocina) que se une a un receptor u objetivo celular puede incluirse como una posibilidad o sustituirse por una región scFv en la región de unión de un CAR. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se puede 10 generar un CAR a partir de una pluralidad de vectores que codifican múltiples regiones scFv y/u otras proteínas de direccionamiento. Una región determinante de la complementariedad (CDR) es una secuencia corta de aminoácidos encontrada en los dominios variables de las proteínas receptoras de antígeno (*por ejemplo*, inmunoglobulina y receptor de célula T) que complementa un antígeno y, por lo tanto, proporciona al receptor una especificidad para ese antígeno en particular. Cada cadena polipeptídica de un receptor de antígeno contiene tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3). Dado 15 que los receptores de antígeno están compuestos típicamente por dos cadenas polipeptídicas, hay seis CDR por cada receptor de antígeno que pueden entrar en contacto con el antígeno; cada cadena pesada y ligera contiene tres CDR. Debido a que la mayoría de las variaciones de secuencia asociadas con las inmunoglobulinas y los receptores de células T se encuentran en las CDR, se hace referencia a veces a estas regiones como dominios hipervariables. Entre estos, CDR3 muestra la mayor variabilidad ya que está codificada por una recombinación de las regiones VJ (VDJ en 20 el caso de la cadena pesada y la cadena $\alpha\beta$ de TCR).

Un ácido nucleico que codifica CAR generado mediante la presente descripción puede comprender uno o más genes humanos o fragmentos de genes para mejorar la inmunoterapia celular para pacientes humanos. En algunas realizaciones, se puede generar un ADNc de CAR completo o una región de codificación a través de los procedimientos 25 descritos en esta invención. Las regiones o dominio de unión a antígeno pueden comprender un fragmento de las cadenas V_H y V_L de un fragmento variable monocatenario (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal humano particular, tal como los descritos en el documento de patente EE.UU. 7,109,304. En algunas realizaciones, el scFv comprende dominios de unión a antígeno de un anticuerpo específico de antígeno humano. En algunas realizaciones, la región scFv es un scFv específico de antígeno codificado por una secuencia que está optimizada para el uso de 30 codones humanos para la expresión en células humanas.

La disposición del dominio de unión a antígeno de un CAR puede ser multimérica, como un diacuerpo o multímeros. Los multímeros se pueden formar mediante el emparejamiento cruzado de las porciones variables de las cadenas 35 ligeras y pesadas en lo que se puede denominar diacuerpo. La porción de bisagra del CAR puede en algunas realizaciones acortarse o excluirse (*es decir*, generar un CAR que solo incluye un dominio de unión a antígeno, una región transmembrana y un dominio de señalización intracelular). Se puede usar una multiplicidad de bisagras con la presente invención, *por ejemplo*, como se muestra en la tabla 1. En algunas realizaciones, la región bisagra puede tener la primera cisteína mantenida, o mutada por una prolina o una sustitución de serina, o truncarse hasta la primera cisteína. La porción Fc puede eliminarse del scFv usado como una región de unión a antígeno para generar CAR 40 según la presente invención. En algunas realizaciones, una región de unión a antígeno puede codificar solo uno de los dominios Fc, *por ejemplo*, ya sea el dominio CH2 o CH3 de la inmunoglobulina humana. También se podría usar la región bisagra, CH2 y CH3, de una inmunoglobulina humana que se ha modificado para mejorar la dimerización. En algunas realizaciones, la porción de bisagra puede comprender o consistir en un péptido de 8 a 14 aminoácidos (*por ejemplo*, un péptido 12 AA), una porción de CD8 α o el IgG4 Fc. En algunas realizaciones, el dominio de unión a 45 antígeno puede suspenderse de la superficie celular usando un dominio que promueve la oligomerización, tal como CD8 alfa. En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno puede suspenderse de la superficie celular usando un dominio que es reconocido por el clon 2D3 de anticuerpo monoclonal (mAb) (se describe el clon 2D3 de mAb, *por ejemplo*, en Singh *et al.* 2008).

50 El endodomino o dominio de señalización intracelular de un CAR generalmente puede causar o promover la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de una célula inmune que comprende el CAR. Por ejemplo, el endodomino puede promover una función efectora de una célula T tal como, *por ejemplo*, actividad citolítica o actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas. La función efectora en una célula T virgen, de memoria o de tipo memoria incluye la proliferación dependiente de antígeno. Los términos "dominio de señalización intracelular" o "endodomino" 55 se refieren a la porción de un CAR que puede transducir la señal de la función efectora y/o dirigir a la célula a realizar una función especializada.

En algunas realizaciones, un endodomino comprende la cadena zeta del receptor de células T o cualquiera de sus homólogos (*por ejemplo*, eta, delta, gamma o épsilon), cadena MB1, B29, Fc RIII, Fc RI y combinaciones de moléculas 60 de señalización, como CD3 ζ y CD28, CD27, 4-1BB, DAP-10, OX40 y combinaciones de las mismas, así como otras moléculas y fragmentos similares. Se pueden usar porciones de señalización intracelular de otros miembros de las familias de proteínas activadoras, tales como Fc γ RIII y Fc ϵ RI. Se pueden encontrar ejemplos de estos dominios

transmembrana e intracelular alternativos, *por ejemplo*, Gross *y col.* (1992), Stancovski *y col.* (1993), Moritz *y col.* (1994) Hwu *y col.* (1995), Weijtens *y col.* (1996) y Hekele *y col.* (1996), que se incorporan en esta invención como referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, un endodomino puede comprender el dominio intracelular humano CD3 ζ .

5

El dominio extracelular específico de antígeno y el dominio de señalización intracelular están unidos preferiblemente por un dominio transmembrana. Los dominios transmembrana que pueden incluirse en un CAR incluyen, *por ejemplo*, la bisagra Fc de IgG4 humana y las regiones Fc, el dominio transmembrana CD4 humano, el dominio transmembrana CD28 humano, el dominio CD3 ζ humano transmembrana o un dominio CD3 ζ humano mutado por cisteína, o un dominio transmembrana de una proteína de señalización transmembrana humana tal como, *por ejemplo*, el CD16 y CD8 y el receptor de eritropoyetina. Se proporcionan ejemplos de dominios transmembrana, *por ejemplo*, en la tabla 1.

En algunas realizaciones, el endodomino comprende una secuencia que codifica receptores coestimuladores tales como, *por ejemplo*, un dominio de señalización intracelular de CD28 modificado, o un receptor coestimulador de CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10 o 4-1BB (CD137). En algunas realizaciones, tanto una señal primaria iniciada por CD3 ζ , una señal adicional proporcionada por un receptor coestimulador humano puede incluirse en un CAR para activar más eficazmente las células T transformadas, lo que puede ayudar a mejorar la persistencia *en vivo* y el éxito terapéutico de la inmunoterapia adoptiva. Como se observa en la tabla 1, el dominio de señalización del receptor endodomino o intracelular puede comprender la cadena zeta de CD3 solo o en combinación con un dominio de señalización coestimuladora Fcγ RIII tal como, *por ejemplo*, CD28, CD27, DAP10, CD137, OX40, CD2, 4-1BB. En algunas realizaciones, el endodomino comprende parte o la totalidad de uno o más de la cadena zeta TCR, CD28, CD27, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, Fc ϵ R γ , ICOS/CD278, IL-2Rbeta/CD122, IL-2Ralpha/CD132, DAP10, DAP12. y CD40. En algunas realizaciones, se pueden incluir 1, 2, 3, 4 o más dominios citoplasmáticos en un endodomino. Por ejemplo, en algunos CAR se ha observado que al menos dos o tres dominios de señalización fusionados pueden tener un efecto aditivo o sinérgico.

En algunos aspectos, se puede generar un segmento de ácido nucleico aislado y un casete de expresión que incluye secuencias de ADN que codifican un CAR. Se puede usar una variedad de vectores. En algunas realizaciones preferidas, el vector puede permitir el suministro del ADN que codifica un CAR a inmunitario tal como las células T. La expresión de CAR puede estar bajo el control de un promotor eucariota regulado tal como, *por ejemplo*, el promotor MNDU3, el promotor CMV, el promotor EF1alpha o el promotor Ubiquitin. Además, los vectores pueden contener un marcador seleccionable, si no por otra razón, para facilitar su manipulación *in vitro*. En otras realizaciones, el CAR puede expresarse a partir de ARNm transcrita *in vitro* a partir de un molde de ADN.

35

Las moléculas de receptor de antígeno químérico son recombinantes y se distinguen por su capacidad tanto para unir antígeno como transducir señales de activación *a través* de motivos de activación de inmunorreceptores (ITAM) presentes en sus colas citoplasmáticas. Las construcciones de receptores que utilizan un resto de unión a antígeno (*por ejemplo*, generado a partir de anticuerpos monocatenarios (scFv)) ofrecen la ventaja adicional de ser “universales” porque se unen al antígeno nativo en la superficie de la célula objetivo de forma independiente de HLA. Por ejemplo, una construcción scFv puede fusionarse con secuencias que codifican la porción intracelular de la cadena zeta del complejo CD3 (ζ), la cadena gamma del receptor Fc y la tirosina quinasa sky (Eshhar *y col.* 1993; Fitzer-Attas *y col.* 1998). Se han documentado mecanismos efectores de células T redirigidos que incluyen el reconocimiento tumoral y la lisis por CTL en varios sistemas de antígeno-scFv: ζ murino y humano (Eshhar *y col.* 1997; Altenschmidt *y col.* 1997; Brocker *y col.* 1998).

La región de unión al antígeno puede, *por ejemplo*, ser de un scFv humano o no humano. Un posible problema con el uso de regiones de unión a antígeno no humano, como los anticuerpos monoclonales murinos, es la funcionalidad reducida del efecto humano y la capacidad reducida de penetrar en las masas tumorales. Además, los anticuerpos monoclonales no humanos pueden ser reconocidos por el huésped humano como una proteína extraña, y por lo tanto, las inyecciones repetidas de dichos anticuerpos extraños pueden conducir a la inducción de respuestas inmunes que conducen a reacciones de hipersensibilidad dañinas. Para los anticuerpos monoclonales basados en murinos, este efecto se ha denominado respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA). En algunas realizaciones, la inclusión de anticuerpos humanos o secuencias scFv en un CAR puede dar como resultado poca o ninguna respuesta HAMA en comparación con algunos anticuerpos murinos. De manera similar, la inclusión de secuencias humanas en un CAR puede usarse para reducir o evitar el riesgo de reconocimiento o eliminación inmunomedido por las células T endógenas que residen en el receptor y podrían reconocer el antígeno procesado basado en HLA.

En algunas realizaciones, el CAR comprende: a) un dominio de señalización intracelular, b) un dominio transmembrana, c) una región de bisagra, y d) un dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el dominio de señalización intracelular y el dominio transmembrana están codificados con el endodomino por un único vector que puede fusionarse (*por ejemplo*, mediante recombinación homóloga dirigida por

transposición) con un vector que codifica una región bisagra y un vector que codifica una región de unión a antígeno. En otras realizaciones, la región de señalización intracelular y la región transmembrana pueden estar codificadas por dos vectores separados que están fusionados (*por ejemplo*, mediante recombinación homóloga dirigida por transposición).

- 5 La porción específica de antígeno del CAR, también denominada dominio extracelular que comprende una región de unión a antígeno, se dirige selectivamente a CD19. La porción específica de antígeno del CAR es un scFv. En algunas realizaciones, un CAR puede co-expresarse con una citocina unida a la membrana, *por ejemplo*, para mejorar la persistencia cuando hay una baja cantidad de antígeno asociado a tumor. Por ejemplo, el CAR puede co-expresarse con IL-15 unida a membrana.
- 10 15 En algunas realizaciones, se puede introducir ADN desnudo o un vector adecuado que codifica un CAR en las células T de un sujeto (*por ejemplo*, células T obtenidas de un paciente humano con cáncer u otra enfermedad). Los procedimientos de transfección estable de células T por electroporación usando ADN desnudo son conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, el documento de patente n.º 6,410,319. ADN no conjugado se refiere generalmente al ADN que codifica un receptor químérico de la presente invención contenido en un vector de expresión plásmido en una orientación adecuada para la expresión. En algunas realizaciones, el uso de ADN desnudo puede reducir el tiempo requerido para producir células T que expresan un CAR generado a través de los procedimientos de la presente invención.
- 20 25 Alternativamente, puede usarse un vector viral (*por ejemplo*, un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector viral adeno-asociado o un vector lentiviral) para introducir la construcción químérica en las células T. Generalmente, un vector que codifica un CAR que se usa para transfectar una célula T de un sujeto generalmente no debe replicarse en las células T del sujeto. Se conoce una gran cantidad de vectores que están basados en virus, donde el número de copias del virus mantenido en la célula es lo suficientemente bajo como para mantener la viabilidad de la célula. Los vectores de ejemplo incluyen vectores pFB-neo (STRATAGENE®) así como vectores basados en VIH, SV40, EBC, HSV o BPV.

Una vez que se establece que la célula T transfectada o transducida es capaz de expresar un CAR como una proteína de membrana superficial con la regulación deseada y en un nivel deseado, se puede determinar si el receptor químérico es funcional en la célula huésped para proporcionar Inducción de señal deseada. Posteriormente, las células T transducidas pueden reintroducirse o administrarse al sujeto para activar respuestas antitumorales en el sujeto. Para facilitar la administración, las células T transducidas pueden transformarse en una composición farmacéutica o en un implante apropiado para la administración *en vivo*, con vehículos o diluyentes apropiados, que son preferiblemente farmacéuticamente aceptables. Los medios para realizar tal composición o implante se han descrito en la técnica (véase, *por ejemplo*, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. (1980)). Cuando corresponda, los linfocitos T transducidos que expresan un CAR se pueden formular en una preparación en forma líquida o semisólida, tal como una cápsula, solución, inyección, inhalador o aerosol, en las maneras convencionales para su vía de administración respectiva. Los medios conocidos en la técnica se pueden utilizar para evitar o minimizar la liberación y absorción de la composición hasta que alcance el tejido u órgano objetivo, o para asegurar la liberación cronometrada de la composición. Generalmente, se emplea preferiblemente una forma farmacéuticamente aceptable que no afecta a las células que expresan el receptor químérico. Por lo tanto, de manera conveniente, los linfocitos T transducidos se pueden hacer en una composición farmacéutica que contiene una solución salina balanceada, preferentemente, la solución salina balanceada de Hanks o la solución salina normal.

45 IV. Células que presentan antígeno artificial

En algunos casos, las aAPC son útiles para preparar composiciones terapéuticas basadas en CAR y productos de terapia celular. Para obtener orientación general sobre la preparación y el uso de sistemas presentadores de antígeno, véanse, *por ejemplo*, los documentos de patente de EE.UU. n.º 6,225,042, 6,355,479, 6,362,001 y 6,790,662; La 50 Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2009/0017000 y 2009/0004142; y la Publicación Internacional N.º WO2007/103009)

Las aAPC pueden usarse para expandir las células T que expresan un CAR. Durante el encuentro con el antígeno tumoral, las señales entregadas a las células T por las células presentadoras de antígeno pueden afectar a la 55 programación de las células T y su posterior eficacia terapéutica. Esto ha estimulado los esfuerzos para desarrollar células artificiales presentadoras de antígeno que permitan un control óptimo sobre las señales proporcionadas a las células T (Turtle y col. 2010). Además del anticuerpo o antígeno de interés, los sistemas aAPC también pueden comprender al menos una molécula auxiliar exógena. Se puede emplear cualquier número y combinación adecuados de moléculas auxiliares. La molécula auxiliar se puede seleccionar de moléculas auxiliares tales como moléculas co-60 estimulantes y moléculas de adhesión. Las moléculas co-estimuladoras ejemplares incluyen CD70 y B7.1 (también llamadas B7 o CD80), que pueden unirse a las moléculas CD28 y/o CTLA-4 en la superficie de las células T, afectando así, *por ejemplo*, a la expansión de células T, diferenciación de Th1, supervivencia a corto plazo de células T y

- secreción de citocinas como la interleucina (IL) -2 (véase Kim y col. 2004). Las moléculas de adhesión pueden incluir glicoproteínas de unión a carbohidratos tales como selectinas, glicoproteínas de unión a transmembrana tales como integrinas, proteínas dependientes de calcio tales como cadherinas, y proteínas de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) transmembrana de un solo paso, tales como moléculas de adhesión intercelular (ICAM) que promueven, por 5 ejemplo, el contacto célula con célula o célula con matriz. Las moléculas de adhesión ejemplares incluyen LFA-3 e ICAM tales como ICAM-1. Las técnicas, procedimientos y reactivos útiles para la selección, clonación, preparación y expresión de moléculas auxiliares ejemplares, incluyendo las moléculas co-estimulantes y las moléculas de adhesión, se ejemplifican en, *por ejemplo*, las patentes de EE.UU. N.º 6.225.042, 6.355.479 y 6.362.001.
- 10 Las células seleccionadas para convertirse en aAPC artificiales tienen preferiblemente deficiencias en el procesamiento intracelular de antígenos, el tráfico intracelular de péptidos y/o la carga intracelular de péptidos en moléculas de CMH de clase I o clase II, o son poiquilotérmicas (es decir, menos sensibles a la exposición a temperatura que las líneas celulares de mamíferos), o poseen tanto deficiencias como propiedades poiquilotérmicas. En algunos aspectos, las células seleccionadas para convertirse en aAPC también carecen de la capacidad de expresar al menos 15 una contrapartida endógena (*por ejemplo*, molécula de CMH de clase I o clase II endógena y/o moléculas auxiliares endógenas como se describe anteriormente) de la molécula de CMH de clase I o clase II exógena y componentes moleculares auxiliares que se introducen en las células. Además, las aAPC artificiales, en algunos casos, retienen las deficiencias y las propiedades poiquilotérmicas que poseían las células antes de su modificación para generar las aAPC. Las aAPC ejemplares constituyen o se derivan de un transportador asociado con una línea celular deficiente 20 en el procesamiento de antígenos (TAP), tal como una línea celular de insecto. Una línea de células de insecto poiquilotérmicas ejemplar es una línea celular de *Drosophila*, tal como una línea celular Schneider 2 (véase, *por ejemplo*, Schneider, 1972). Se proporcionan procedimientos ilustrativos para la preparación, el crecimiento y el cultivo de células Schneider 2 en las patentes de EE. UU. N.º 6.225.042, 6.355.479 y 6.362.001.
- 25 Los aAPC pueden estar sujetos a un ciclo de congelación-descongelación. Por ejemplo, los aAPC pueden congelarse poniendo en contacto un receptáculo adecuado que contiene los aAPC con una cantidad apropiada de nitrógeno líquido, dióxido de carbono sólido (hielo seco) o material similar a baja temperatura, de modo que la congelación ocurra rápidamente. Se descongelan entonces los aAPC congelados, ya sea retirando los aAPC del material a baja temperatura y exponiéndolos a condiciones de temperatura ambiente, o mediante un proceso de descongelación 30 facilitado en el que se emplea un baño de agua tibia o una mano caliente para facilitar un menor tiempo de descongelación. Además, los aAPC pueden congelarse y almacenarse durante un período prolongado de tiempo antes de la descongelación. Los aAPC congelados también pueden descongelarse y, a continuación, liofilizarse antes de su uso posterior. Preferiblemente, los conservantes que podrían afectar negativamente a los procedimientos de congelación y descongelación, tales como el dimetilsulfóxido (DMSO), los polietilenglicoles (PEG) y otros conservantes, 35 están ausentes en los medios que contienen aAPC que experimentan el ciclo de congelación y descongelación, o se retiran esencialmente, por ejemplo, mediante la transferencia de aAPC a medios que carecen esencialmente de tales conservantes.

En ciertas otras realizaciones, el ácido nucleico xenogénico y el ácido nucleico endógeno de aAPC pueden inactivarse 40 por reticulación, de modo que esencialmente no ocurre crecimiento celular, replicación o expresión de ácido nucleico después de la inactivación. En una realización, los aAPC se inactivan en un punto posterior a la expresión de CMH y moléculas auxiliares exógenas, la presentación de tales moléculas sobre la superficie de los aAPCs y la carga de las moléculas de CMH presentadas con péptido o péptidos seleccionados. Por consiguiente, tales aAPC cargados con péptidos inactivados y seleccionados, aunque se vuelven esencialmente incapaces de proliferar o replicar, retienen la 45 función de presentación del péptido seleccionado. Preferiblemente, la reticulación también procura aAPC que están esencialmente libres de microorganismos contaminantes, tales como bacterias y virus, sin disminuir sustancialmente la función de la célula presentadora de antígeno de los aAPC. Por tanto, la reticulación mantiene las importantes funciones de APC de los aAPC al tiempo que ayuda a aliviar las preocupaciones sobre la seguridad de un producto de terapia celular desarrollado utilizando los aAPC. Para los procedimientos relacionados con reticulación y aAPC, 50 véase por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 20090017000.

IV. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Se debe apreciar por 55 aquellos expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan las técnicas descubiertas por el inventor para funcionar correctamente en la práctica de la invención, y por lo tanto, se puede considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica.

Ejemplo 1

60

Materiales y procedimientos

Generación de plásmidos de ADN de grado clínico.

El transposón SB, CoOpCD19RCD28ζ/pSBSO, expresa el codón humano optimizado (CoOp) CoOpCD19RCD28ζ CAR de segunda generación bajo el promotor compuesto híbrido EF-1/HTLV (InvivoGen) compuesto por Factor de alargamiento-1a (EF-1a [Kim y col. 1990] y 59 regiones no traducidas del virus de la leucemia de células T humanas (HTLV) [Singh y col. 2011; Davies y col. 2010]. La derivación de este plásmido de ADN se describe en la figura S1. La SB transposasa, SB11, bajo el promotor de citomegalovirus (CMV) se expresa en cis del plásmido de ADN pCMV-SB11 (Singh y col. 2011; Singh y col. 2008). Ambos plásmidos fueron secuenciados en su totalidad y fabricados por el Centro de Biofabricación Clínica de Waisman (Madison, WI) usando kanamicina para la selección de la cepa bacteriana E. Coli DH5a.

Generación de plásmidos de ADN de recombinación específicos de sitio triple - EZ-Build-CARs

Usando la secuencia de ADN del CAR descrita anteriormente (CoOpCD19RCD28z/pSBSO), las partes CD19 ScFv, la bisagra IgG4 Fc y el dominio CD28 transmembrana y la porción citosólica conjugada con el dominio de señalización CD3ζ fueron flanqueadas por sitios de recombinación lambda, sintetizados por Geneart (Life Technologies) como productos de PCR. Estas tres partes se insertaron individualmente en los plásmidos pDonors221 (por la enzima BP clonasa (ambas de Invitrogen). Los tres plásmidos se recombinaron con el plásmido de Bella Durmiente de recombinación específica de sitio triple por la enzima LR PLUS clonase (Invitrogen) generando el EZ-Build CD19CD28ζ CAR en el formato scFv-**B**-andamio-**C**-dominio (s) de señalización (FIG. 1)

Recuento celular

La exclusión de azul de tripano se usó para distinguir células vivas de células muertas y se contó usando Cellometer (Nexcelom Bioscience) (Singh y col. 2011).

Aislamiento de PBMC

Los productos de leucocitofragia de dos donantes sanos voluntarios varones se compraron de Key Biologics LLC (Memphis, TN). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron mediante la adaptación del sistema Biosafe Sepax (Eysins, Suiza) para el trabajo de conformidad con cGMP. Brevemente, después de cerrar todas las abrazaderas del kit CS-900, se transfirieron asepticamente 100 ml de Ficoll (GE Healthcare) a través de jeringas de 60 ml a una bolsa de medio con gradiente de densidad ("bolsa de ficoll") a través del conector Luer-lock y el tubo se selló en caliente con un sellador de mano (Sebra, Modelo # 2380). El kit se conectó a una bolsa de 1.000 ml que contenía tampón CliniMACS (PBS/EDTA, Miltenyi, Cat # 70026) con 20 ml de albúmina de suero humano al 25 % (HSA) (Baxter) (2 % v/v, tampón de lavado) para lavados, una bolsa de producto final [paquete de transferencia de 300 ml con acoplador (Baxter/Fenwal 4R2014)] y una bolsa de reactivo/sangre. Usando el protocolo de separación basado en gradiente de densidad (v126), el pistón de la jeringa se cargó en la cámara de la centrífuga y la cubierta de Sepax aAPC (clon # 4) para propagar selectivamente las células CAR + T. Las aAPC irradiadas con c se usaron para expandir numéricamente las células T genéticamente modificadas. Los aAPC descongelados de WCB se propagaron en CM durante hasta 60 días en bolsas de cultivo celular VueLife y se cosecharon utilizando el procedimiento de recolección Biosafe Sepax II. Brevemente, el kit CS-490.1 se conectó a una bolsa de salida de 300 ml (paquete de transferencia) a través de la conexión de bloqueo Luer. La cámara de separación se instaló en el pozo y el tubo se insertó en el sensor óptico y las llaves de paso se alinearon en posición T. Después de conectar la línea del sensor de presión, la bolsa del producto y las bolsas de sobrenadante/plasma se colgaron en el soporte. El protocolo modificado PBSCv302 se seleccionó del menú Sepax y el volumen del producto de entrada que se va a procesar (volumen inicial) se ajustó a #840 ml. Después de la validación y prueba del kit, se inició el procedimiento. Una vez finalizado, se retiraron las bolsas, se cerraron las abrazaderas y se retiró el kit. Las células de la bolsa del producto final se eliminaron asepticamente, se lavaron dos veces con medio de lavado (10 % de HSA en Plasmalyte) y se contaron. Se irradiaron aAPC (100 Gy) usando un radiador CIS BIO International (IBL-437 C # 09433) y se criopreservaron para su uso posterior en medios de crioconservación usando un congelador de velocidad controlada (Planer Kryo 750). El clon # 4 aAPC derivado de K562 cargado con anti-CD3 (OKT3) se usó para propagar las células T de control autólogas de control (CARneg) que no habían sufrido modificación genética. Los aAPC, obtenidos del cultivo, se incubaron durante la noche en X-Vivo 15 sin suero (cat # 04-744Q, Lonza) que contenía acetilcisteína al 0,2 % (Acetadote. Cumberland Pharmaceuticals) denominado medio de carga (LM). Al día siguiente, las células se lavaron, se irradiaron (100 Gy) usando un radiador 1000 Elite Cs-137 de célula Gamma (MDS Nordion), resuspendido en LM a una concentración de 106 células/ml junto con 1 mg/10⁶ células de CD3 antihumano purificado de grado funcional (clon-OKT3, 16-0037-85, eBioscience) y se incubaron con agitación suave en un rotador 3-D (Lab-Line) a 4 °C durante 30 minutos. Después de tres lavados con LM, las células se usaron en experimentos o se congelaron en alícuotas en nitrógeno líquido en una capa de vapor para su uso posterior.

Fabricación de células CAR + T

Las PBMC descongeladas se resuspendieron en (i) kit de células T humanas (cat # VPA-1002, Lonza; 100 μ L para 2x10⁷ células en una cubeta), con (ii) el plásmido de ADN (CoOpCD19RCD28/pSBSO) que codifica para el transposón CD19RCD28 CAR (15 μ g de ADN superenrollado por 2x10⁷ PBMC por cubeta), y (iii) el plásmido de ADN (pCMVSB11) que codifica para la transposasa SB11 (5 μ g de ADN superenrollado por 2x10⁷ PBMC por cubeta). Esta mezcla se transfirió inmediatamente a una cubeta (Lonza), se sometió a electroporación (definiendo el día de cultivo 0) usando Nucleofector II (Programa U-14, Amaxa/Lonza), reposó en medio completo RPMI al 10 % durante 2 a 3 horas, y después de un cambio de medio-medio, se incubó durante la noche a 37 °C, 5 % de CO₂. Al día siguiente, las células se recolectaron, contaron, fenotiparon mediante citometría de flujo y se cultivaron conjuntamente con aAPC irradiado con c en una proporción de 1: 2 (célula CAR + T: aAPC), que marcó el día de cultivo 1 y el comienzo de un ciclo de estimulación de 7 días. IL-21 (cat # AF-200-21, PeproTech) y 1L-2 (cat # NDC 65483-116-07, Novartis) se agregaron en un horario de lunes-miércoles-viernes en adelante del día 1 y el día 7 respectivamente. Las células NK pueden prevenir la expansión numérica de las células CAR + T, especialmente si su crecimiento excesivo ocurre temprano en el proceso de cultivo de tejidos. Por lo tanto, se realizó un agotamiento de CD56 si las células CD3negCD56 + \$10 % usando cuentas CD56 (cat # 70206, Miltenyi Biotech, cuentas de 20 ml/107 células) en columnas LS (cat # 130-042-401, Miltenyi Biotech) en tampón CliniMACS que contiene un 25 % de HSA (80 ml/107 células).

Generación de células T de control CAR^{neg}

20 Como control, las PBMC transfectadas simuladas 5x10⁶ se cultivaron conjuntamente con el clon # 4 de aAPC derivado de K562 irradiado y cargado con anti-CD3 (OKT3) en una proporción de 1: 1 en un ciclo de estimulación de 7 días. Todos los cultivos se complementaron con IL-21 (30 ng/ml) desde el día 1 de cultivo en adelante, e IL-2 (50 U/ml) comenzando 7 días después del inicio del cultivo. Todas las citoquinas se agregaron posteriormente cada dos días

25 Inmunofenotipo de células

Las células se tiñeron usando anticuerpos en 100 ml de tampón FACS (2 % de FBS, 0,1 % de azida de sodio) durante 30 minutos a 4 °C. La adquisición se realizó con FACSCalibur (BD Bioscience) y se analizó con FCS Express 3.00.0612

30 Ensayo de liberación de cromo

Las células T fueron evaluadas por su citotoxicidad en un ensayo estándar de liberación de cromo de 4 horas usando ⁵¹Cr células objetivo marcadas con Cr. Las células T se sembraron por triplicado a 1x10⁵, 0,5x10⁵, 0,25x10⁵, 0,125x10⁵ placa inferior (Costar). Después de la incubación, se recogieron 50 μ L de sobrenadante en LumaPlate (Perkin Elmer), se leyó en TopCount NXT (Perkin Elmer) y se calculó el porcentaje de lisis específica por:

$$\frac{\text{51Cr experimental liberado} - \text{51Cr espontáneo liberado}}{\text{Máximo de 51Cr liberado} - \text{51Cr espontáneo liberado}} \times 100$$

40 La liberación espontánea y máxima se determinó midiendo el cromo en el sobrenadante acondicionado de las células objetivo incubadas con CM o 0,1 % Triton X-100 (Sigma), respectivamente y 0,0625x10⁵ células/pocillo con 5x10³ células objetivo en un V de 96 pocillos (Manufacturee Novo Software, Thornhill, Ontario, Canadá).

45 **Ejemplo 2**

Generación de CD19⁺ CAR

Se generó un CD19 + CAR utilizando los procedimientos descritos anteriormente en el Ejemplo 1 (denominado 50 procedimiento "EZ"). Estos CD19⁺ CAR (CD19CAR) se compararon con un CD 19CAR de grado clínico ("CG") generado mediante un procedimiento anterior.

Los datos mostraron que el sistema de recombinación de sitio triple generó un CD19CAR (EZ) similar al grado clínico CD19CAR (CG). Las huellas dejadas por los sitios de recombinación en los plásmidos no interfirieron en la expresión 55 y función del CAR (**FIGS. 2A-B**).

Ejemplo 3

Generación de dominios transmembrana que contienen CAR (CD8, CD28) y dominios de señalización (CD28, 60 4-1BB)

Varios CAR probados han mostrado una expansión, citotoxicidad y citotoxicidad Th1 similares. CD19-BB-z ha

mostrado una menor producción de citocinas Th2; *en vivo*, fue eficiente en el control de enfermedades en ratones (Terapia Molecular 17 (8): 1453-1464, 2009). Sin embargo, existe una preocupación debido al hecho de que las células persistieron *in vitro* sin estimulación antigenica

- 5 Los CAR en la clínica se muestran a continuación en la tabla 2. En algunas realizaciones, un CAR de la presente invención no tiene la construcción específica como se muestra en la tabla 2 a continuación. Alternativamente, en algunas realizaciones, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para generar otra variación de un CAR que tenga las características del CAR mencionadas a continuación en la tabla 2 que, sin embargo, es diferente del CAR que se está utilizando actualmente en la clínica.

10

Tabla 2: CAR en la clínica

Ensayo clínico	UPenn	Cooper (MDACC)
Procedimiento de transferencia de genes	Lentivirus	Electroporación/Bella Durmiente
scfv derivado de	FMC63	FMC63
Andamio	CD8alpha	IgG4
Región espacial	69 aa	230 aa
Transmembrana	CD8alpha	CD28
Endodomino(s) de señalización CAR	CD137 y CD3-zeta	CD28 y CD3-zeta
Procedimiento de cultivo	Cuentas CD3/CD28	K562 aAPC
Citosina	IL-2	IL-2 e IL-21
Tiempo de cultivo	14 días	28 días
Expresión transgénica en producto infundido	4-23 %	> 80 %

15 Los diseños de construcción CAR específicos se ilustran en la FIG. 3. Como se muestra en la FIG. 3, se generó un esquema de varios CAR usando una combinación de CD19scfv, bisagra CD8a o tallo Fc IgG4, transmembrana CD8 (TM) o CD28 TM o CD137 TM y señalización a través del endodomino CD28 o CD137 junto con el endodomino CD3zeta.

20 Las construcciones CAR mostradas en la FIG. 3 se clonaron luego en plásmidos de Bella Durmiente que contenían etiquetas SIM y FRA para permitir el seguimiento en estudios de repoblación competitivos, cuando se amplificaron usando un cebador CVseq7 común. Los plásmidos de seguimiento de la Bella Durmiente se muestran en la FIG. 4.

25 Las construcciones CAR mostradas en la FIG. 3 se electroporaron en células T usando Amaxa Nucleofector II y se cultivaron conjuntamente con aAPC durante 28 días en presencia de citocinas (IL2, IL-21). Se muestra la expresión de CAR el día después de la electroporación (día 1) y después de 28 días de co-cultivo con aAPC (día 28). Se muestran diagramas de puntos para CD3 y CAR, donde se usó Ab específico de CD3 y anti-CD 19scfv para distinguir las células T y CAR. Los resultados de expresión de CAR se muestran en la FIG. 5.

30 Las construcciones CAR mostradas en la FIG. 3 fueron evaluadas para la expresión de CAR a lo largo del tiempo durante 28 días y se muestra. Después de 21 días, la mayoría de los cultivos tenían >80 % de expresión de CAR. La cinética de expresión de CAR se muestra en la FIG. 6.

35 El porcentaje de expresión de células T CD4 y CD8 en cultivos nucleofaccionados con CAR de la fig. 3 se muestra después de 28 días de co-cultivo con aAPC. Estos resultados de fenotipo se muestran en la FIG. 7.

Después de 28 días de co-cultivo CAR⁺ Las células T (que expresan el CAR descrito en la figura 3) se evaluaron para determinar la expresión de marcadores relacionados con la memoria (CD45RA, CCR7, CD27), activación (CD69, HLA-DR), citotóxico (Perforina, Granzima B), agotamiento/senescencia (CD57, KLRG1, PD1) y adhesión (CD39, CD150). Los resultados para este fenotipo extendido se muestran en las FIGS. 8A-B.

40

Las células CAR⁺ T (que expresan el CAR descrito en la FIG. 3) se evaluaron para la expresión de CD3 ζ usando transferencia Western. Los lisados celulares se procesaron en condiciones desnaturalizantes, se transfirieron y se

midio la expresión de CD3 ζ imer químérico usando un mAb CD3 ζ antihumano primario de ratón y una IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP usando el sustrato SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity. Se observan bandas CD3 ζ químéricas a 52, 71 y 78 kD en relación con el tamaño de las construcciones CAR. Estos resultados de transferencia western se muestran en la FIG. 9.

5

Las células T electroporadas con las construcciones CAR (descritas en la FIG. 3) se estimularon con K562 aAPC el día 1 y cada 7 días a partir de entonces durante 28 días. Al final de cada ciclo de estimulación, las células se contaron usando el procedimiento de exclusión de azul tripán y se fenotiparon para la expresión de CD3 y CAR. Los gráficos mostrados en la FIG. 10 representan recuentos de células inferidos para las células, CD3 y CAR⁺ T totales a lo largo 10 del tiempo.

Se midió la expansión de las células. Doblar la expansión para las células totales (FIG. 11) y las células CAR⁺ (FIG. 12) se calcularon los días 14, 21 y 28 de co-cultivo comparando los recuentos con el día 1 (después de la 15 electroporación). Los resultados se muestran en la FIG. 11 y la FIG. 12.

15

La citotoxicidad se midió para las células T que expresan CAR (células CAR⁺ T). Las células CAR⁺ T (que expresan CAR descritas en la FIG. 3) fueron evaluadas por su citotoxicidad contra CD19⁺ objetivos tumorales (Daudi β 2m, NALM-6 y CD19⁺ EL-4) en comparación con CD19^{neg} EL-4 en un ensayo estándar de liberación de cromo de 4 horas. Los resultados se muestran en la FIG. 13, la FIG. 14, la FIG. 15 y la FIG. 16.

20

Producción intracelular de IFN- γ . Las células CAR⁺ T (que expresan las construcciones descritas en la FIG. 3) se incubaron con las células estimuladoras (CD19⁺ y CD19^{neg}) en presencia de inhibidor del transporte de proteínas durante 4-6 h, fijadas, permeabilizadas y teñidas con mAb específico de IFN- γ . Se usó PMA-Ionomicina como control positivo. Los resultados para la producción intracelular de IFN- γ se muestran en la FIG. 17, la FIG. 18, la FIG. 19, y la 25 FIG. 20.

PCR para transposasa SB11. El ADN aislado de las células T CAR⁺ (fig. 3) se amplificó usando cebadores específicos SB11 en un termociclador. Se usó GAPDH como gen de mantenimiento, y el plásmido pCMV-SB11 linealizado, el ADN genómico de las células Jurkat que expresan SB11 se usaron como controles positivos. Las células CAR^{neg} se 30 usaron (sin ADN) como controles negativos. Estos resultados de PCR se muestran en la FIG. 21.

El número de copias de CAR se midió usando PCR cuantitativa (qPCR). El número integrado de transgén CAR en células (de las construcciones CAR mostradas en la FIG. 3) se evaluó amplificando el ADN genómico usando cebadores y sondas específicas para el tallo de IgG4 Fc y repeticiones invertidas/directas (IR/DR). El gen RNAse P 35 se usó como control interno, y la línea celular Jurkat que expresa una copia única de CAR se utilizó para generar una curva estándar. Los resultados se muestran en la FIG. 22.

A continuación, se midió la presencia o ausencia de crecimiento autónomo en las células CAR⁺ T. El crecimiento aberrante de las células CAR⁺ T (que expresa las construcciones CAR que se muestran en la FIG. 3) se controló y 40 midió cultivando células T en ausencia de citocinas y aAPC. Las células se contaron cada 7 días y los porcentajes de células vivas/muertas (desde el día 1) se calcularon y se representaron gráficamente. Como se muestra en la FIG. 23, se observó que más del 80 % de las células T estaban muertas el día 14, lo que demuestra la falta de crecimiento autónomo.

45 Se podrían expresar varias CAR (> 80 %), expandidas (~1010) y fueron citotóxicas (~60 %, Daudi) en extensión similar. Los dominios de andamiaje (IgG4 o CD8 α) se usaron para construir CAR y no afectaron a la expresión ni a la potencia. Los dominios transmembrana (CD8, CD28) no afectaron a la potencia. El dominio transmembrana 4-1BB (216) afectó a la expresión (anti-sFcV Ab), pero no a la citotoxicidad y la producción de citocinas. La combinación de dominios de señalización, CD28 y 4-1BB no tuvo un efecto aditivo. Las células CAR⁺ T exhibieron memoria/fenotipo 50 efecto. Los CAR que contienen solo el dominio 4-1BB (212, 214, 217) tuvieron una mayor expresión de CCR7 en comparación con otros. Las células expresaron marcadores de memoria (CD27hi, CD45RAhi, CCR7lo), activación (CD69med, HLA-DRhi), citólisis (granzyme hi, perforinlo) y adhesión (CD39hi, CD150lo), pero cantidades insignificantes de marcadores inhibitorios (CD57, PD1, KLRG1) fueron observados. Todos los CAR, incluidos los que contienen el dominio 4-1BB, carecían de transposasa SB11 y no se auto-proliferaron.

55

Ejemplo 4

Generación de CAR que contiene CD3-zeta

60 Los CAR que contienen CD3 ζ se proporcionan en este ejemplo. Un diagrama general del diseño de CAR se muestra en la FIG. 24) Como se muestra en la FIG. 24, se muestra una comparación del diseño de CAR (FIG. 24, derecha) con una molécula de anticuerpo (FIG. 24, izquierda).

Las secuencias CD3 ζ se muestran en la FIG. 25) La secuencia de CD3zeta y su isoforma se muestran en la FIG. 25. Los diseños CAR incluyeron CD3 zeta (isoforma 1) que forma uno de los restos de señalización de endodomino y tiene tres ITAM.

5 Las construcciones CAR específicas se muestran en la FIG. 26 y la FIG. 27) La FIG. 26 muestra un esquema de CAR específico de CD19 que tiene tallos largos (IgG4), medios (bisagra CD8a) y pequeños (IgG 12 aa) que señalizan a través de los endodomios CD28 o CD137. La nomenclatura de las moléculas CAR con diferentes tallos y señalización se muestra en la FIG. 27.

10 Se midió la expresión de CAR. La expresión de CAR (como se describe en la FIG. 26) se midió el día después de la electroporación (día 1) y después de 28 días de co-cultivo en aAPC (día 28). Los gráficos de puntos de CD3 y CAR (medidos por el mAb específico de CD19scfv) se muestran en la FIG. 28.

15 La cinética de expansión se midió para el CAR. Las células T electroporadas con construcciones CAR (mostradas en la figura 26) se cultivaron conjuntamente en aAPC en un ciclo de estimulación de 7 días. Las células fueron contadas y evaluadas para la expresión de CD3 y CAR. Los resultados se muestran en la FIG. 29 y la FIG. 30.

Se midió la citotoxicidad de las células CAR⁺ T. Al final de 28 días de co-cultivo las células CAR⁺ T (que expresan 20 las construcciones mostradas en la FIG. 26) se evaluaron para determinar la citotoxicidad contra objetivos tumorales en un ensayo de liberación de cromo. Como se muestra en la FIG. 31, el porcentaje de citotoxicidad se midió en varias relaciones efector a objetivo para CD 19RCD28 (CAR 194) y CD19RCD137 (CAR 217) contra los objetivos tumorales CD19⁺ y CD19^{neg}. Como se muestra en la FIG. 32, se obtuvieron datos para el porcentaje de lisis de CD19⁺ EL-4 por las células CAR⁺ T (que expresan construcciones CAR mostradas en la FIG. 26) en una relación E: T de 20: 1. 25 Se midió el porcentaje de expresión de CD27, CD62L, CD28 y CCR7 en las células CAR⁺ T (que expresa las construcciones que se muestran en la FIG. 26), y los resultados se muestran en la FIG. 33.

30 La producción de citocinas intracelulares se midió para las células CAR⁺ T. Las células estimuladoras (CD19⁺ y CD19^{neg}) se incubaron con las células CAR⁺ T (que expresan CAR mostrados en la FIG. 26) durante 4 horas en presencia de inhibidor de transporte de proteínas y teñidas con mAb IFN- γ e IL-2. La PMA-Ionomicina sirvió como control positivo y las células T solas sirvieron como control negativo. La FIG. 34 muestra el porcentaje de células productoras de IFN- γ después de la estimulación. La FIG. 35 muestra la descomposición de las células productoras de IFN- γ y/o IL-2 después de la incubación con el cóctel de estimulación celular (PMA-Ionomicina).

35 Las células CAR⁺ T se midieron por la presencia de ausencia de crecimiento autónomo. Las células CAR⁺ T (que expresan CAR descritas en la FIG. 26) se evaluaron por su falta de crecimiento aberrante en ausencia de estimulación externa (citocinas y aAPC) durante 18 días. Al final de los 18 días, más del 80 % de las células estaban muertas, mostrando falta de crecimiento no deseado. Como se muestra en la FIG. 36, se observó una falta de crecimiento autónomo.

40 45 El número de copia CAR se midió en las células CAR⁺ T. El número de copias de la molécula CAR integrada se evaluó usando cebadores/sondas específicas para las regiones IgG4-Fc e IR/DR mediante qPCR. Como se muestra en la FIG. 37, se observó el número de copia CAR integrado (de CAR mostrado en la FIG. 26) usando la sonda IR/DR. Como se muestra en la FIG. 38 y la FIG. 39, se proporciona una compilación de datos del número de copias CAR en forma de tabla y gráfica para construcciones CAR (para ambas construcciones CAR mostradas en la FIG. 3 y construcciones CAR mostradas en la FIG. 26) como se probó en dos experimentos independientes (P491; C714 y GCR357861).

50 Estos datos muestran que los CAR con varios espaciadores pueden expresarse y crecer *in vitro* en el sistema de cultivo como se describe en esta invención. Se observó que todos los CAR tenían una expresión CAR similar. La citotoxicidad máxima de CD19⁺ EL-4 se observó en CAR con una región de bisagra CD8. Se observó una expresión similar de CD62L y CD28 en todos los CAR probados. Se observó una alta frecuencia de integración medida por el número de copias CAR en todos los CAR, excepto CAR que contenía el tallo IgG4-Fc. Se observó una falta de crecimiento autónomo y SB11 por PCR. Al contrario de informes anteriores, la inclusión de un separador 12aa en el

55 CAR no confirió una funcionalidad mejorada en estos estudios.

Ejemplo 5

Montaje rápido de CAR de componentes principales

60 Los inventores generaron un CAR específico de CD19 que se activa a través de CD28/CD3-zeta quimérico utilizando la plataforma EZ CAR en paralelo con células CD19RCD28m ζ CAR⁺ T de grado clínico (CG CAR). Ambas secuencias

de CARD CD28/CD3- ζ Clinical y EZ CAR CD19RCD28m ζ de grado clínico se insertaron en vectores de transposición de Bella Durmiente y se electroporaron en células T. Después de la electroporación, las células T se cultivaron en presencia de células presentadoras de antígeno artificiales CD19 + (también llamadas células activadoras y propagadoras, o AaPC) para la expansión específica de antígeno de las células T. La expresión de los CAR en la superficie de las células T se midió cada semana mediante citometría de flujo (expresión Fc +), que muestra una expresión CAR similar en las células CD19 CAR T de grado clínico y las células EZ CD19 CAR T. También se realizó un ensayo de liberación de cromo (CRA) para evaluar la función de destrucción de las células T CD19 CAR + generadas por la plataforma EZ CAR contra las células tumorales. Después de 4 horas de incubación, se observó que el porcentaje de lisis celular específica era del 52 % por las células EZ CAR T y del 49 % por las células CG CAR T.

10 Estos resultados demuestran que las células CAR + T funcionales se generaron usando estos procedimientos. Los inventores realizaron a continuación una producción rápida de CAR utilizando los procedimientos descritos anteriormente en combinación con una biblioteca de plásmidos que contienen los siguientes tres componentes de una molécula CAR: bisagras (i) anti-CD 19 scFv (ii) 5 con diferentes tamaños (grande - IgG4a e IgG4 Δ EQ, medio - CD8a, 15 pequeño- t-20AA y t-12AA) y (iii) diferentes combinaciones de 7 dominios de señalización (CD27, CD28, CD28 Δ Y¹⁷³ → F¹⁷³, CD134, CD137, CD278) con el dominio CD3 ζ . La transfección de células HEK 293 con plásmido que contiene el transgen CAR se utilizó para seleccionar 27 construcciones CAR diferentes para asegurar la expresión de la proteína CAR en la superficie celular. La prueba de alto rendimiento de moléculas CAR individuales se llevó a cabo utilizando el iQue™ Screener (Intellicyt, Albuquerque, NM), un citómetro de flujo de alto rendimiento, donde se realizan ensayos 20 citotóxicos utilizando células objetivo diseñadas que expresan un reportero de granzima B fluorescente o GFP. Los resultados se muestran en las FIGS. 40A-E.

25 Se realizaron experimentos adicionales para seleccionar las moléculas CAR utilizando IntelliCyt's iQue™. iQue™ utiliza citometría de flujo de alto rendimiento, una tecnología complementaria que genera información al estudiar grandes poblaciones utilizando capacidades de multiplexación y análisis de célula por célula. Los inventores adaptaron esta tecnología para informar sobre el potencial terapéutico de las células T modificadas con paneles de CAR. Las células T de los pocillos pueden teñirse para la viabilidad, así como las señales de activación (*por ejemplo*, sobreregulación de CD25), liberación de citoquinas y destrucción. Por lo tanto, los inventores adaptaron el iQue Screener y aprovecharon su capacidad para realizar la detección multiplexada de citocinas basadas en cuentas y 30 ensayos basados en células. Los resultados obtenidos indican que esta tecnología puede usarse para probar una gran cantidad de células CAR T diferentes generadas por la plataforma EZ CAR. Los datos se generaron utilizando iQue™ de IntelliCyt, donde se evaluaron 2 poblaciones de células CAR T en cuanto a su capacidad para matar células objetivo. Los resultados se muestran en las FIGS. 41A-B y la FIG. 42. Estos resultados demuestran que las moléculas de CAR estaban activas y que el procedimiento iQue™ puede usarse efectivamente para evaluar la actividad de CAR.

35

REFERENCIAS

- Publicación de EE.UU. N.º 2009/0017000
 Publicación de EE.UU. N.º 2009/0004142
 40 Patente de EE.UU. N.º 6.225.042
 Patente de EE.UU. N.º 6.355.479
 Patente de EE.UU. N.º 6.362.001
 Patente de EE.UU. N.º 6.410.319
 Patente de EE.UU. N.º 6.790.662
 45 Patente de EE.UU. N.º 7.109.304
 WO2007/103009
- Ahmed y Cheung, FEBS Lett. 2014 21 de enero; 588 (2): 288-97.
- 50 Altenschmidt et al., La transferencia adoptiva de linfocitos T activados y dirigidos in vitro da como resultado una regresión total del tumor, J Immunol. 1 de diciembre de 1997; 159 (11): 5509-15.
- Audet y col., Sci Rep. 6 de noviembre de 2014; 4: 6881.
- 55 Berry y col. Inmunoterapia adoptiva para el cáncer: la próxima generación de células inmunes modificadas genéticamente. Antígenos Tisulares. 2009 Oct; 74(4): 277-89.
- Broker y col. Adv. Immunol., 68: 257, 1998.
- 60 Curtin y col., MAbs. 2015 2 de enero; 7 (1): 265-75.
- Czerwiński y col., Drug Metab Dispos. enero de 2015; 43 (1): 42-52.

- Davies JK, Singh H, Huls H, Yuk D, Lee DA, y col. (2010) Combinando la redirección y aloanergización de CD19 para generar células T humanas específicas de tumor para la terapia con células alogénicas de tumores malignos de células B. *Cancer Res* 70: 3915-3924.
- 5 de Weers y col., *J Immunol*. 2011 1 de febrero: 186 (3): 1840-8.
- Duong y col., (2013) Ingeniería de la función de las células T utilizando receptores de antígeno quimérico identificados mediante una estrategia de biblioteca de ADN. *PLOS ONE* 8 (5): e63037.
- 10 Eshhar y col., Activación específica y focalización de linfocitos citotóxicos a través de cadenas simples quiméricas que consisten en dominios de unión a anticuerpos y las sub-unidades gamma o zeta de la inmunoglobulina y los receptores de células T. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90 (2): 720-4, 1993.
- 15 Eshhar, cuerpos T específicos de tumor: hacia la aplicación clínica. *Cancer Immunol Immunother*. noviembre-diciembre de 1997; 45 (3-4): 131-6. 1997
- Fitzer-Attas y col., Aprovechar las tirosina quinasas de la familia Syk como dominios de señalización para la cadena químérica única de los receptores de dominio variable: diseño óptimo para la activación de células T. *J Immunol*. 1 de 20 enero de 1998; 160 (1): 145-54. 1998
- Funakoshi et al., *Cancer Treat Rev*. dic 2014; 40 (10): 1221-9.
- 20 Gerber y col., *Clin Cancer Res*. 1 de noviembre de 2011; 17 (21): 6888-96.
- 25 Goldberg y col., *J Clin Oncol*. 10 de mayo de 2014; 32 (14): 1445-52.
- Gross et al., Expresión de moléculas quiméricas del receptor de célula T de inmunoglobulina como receptores funcionales con especificidad de tipo anticuerpo. *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 86: 10024-10028, 1989.
- 30 Gross y col. (1992) Dotando a las células T de especificidad de anticuerpos utilizando receptores de células T químéricas. *FASEB J*. dic 1992; 6 (15): 3370-8.
- Hackett y col., Un sistema de transposón y transposasa para aplicación humana, *Mol Ther*. 2010 abr; 18 (4): 674-83.
- 35 Hekele y col. Retraso del crecimiento de tumores por transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos reprogramados por scFv específico de CD44v6: zeta-quimera. *Int. J. Cancer (Pred)*. 9 de octubre de 1996; 68 (2): 232-8, 1996.
- Huls y col., Aplicación clínica de la Bella Durmiente y las células presentadoras de antígeno artificial para modificar 40 genéticamente las células T de la sangre del cordón umbilical y periférico. *J. Vis. Exp.*, doi:10.3791/50070, 2013.
- Huls y col. "Aplicación clínica de la Bella Durmiente y las células presentadoras de antígeno artificial para modificar genéticamente las células T de la sangre periférica y del cordón umbilical" *J Vis Exp*. 1 de febrero de 2013; (72): e50070.
- 45 Humblet-Baron y Baron, *Immunol Cell Biol*. 2015 10 de febrero. Doi: 10.1038/icb.2014.120.
- Hwu y col. (1995) Actividad antitumoral in vivo de células T redirigidas con genes químéricos de anticuerpos/receptores de células T. *Cancer Res*. 1 de agosto de 1995; 55 (15): 3369-73.
- 50 Ikeda y col., *Clin Cancer Res*. 15 de junio de 2009; 15 (12): 4028-37.
- Jabbour y col., *Am J Hematol*. 18 de noviembre de 2014.
- 55 Kaufmann y col., *Hum Pathol*. Diciembre de 1997; 28 (12): 1373-8.
- Kaufman y col., *Br J Haematol*. Noviembre de 2013; 163 (4): 478-86.
- Kim DW, Uetsuki T, Kaziro Y, Yamaguchi N, Sugano S (1990) Uso del promotor alfa del factor de alargamiento humano 60 1 como un sistema de expresión versátil y eficiente. *Gene* 91: 217-223.
- Kim et al., 2004, *Nature*, vol. 22 (4), págs. 403-410.

- Kim y col., Immunology. Agosto de 2010; 130 (4): 545-55.
- Kong y col., Leuk Res. Noviembre de 2014; 38 (11): 1320-6.
- 5 Krebs y col., Las células T que expresan un receptor de antígeno químérico que se une a las proteínas de la envoltura del virus de la hepatitis B controlan la replicación del virus en ratones. Gastroenterología Agosto de 2013; 145 (2): 456-65.
- 10 Le Garff-Tavernier y col., Haematologica. 31 de diciembre de 2014.
- Lennard S., Protocolos estándar para la construcción de bibliotecas scFv. Procedimientos Mol Biol. 2002; 178: 59-71.
- 15 Leung. Base de datos de agentes de contraste e imágenes moleculares (MICAD), Bethesda (MD): Centro Nacional de Información Biotecnológica (EE.UU.); 2004-2013. 25 de marzo de 2010
- Leung 2011, anticuerpo monoclonal químérico IRDye800CW-anti-CD105 TRC105. Base de datos de agente de contraste e imágenes moleculares (MICAD). Bethesda (MD): Centro Nacional de Información Biotecnológica (EE.UU.); 2004-2013. 01 de diciembre de 2011
- 20 20 Maiti y col., Sistema de la Bella Durmiente para redirigir la especificidad de las células T para aplicaciones humanas. J Immunother. 36 (2): 112-23, 2013.
- Manero y col., Haematologica. Febrero de 2013; 98 (2): 217-21.
- 25 25 Terapia Molecular 17 (8): 1453-1464, 2009.
- Moritz y col. (1994) Linfocitos T citotóxicos con una especificidad de reconocimiento injertada para células tumorales que expresan ERBB2. Proc Natl Acad Sci U S A. 10 de mayo de 1994; 91 (10): 4318-22.
- 30 30 Patel y col., Anticancer Res. 2008 septiembre-octubre; 28 (5A): 2679-86.
- Qiu y col., PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6 (3): e1575.
- 35 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a Ed., Mack, ed. (1980)
- Rushworth y col., (2014) "Células que presentan antígenos artificiales universales para propagar selectivamente las células T que expresan el receptor de antígeno químérico independiente de la especificidad" J Immunother. Mayo; 37 (4): 204-13.
- 40 40 Sarup y col., Mol Cancer Ther. 2008 Oct; 7 (10): 3223-36.
- Schneider, J. Embryol. Exp. Morph 1972 Vol. 27, págs. 353-365
- 45 Schultz-Thater y col., Br J Cancer. Julio de 2000; 83 (2): 204-8.
- Shin y col., Immune Netw. Abril de 2011; 11 (2): 114-22.
- 50 Singh et al., Redireccionamiento de la especificidad de las poblaciones de células T para CD19 utilizando el sistema de la Bella Durmiente. Cancer Res., 68: 2961-2971, 2008.
- Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Huls H, Olivares S, y col. (2011) La reprogramación de las células T específicas de CD19 con señalización de IL-21 puede mejorar la inmunoterapia adoptiva de las neoplasias de linaje B. Cancer Res 71: 3516-3527.
- 55 Singh y col. "Una nueva estrategia para la terapia génica utilizando la Bella Durmiente para modificar genéticamente las células T de grado clínico para atacar a CD19". Immunol Rev. enero de 2014; 257 (1): 181-90.
- Singh et al., "Fabricación de células T usando el sistema de la Bella Durmiente para forzar la expresión de un receptor de antígeno químérico específico de CD19". Cancer Gene Ther. 16 de enero de 2015.
- Stancovski y col. (1993)

- Stynen y col., pared celular fungular y respuesta inmune, NATO ASI Series Volumen 53, 1991, pp 181-193.
- Sun y col., Cell Mol Immunol. junio de 2007; 4 (3): 209-14.
- 5 Turtle y col., "Células artificiales presentadoras de antígeno para su uso en inmunoterapia adoptiva" Cancer J. 2010 Jul-Aug; 16 (4): 374-81.
- Verel, Int J Cáncer. 20 de mayo de 2002; 99 (3): 396-402.
- 10 Vincent and Samuel, Journal of Immunological Methods, Volumen 165, Número 2, 15 de octubre de 1993, páginas 177-182.
- Wang y col., Immunology. Febrero de 2015; 144 (2): 254-62.
- 15 Weijtens y col. (1996) Los linfocitos T humanos redireccionados por el gen Ig/gamma de cadena sencilla producen citocinas, específicamente lisan las células tumorales y reciclan la capacidad lítica. J Immunol. 15 de julio de 1996; 157 (2): 836-43.
- 20 Wieczorek y col., Células T genéticamente modificadas para el tratamiento de enfermedades malignas. Transfus Med Hemother. Diciembre de 2013; 40 (6): 388-402.
- Winiarska y col., MAbs. 2014; 6 (5): 1300-13.
- 25 Zhuang y col., Cancer Cell Int. 30 de noviembre de 2014; 14 (1): 109.
- Zhang y col., Angiogénesis. 2002; 5 (1-2): 35-44.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> JUNTA DE REGENTES, SISTEMA DE LA UNIVERSIDAD DE TEXAS

5 <120> RECEPTORES DE ANTIGENO QUÍMICO Y PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN

<130> UTF.C.P1231WO

<140> DESCONOCIDO

10 <141> 16/02/2015

<150> 61/940.339

<151> 14/02/2014

15 <160> 59

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

gagagcaagt acggccctcc ctgccccccct tgccct

36

30

<210> 2

<211> 2037

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2

40

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg	60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga ggcgcggcct gggcgaccgg	120
gtgaccatca gctgccggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
cccagccgtt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
gagcaggagg acatcgccac ctactttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccctt	360
ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaga gggccctgg cctggggcc	480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctggcgt gatctggggc	600
agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cggccatctac	720

tactgtgcca	agcactacta	ctacggcgcc	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
accagcgtga	ccgtgtccag	cgagagcaag	tacggccctc	cctggccccc	ttggccctgccc	840
cccgagttcc	tggcgccacc	cagcgtgttc	ctgttcccccc	ccaagccaa	ggacaccctg	900
atgatcagcc	ggaccccccga	ggtgacctgt	gtgggtgtgg	acgtgtccca	ggaggacccc	960
gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	acaacgccaa	gaccaagccc	1020
cgggaggagc	agttcaatacg	cacctaccgg	gtgggtgtccg	tgctgaccgt	gctgcaccag	1080
gactggctga	acggcaagga	atacaagtgt	aagggtgtcca	acaagggcct	gcccagcagc	1140
atcgagaaaa	ccatcagcaa	ggccaagggc	cagcctcggg	agcccccaggt	gtacaccctg	1200
ccccctagcc	aagaggagat	gaccaagaat	caggtgtccc	tgacacctgcct	ggtgaaggc	1260
ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaacg	gccagcccga	gaacaactac	1320
aagaccaccc	ccctgtgct	ggacagcgac	ggcagcttct	tcctgtacag	caggctgacc	1380
gtggacaaga	gccgggtggca	ggagggcaac	gtcttagct	gctccgtat	gcacgaggcc	1440
ctgcacaacc	actacaccca	gaagagcctg	tccctgagcc	tggcaagat	gttctgggtg	1500
ctggcgtgtgg	tgggtggcgt	gctggcctgc	tacagcctgc	tggtgacagt	ggccttcatc	1560
atctttggg	tgaagagagg	ccggaagaaa	ctgctgtaca	tcttcaagca	gcccttcatg	1620
cggcccggtgc	agaccaccca	ggaagaggac	ggctgcagct	gccggttccc	cgaggaagag	1680
gaaggcggct	gcgaactgcg	ggtgaagtgc	agccggagcg	ccgacgcccc	tgcctaccag	1740
cagggccaga	accagctgta	caacgagctg	aacctgggcc	ggagggagga	gtacgacgtg	1800
ctggacaaagc	ggagaggccg	ggaccctgag	atggggcggca	agcccccggag	aaagaaccct	1860
caggagggcc	tgtataacga	actgcagaaa	gacaagatgg	ccgaggccta	cagcgagatc	1920
ggcatgaagg	gcgagcggcg	gaggggcaag	ggccacgacg	gcctgtacca	gggcctgagc	1980
accgccacca	aggataccta	cgacgcccctg	cacatgcagg	ccctgcccccc	cagatga	2037

<210> 3

<211> 2034

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 3

ES 2 764 471 T3

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg	60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgcgcgcct gggcgaccgg	120
gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300

gagcaggagg acatcgccac ctactttgc cagcagggca acacactgcc ctacacc	360
ggcgccggaa caaagctgga gatcacccgc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
ggcgaggggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtgcc	480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgccttgcc cgactacggc	540
gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctggcgt gatctgggc	600
agcgagacca cctactacaa cagcgcctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
agcaagagcc aggtgttccct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgcctatctac	720
tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctggccccc ttgcctgccc	840
cccagttcc tggcgacc cagcgtgttc ctgttccccc ccaagccaa ggacaccctg	900
atgatcagcc ggaccccgaa ggtgacctgt gtgggtgtgg acgtgtccca ggaggacccc	960
gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc	1020
cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtgggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag	1080
gactggctga acggcaagga atacaagtgt aagggttcca acaagggcct gcccagcagc	1140
atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcgaa agcccccaggt gtacaccctg	1200
ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc	1260
ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagccga gaacaactac	1320
aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgcac ggcagttct tccctgtacag caggctgacc	1380
gtggacaaga gcccggggca ggaggcaac gtcttttagct gctccgtat gcacgaggcc	1440
ctgcacaacc actacacccca gaagagcctg tccctgagcc tggcaagat gttctgggtg	1500
ctggcgtgg tgggtggcgt gctggcctgc tacagcctgc tggtagact ggccttcatc	1560
atctttggg tgaggagcaa gcggagcaga ggcggccaca gcgactacat gaacatgacc	1620
ccccggagggc ctggcccccac ccggaaagcac taccagccct acgcccctcc cagggacttc	1680
gccgcctacc ggagccgggt gaagttcagc cggagcgcgg acgcccctgc ctaccagcag	1740
ggccagaacc agctgtacaa cgagctgaac ctggccggaa gggaggagta cgacgtgt	1800
gacaagcggaa gaggccggaa ccctgagatg ggcggcaagc cccggagaaa gaaccctcag	1860
gagggcgtataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatggc	1920
atgaagggcg agcggcggag gggcaagggc cacgacggcc tgtaccaggc cctgagcacc	1980
gccaccaagg atacctacga cgcctgcac atgcaggccc tgcccccag atga	2034

<210> 4

<211> 1491

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 4

atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgtgagctgc	cccacccgc	ctttctgctg	60
atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcccgcgcct	gggcgaccgg	120
gtgaccatca	gctgccggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180
aagcccgacg	gcaccgtcaa	gctgctgatc	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg	240
cccagccggt	ttagcggcag	cggctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300
gagcaggagg	acatcgccac	ctactttgc	cagcaggggca	acacactgcc	ctacacctt	360
ggcggcggaa	caaagctgga	gatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420
ggcgaggggca	gcaccaaggg	cgaggtgaag	ctgcaggaga	gcggccctgg	cctggtggcc	480
cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgtacc	gtgtccggcg	tgtccctgcc	cgactacggc	540
gtgtcctgga	tccggcagcc	cccttaggaag	ggcctggagt	ggctggcgt	gatctggggc	600
agcgagacca	cctactacaa	cagcgcctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac	660
agcaagagcc	aggtgttcct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720
tactgtgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
accagcgtga	ccgtgtccag	caagcccacc	accacccctg	ccccagacc	tccaacccca	840
gcccctacaa	tcgcccagcca	gcccctgagc	ctgaggcccg	aagcctgtag	acctgcccgt	900
ggcggagccg	tgcacaccag	aggcctggat	ttcgccctgct	acatctacat	ctggccccc	960
ctggccggca	cctgtggcgt	gctgctgctg	agcctggtca	tcaccctgta	ctgcaaccac	1020
cggaacaaga	gaggccggaa	gaaactgctg	tacatcttca	agcagccctt	catgcggccc	1080
gtgcagacca	cccaggaaga	ggacggctgc	agctgccgg	tccccgagga	agaggaaggc	1140
ggctgcgaac	tgcgggtgaa	gttcagccgg	agcgccgacg	cccctgccta	ccagcagggc	1200
cagaaccagc	tgtacaacga	gctgaacctg	ggccggaggg	aggagtacga	cgtgctggac	1260
aagcggagag	gccgggaccc	tgagatgggc	ggcaagcccc	ggagaaagaa	ccctcaggag	1320
ggcctgtata	acgaactgca	gaaagacaag	atggccgagg	cctacagcga	gatcggcatg	1380
aaggcggagc	ggcgggagggg	caagggccac	gacggcctgt	accagggcct	gagcaccgccc	1440
accaaggata	cctacgacgc	cctgcacatg	caggccctgc	ccccagatg	a	1491

<210> 5

<211> 1488

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 5

atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgtgagctgc	cccaccccg	ctttctgctg	60
atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcccacggct	gggcgaccgg	120
gtgaccatca	gctgccggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180
aagcccgacg	gcaccgtcaa	gctgctgatc	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgt	240
cccagccgt	ttagcggcag	cggctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300
gagcaggagg	acatcgccac	ctactttgc	cagcaggggca	acacactg	ctacacc	360
ggcggcggaa	caaagctgga	gatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420
ggcgaggggca	gcaccaaggg	cgaggtgaag	ctgcaggaga	gcggccctgg	cctggtgcc	480
cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgtacc	gtgtccggcg	tgtccctg	cgactacggc	540
gtgtcctgga	tccggcagcc	ccctaggaag	ggcctggagt	ggctggcgt	gatctggggc	600
agcgagacca	cctactacaa	cagcggccctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac	660
agcaagagcc	aggtgttct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720
tactgtgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
accagcgtga	ccgtgtccag	caagcccacc	accacccctg	cccctagacc	tccaacccca	840
gcccctacaa	tcgcccagcca	gcccctgagc	ctgaggcccg	aagcctgtag	acctgcccgt	900
ggcggagccg	tgcacaccag	aggcctggat	ttcgctg	acatctacat	ctggccccc	960
ctggccggca	cctgtggcgt	gctgctgctg	agcctggtca	tcaccctgta	ctgcaaccac	1020
cggaatagga	gcaagcggag	cagaggcggc	cacagcgact	acatgaacat	gaccccccgg	1080
aggcctggcc	ccacccggaa	gcactaccag	ccctacgccc	ctcccaggga	cttcggccgc	1140
taccggagcc	gggtgaagtt	cagccggagc	gccgacgccc	ctgcctacca	gcagggccag	1200
aaccagctgt	acaacgagct	gaacctggc	cgagggagg	agtacgacgt	gctggacaag	1260
cggagaggcc	gggaccctga	gatggcggc	aagccccgga	gaaagaaccc	tcaggaggc	1320
ctgtataacg	aactgcagaa	agacaagatg	gccgaggcct	acagcgagat	cggcattgaag	1380
ggcgagcggc	ggaggggcaa	gggccacgac	ggcctgtacc	agggcctgag	caccggccacc	1440
5	aaggataacct	acgacgccc	gcacatgcag	gccctgcccc	ccagatga	1488

<210> 6

<211> 1380

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

5

<400> 6

atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgtgagctgc	cccaccccg	ctttctgctg	60
atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcccacgc	gggcgaccgg	120
gtgaccatca	gctgccggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180
aagcccgacg	gcaccgtcaa	gctgctgatc	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg	240
cccagccgt	ttagcggcag	cggctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300
gagcaggagg	acatcgccac	ctactttgc	cagcagggca	acacactg	ctacacctt	360
ggcggcggaa	caaagctgga	gatcacccgc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420
ggcgaggggca	gcaccaaggg	cgaggtgaag	ctgcaggaga	gcggccctgg	cctggtgcc	480
cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgtacc	gtgtccggcg	tgtccctgca	cgactacggc	540
gtgtcctgga	tccggcagcc	cccttaggaag	ggcctggagt	ggctggcgt	gatctggggc	600
agcgagacca	cctactacaa	cagcgcctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac	660
agcaagagcc	aggtgttcct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720
tactgtgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
accagcgtga	ccgtgtccag	cgagagcaag	tacggccctc	cctggccccc	ttggcccttc	840
tgggtgctgg	tcgtggtggg	tggcgtgctg	gcctgctaca	gcctgctggt	gacagtggcc	900
ttcatcatct	tttgggtgag	gagcaagcgg	agcagaggcg	gccacagcga	ctacatgaac	960
atgacccccc	ggaggcctgg	ccccacccgg	aagcactacc	agccctacgc	ccctcccagg	1020
gacttcgccc	cctaccggag	ccgggtgaag	ttcagccgg	gcccacgc	ccctgcctac	1080
cagcaggggcc	agaaccagct	gtacaacgag	ctgaacctgg	gcggagggg	ggagtacgac	1140
gtgctggaca	agcggagagg	ccgggaccct	gagatggcg	gcaagcccg	gagaaagaac	1200
cctcaggagg	gcctgtataa	cgaactgcag	aaagacaaga	tggccgaggc	ctacagcag	1260
atcggcatga	agggcgagcg	gcggaggggc	aaggccacg	acggcctgta	ccagggcctg	1320
agcaccgc	ccaaggatac	ctacgacg	ctgcacatgc	aggccctgca	ccccagatga	1380

10 <210> 7

<211> 1383

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

5 <400> 7

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgcc	60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgcacgcct gggcgaccgg	120
gtgaccatca gctgccggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
cccagccgt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
gagcaggagg acatcgccac ctactttgc cagcagggca acacactgccc ctacaccttt	360
ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
ggcgaggggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtgcc	480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgcctgtacc cgcactacggc	540
gtgtcctgga tccggcagcc cccttaggaag ggcctggagt ggctggcgt gatctgggc	600
agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
agcaagagcc aggtgttccct gaagatgaac agcctgcaga cgcacgacac cgccatctac	720
tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccaggggc	780
accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttggcccttc	840
tgggtgctgg tcgtggtggg tggcgtgctg gcctgctaca gcctgctggt gacagtggcc	900
ttcatcatct ttgggtgaa gagaggccgg aagaaactgc tgtacatctt caagcagccc	960
ttcatgcggc ccgtgcagac cacccagggaa gaggacggct gcagctgccc gttccccgag	1020
gaagaggaag gcggctgcga actgcgggtg aagttcagcc ggagcggcga cgccccctgcc	1080
taccagcagg gccagaacca gctgtacaac gagctgaacc tgggccggag ggaggagttac	1140
gacgtgctgg acaagcggag agggccggac cctgagatgg gcggcaagcc ccggagaaag	1200
aaccctcagg agggcctgta taacgaactg cagaaagaca agatggccga ggcctacagc	1260
gagatcggca tgaagggcga gcggcggagg ggcaagggcc acgacggcct gtaccaggcc	1320
ctgagcaccg ccaccaagga tacctacgac gccctgcaca tgcaggccct gccccccaga	1380
tga	1383

10 <210> 8

<211> 720

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 8

atctgcgaca tccagatgac ccagagccct gccagcctgt ctaccagcct gggcgagaca	60
gtgaccatcc agtgtcaggc cagcgaggac atctactctg gcctggctt gatatcagcag	120
aagcccggca agagccctca gctgctgatc tacggcgcca gcgaccctgca ggacggcggt	180
ccaaggcagat tcagcggcag cggctccgga acccagtaca gcctgaagat caccagcatg	240
cagaccgagg acgagggcgt gtacttctgc cagcaaggcc tgacctaccc tagaaccttc	300
ggaggaggca ccaagctgga actgaagggc ggaggcgaa gtggaggcgg aggatctggc	360
ggcggaggct ctgaagtgca gctgcagcag tctggcgctg aactggtccg gcctggcact	420
agcgtgaagc tgtcctgcaa ggtgtccggc gacaccatca ctttctacta catgcacttc	480
gtgaagcaga gcccaggaca gggcctggaa tggatcggca gaatcgaccc tgaggacgag	540
agcaccaagt acagcgagaa gttcaagaac aaggccaccc tgaccgccc caccagcagc	600
aacaccgcct acctgaagct gtctagcctg acctccgagg acaccgcccac ctactttgc	660
atctacggcg gctactactt cgactactgg ggccaggcg tgatggcac cgtgtccagc	720

10

<210> 9

<211> 741

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 9

ctgatccccg acatccagat gacccagacc acctccagcc tgagcgccag cctggcgac	60
cgggtgacca tcagctgccg ggccagccag gacatcagca agtacctgaa ctggtatcag	120
cagaagcccg acggcaccgt caagctgctg atctaccaca ccagccggct gcacagcggc	180
gtgcccagcc ggtagcgccg cagcggtcc ggacccgact acagctgac catctccaa	240
ctggagcagg aggacatcgc cacctacttt tgccagcagg gcaacacact gccctacacc	300
tttggcggcg gaacaaagct ggagatcacc ggacccacct ccggcaggcg caagcctggc	360
agcggcgagg gcagcaccaa gggcgaggtg aagctgcagg agagcggccc tggcctggtg	420
gccccccagcc agagcctgag cgtgacctgt accgtgtccg gcgtgtccct gcccgactac	480
ggcgtgtcct ggatccggca gccccctagg aagggcctgg agtggctggg cgtgatctgg	540
ggcagcggaga ccacctacta caacagcgcc ctgaagagcc ggctgaccat catcaaggac	600
aacagcaaga gccagggttt cctgaagatg aacagcctgc agaccgacga caccgcccac	660
tactactgtg ccaaggacta ctactacggc ggagctacg ccatggacta ctggggccag	720
ggcaccagcg tgaccgtgtc c	741

<210> 10

<211> 723

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 10

cagatcgtgc tgacccagag ccccgccatc atgagcgcca gcccctggcga gaagggtgacc	60
atgacctgca gcgccagcag cagcgtgagc tacatgaact ggtatcagca gaagagcggc	120
accagccccca agcggtgat ctacgacacc agcaagctgg ccagcggcgt gcccggccac	180

ttcagggca gcggatctgg gacttcctac tctctgacca tcagcggcat ggaagccgag	240
gatgccgcta cttaactactg ccagcagtgg agcagcaacc cttcacctt cggctccggc	300
accaagctgg aaatcaaccg gggaggcggc ggttccggcg gaggtggctc tggcggtggc	360
ggaagtcaagg tgcagctgca gcagagcgg a cccgagctgg ccagacctgg cgcctccgtg	420
aagatgagct gcaaggccag cggctacacc ttcacccggt acaccatgca ctgggtgaag	480
cagagacccg gccaggccct ggaatggatc ggctacatca a ccccagccg gggctacacc	540
aactacaacc agaagttcaa ggacaaggcc accctgacca cgcacaagag cagcagcacc	600
gcctacatgc agctgtccag cctgacctcc gaggacagcg ccgtgtacta ctgcgcccgg	660
tactacgacg accactactg cctggactac tggggccagg gcaccacact gaccgtgagc	720
agc	723

<210> 11	
<211> 735	
5 <212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido sintético	
10 <400> 11	
ctgatccccg acgtgcagat caccagagc cccagctacc tggccgcccag ccctggcgag	60
acaatcacca tcaactgccc ggccagcaag agcatcagca aggacctggc ctggtatcag	120
aaaaagcccg gcaagaccaa caagctgctg atctacagcg gcagcaccct gcagagcggc	180
atccccagca gattcagcgg cagcggctcc ggaaccgact tcaccctgac catcagcagc	240
ctggAACCCG aggacttcgc catgtactac tgccagcagc acaacaagta cccctacacc	300
ttcggcggag gcaccaagct ggaaatcaag ggcagcacct ccggcagcgg caagcctggc	360
agcggcggagg gcagcaccaa gggccaggtg cagctgcagc agccaggcgc cgagctggtg	420
aaacctggcg cccctgtgaa gctgagctgc aaggccagcg gctacacctt caccaactac	480
tggatgaact ggatcaagca gaggccggc agaggcctgg aatggatcgg cagaatcgac	540
cccagcgcaca gcgagagcca ctacaaccag aagttcaagg acaaggccac actgaccgtg	600
gacaagagca gcaacaccgc ctacatccag ctgtttctc tgaccagcga ggacagcggc	660
gtgtactatt gcgccagata cgactacgac gacaccatgg actactgggg ccagggcacc	720
agcgtgacccg tgtct	735

<210> 12
 <211> 810
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 12

atggatttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgcctcagt cataatgtct	60
agaatggccc aggtgcaact gcagcagtca ggggctgagc tggctagacc tggggcttca	120
gtgaagatgt cctgcaaggc ttctggctac acctttacta cctacacaat acactggta	180
agacggagggc ctggacacga tctggaatgg attggataca ttaatcttag cagtggatgt	240
tctgactaca atcaaaaactt caagggcaag accacattga ctgcagacaa gtcctccaac	300
acagcctaca tgcaactgaa cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca	360
agaagagcgg actatggtaa ctacgaatat acctggtttg cttactgggg ccaagggacc	420
acggtcacccg tctcctcaag tggaggcggt tcaggtggag gtggctctgg cggtggcgga	480
tcggtcatcg agctcaactca gtctccaaaa ttcatgtcca catcagtagg agacagggtc	540
aacgtcacct acaaggccag tcagaatgtg ggtactaatg tagcctggtt tcaacaaaaa	600
ccagggcaat ctcctaaagt tctgattac tcggcatctt accgatacag tggagtccct	660
gatcgcttca caggcagtgg atctggaaca gatttcactc tcaccatcag caatgtgcag	720
tctgaagact tggcagagta tttctgtcag caatatcaca cctatcctct cacgttcgga	780
ggggcacca agctggaaat caaacggtcg	810

15 <210> 13
 <211> 735
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 13

caggtgcagc	tgggtgcagag	cggcggcggc	ctgggtgcagc	atggcggcag	cctgcgcctg	60
agctgcgcgg	cgagcggctt	tacctttagc	actatgaaa	tgaactgggt	gcgccaggcg	120
ccgggcaaag	gcctggaatg	ggtgagcggc	attagcggca	gcggcggcag	cacctattat	180
gcggatagcg	tgaaaggccg	ctttacccccc	attagccgcg	ataacagcaa	aaacaccctg	240
tatctgcaga	tgaaccgcct	gcgcgcggaa	gataccgcgg	tgtattatttgc	cgcgcgcat	300
aacggctggg	aactgaccga	ttgggtatttt	gatctgtggg	gccgcggcac	catggtgacc	360
gtgagcagcg	gcggcggcgg	cagcggcggc	ggcggcagcg	gcggcggcgg	cagcgatatt	420
cagatgaccc	agagccccgag	caccctgagc	gogagcatttgc	gcgatcgctgt	gaccattacc	480
tgccgcgcga	gcgaaggcat	ttatcattgg	ctggcgtgg	atcagcagaa	accgggcaaa	540
gcggcggaaac	tgctgattta	taaagcgagc	agcctggcga	gcggcgcgc	gagccgcctt	600
agcggcagcg	gcagcggcac	cgattttacc	ctgaccatta	gcagcctgca	gccggatgtat	660
tttgcgacct	attattgcca	gcagtatacg	aactatccgc	tgacccttgg	cgccggcacc	720
aaactggaaa	ttaaa					735

5 <210> 14
 <211> 747
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 14

gacgttgtga tgacccagac ccctctgagc ctgcctgtgt ccctgggaga tcaggccagc	60
atcagctgca gaagcagcca gagcctgctg aagaacaacg gcaacacacctt cctgcactgg	120
tatctgcaga agtccggcca gtcccccaag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggctg	180
agcggcgtgc ccgatagatt ttctggctct ggcagcggca cctacttcac cctgaagatc	240
agccgggtgg aagccgagga cctggcgtg tacttctgtta gccagagcac ccacatccct	300
tacaccttcg gcggaggcac caagctggaa ctgaagcggg gcagcaccc tcggcagcggc	360
aagcctggca gcggcgaggg cagcaccaag ggcgaagtga agctggtgaa aagcggcggg	420
ggcctggtgc tgctggcga ttctctgaga ctgagctgog ccaccagcga gttcaccc	480
accgactact acatgacctg ggtgcgccag ccccccagaa aggctctgga atggctggc	540
ttcatccgga accgggccaa cggctacacc accgagtaca accctagcgt gaaggccgg	600
ttcaccatca gccgggacaa cagccagagc atcctgtacc tgcagatgaa caccctgcgg	660
accgaggaca gcgccaccta ctactgtgct cgggtgtcca actgggcatt cgactattgg	720
ggccaggcga ccaccctgac cgtgtct	747

<210> 15

<211> 759

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 15

gacatcaaga tgacccagag ccccaagctct atgtacgcca gcctggcga ggcgtgacc	60
atcacctgta aagccagccc cgacatcaac agtacacctga gctggttcca gcagaagccc	120
ggcaagagcc ccaagaccct gatctaccgg gccaacagac tggtgatgg cgtgccagc	180
agattcagcg gcgaggcgc tggccaggac tacagcctga ccatcaactc cctgaaatac	240
gaggacatgg gcatctacta ctgcctgcag tacgacgagt tccctacac ctgcggaggc	300
ggcaccaagc tggaaatgaa gggcagcaca agcggcagcg gcaagcctgg atctggcag	360

ggaagcacca	agggcgaagt	gaagctggtg	aatctggcg	gcggactcgt	gaagcctggc	420
ggctctctga	agctgtcttg	tgccgccagc	ggcttcacct	tcagcagcta	cgccatgagc	480
tgggtgcggc	agatccccga	gaagcggctg	aatgggtgg	ccagcatcag	cagaggcgg	540
accacctact	accggactc	tgtgaagggc	cggttcacca	tcagccggga	caacgtgcgg	600
aacatcctgt	acctgcagat	gagcggctg	cggagcgagg	acaccggcat	gtactactgt	660
ggcagatacg	actacgcagg	ctactatgcc	atggattact	ggggccaggg	caccagcgtg	720
accgtgtcta	gccagggAAC	ctccgtgaca	gtgtccagc			759

<210> 16

<211> 759

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 16

gaagtacatc	tggttgagtc	tggtgagac	ttagtgaagc	ctggagggtc	cctgaaactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cactttcagt	cactatggca	tgtcttgggt	tcgcccagact	120
ccagacaaga	ggctggagtg	ggtcgcaacc	attggtagtc	gtggtaactta	cacccactat	180
ccagacagtg	tgaagggacg	attcaccatc	tccagagaca	atgacaagaa	cgcctgtac	240
ctgcaaatga	acagtctgaa	gtctgaagac	acagccatgt	attactgtgc	aagaagaagt	300
gaattttatt	actacggtaa	tacctactat	tactctgcta	tggactactg	gggccaaggc	360
accacggtca	ccgtctcctc	aggtggcggt	ggcagcggcg	gtggtgggtc	cggtggcgcc	420
ggatctgaca	tcgtactcac	acagtctcca	gctagcctgg	ctgtatctct	aggacagagg	480
gccaccatct	cctgcagagc	cagcgaaagt	gttgataatt	atggctttag	ttttatgaac	540
tggttccaac	agaaaccagg	acagccaccc	aaactcctca	tctatgctat	atccaaccga	600
ggatccgggg	tccctgccag	gttttagtggc	agtgggtctg	ggacagactt	cagcctcaac	660
atccatcctg	tagaggagga	tgtacccctgca	atgtatttct	gtcagcaaac	taaggaggtt	720
ccgtggacgt	tcggagctgg	caccaagctc	gagatcaaa			759

15 <210> 17

<211> 543

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 17

5	atggccatct ggccggagcaa cagcggcagc aacaccctgg aaaacggcta cttcctgagc	60
	cggaacaaag agaaccacag ccagcccacc cagagcagcc tggaaagatag cgtgaccccc	120
	accaaggccg tgaaaaccac cggcgtgctg tccagccctt gccctcccaa ctggatcatc	180
	tacgagaaga gctgctaccc ttccagcatg agcctgaaca gctgggacgg cagcaagcgg	240
	cagtgctggc agctgggcag caaccctgctg aagatcgaca gcagcaacga gctgggcttc	300
	atcgtaagc aggtgtccag ccagcccgac aactccttctt ggatcggcctt gaggcaggccc	360
	cagaccgagg tgccctggctt gtgggaggac ggctccaccc tcagctccaa cctgttccag	420
	atccggacca ccgccacaca ggaaaacccc agccccaact gcgtgtggat ccacgtgagc	480
	gtgatctacg accagctgtg cagcgtgccc agctacagca tctgcgagaa gaaattcagc	540
	atg	543

10 <210> 18

<211> 987

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 18

atggatttc	aggtgcagat	tttcagcttc	ctgctaata	gtgcctcagt	cataatgtct	60
agacaattcc	aagtgaagct	ggaggagtct	ggggctgagc	ttgtgaggcc	aggggccttg	120
gtcaagttgt	cctgcaaaac	ttctggcttc	aacattaaag	actactttt	acactgggtg	180
agacagaggc	ctgaccaggg	cctggagtgg	attggatgga	ttaatcctga	taatggtaat	240
actgttatg	acccgaagct	tcagggcacg	gccagttaa	cagcagacac	atcctccaac	300
acagtctact	tgcagctcag	cggcctgaca	totgaggaca	ctgccgtcta	tttctgtact	360
cgaggggact	atacttatga	aaaggctgct	ctggactact	ggggtcaggg	agcctcagtc	420
atcgctccct	cagccaaaac	aacagccccca	tccgtctatc	cactggcccc	tgtgtgtgga	480
gatacaactg	gctcctcggt	gactctagga	tgcctggtca	agagatctgg	cggtggcggt	540
tctggtggcg	gtggctccgg	cggtggcggt	tctggagctc	gacattgtgc	tcacacagac	600
tccaaatcca	tgtccatgtc	agtaggagag	agggtcacct	tgacctgcaa	ggccagtgag	660
aatgtggta	cttatgtttc	ctggtatcaa	cagaaaccag	agcagtctcc	taaactgctg	720
atatacgggg	catccaaccg	gtacactggg	gtccccgatc	gcttcacagg	cagtggatct	780
gcaacagatt	tcactctgac	catcagcagt	gtgcaggctg	aagaccttgc	agattatcac	840
tgtggacagg	gttacagcta	tccgtacacg	ttcggagggg	ggaccaagct	gaaataaaa	900
cgggctgatg	ctgcaccaac	ttatccgcat	caccatcatc	atcatcatct	gcagatatcc	960
agcacagtgg	cggccgctcg	agtctag				987

<210> 19

<211> 753

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 19

ctgatccccca tggcccaggt gaagctgcag cagagcggcc ctgatctggt gaagcctggc	60
gccagcgtga agatcagctg caaggccagc ggctacagct tcaccggcta ctacatgcac	120
tgggtgaaac agagccacgg caagagcctg gaatggatcg gcagagtcaa ccccaatagc	180
ggcggcacca gctacaacca gaagttcaag gacaaggcca tcctgaccgt ggacaagagc	240
agcagcaccg cctacatgga actgcggagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac	300
tgcgcccgtt ccaagggcaa ctacttctac gccatggact actggggcca gggcaccacc	360
gtgaccgtgt ctagcagcgg cggaggaagc ggagggggag gatctggcgg aggccggcagc	420
gatatcgagc tgacccagag ccctagcagc ctggccgtgt cactggggca gagagccacc	480
atcagctgca gagcctccga gagcgtggat agccacggca ccagctgtat gcactggat	540
cagcagaagc ccggccagcc ccccaagttc ctgatctacc gggccagcaa cctggaaagc	600
ggcatccccg ccagatttc cggcagcggc agcagaacccg acttcaccct gaccatcaac	660
cccggtggaga cagacgacgt ggccatctac tactgccagc agagcaacga ggaccctccc	720
acctttggcg gaggcaccaa gctggaaactg aag	753

<210> 20

<211> 732

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 20

gaagtgcagc tgggtgaaatc tggcggcgga ctgggtgcagc ctggcggatc tctgagactg	60
agctgtgccg ccagcggctt cgacttcagc cggtaactggta tgagctgggt ggcggcaggcc	120
cctggcaaag gcctggaaatg gatcggcgag atcaaccccg acagcagcac catcaactac	180
gcccccaagcc tgaaggacaa gttcatcatc agccgggaca acgccaagaa cagcctgtac	240
ctgcagatga actccctgcg ggccgaggac accgcccgtgt actattgcgc cagacccgac	300
ggcaactact ggtacttcga cgtgtggggc cagggcaccc tcgtgacagt gtctggcagc	360
acaagcggct ctggcaagcc tggatctggc gagggctcta ccaagggcga catccagatg	420
acccagagcc ccagcagcct gtctgcgcagc gtggggcaca gagtgaccat cacatgcaag	480
gccagccagg acgtggaaat cggccgtggcc tggatctcagc agaaacccgg caaggtgccc	540
aagctgctga tctactgggc cagcaccaga cacacccggcg tgcccgatag attttccggc	600

agcggctccg	gcaccgactt	caccctgaca	atcagctccc	tgcagcctga	ggacgtggcc	660	
acctactact	gccagcagta	cagcagctac	ccctacacacct	tcggacaggg	caccaaggta	720	
gaaaatcaagc	gg					732	
5	<210> 21	<211> 720	<212> ADN	<213> Secuencia artificial			
10	<220>	<223> Oligonucleótido sintético	<400> 21				
	caggtgcagc	tgcagcagtc	tggcccccag	ctggaaaaac	ctggggcctc	cgtgaagatc	60
	agctgcaagg	ccagcggcta	cagttcacc	ggctacacca	tgaactgggt	caagcagagc	120
	cacggcaaga	gccttggatg	gatcggcctg	atcacccccct	acaacggcgc	cagcagctac	180
	aaccagaagt	tccggggcaa	ggccaccctg	accgtggaca	agtcttagcag	caccgcctac	240
	atggacactgc	ttagcctgac	cagcgaggac	agcgccgtgt	acttctgtgc	cagaggcggc	300
	tacgacggca	gaggcttcga	ttattggggc	cagggcacca	ccgtgacagt	gtctagcgga	360
	gtgggaggat	ctggcggagg	cggaagtggc	ggagggggat	ctgatatcga	gctgaccagg	420
	agccccggcca	tcatgtctgc	tagccctggc	gagaaagtga	ccatgacactg	cagcgccagc	480
	tccagcgtgt	cctacatgca	ctggtatcag	cagaagtccc	gcaccagccc	caagcgggtgg	540
	atctacgaca	caagcaagct	ggcctctggc	gtgcccggca	gattttctgg	cagcggctcc	600
	ggcaacagct	actccctgac	aatcagcagc	gtggaagccg	aggacgacgc	cacctactac	660
	tgccagcagt	ggagcggcta	ccccctgact	tttggagccg	gcaccaagct	ggaaatcaag	720
15	<210> 22	<211> 60	<212> ADN	<213> Secuencia artificial			
20	<220>	<223> Oligonucleótido sintético	<400> 22				
25	agccaggaag	agatgaccaa	gaaccaggtg	tccctgacct	gcctcgtgaa	gggcttctac	60
	<210> 23	<211> 141	<212> ADN				

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 23
 aagcctacca caacccctgc ccccagacct cctacacccg cccctacaat tgccagccag 60
 cctctgtctc tgaggcccga ggctttaga cctgctgctg gcggagccgt gcacaccaga 120
 ggactggatt tcgcctgcga c 141

10 <210> 24
 <211> 696
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 24
 agcgagagca agtacggccc tccctgcccc cttgcctg ccccgagtt cttggcgga 60
 cccagcgtgt tcctgttccc ccccaagccc aaggacaccc tggatgtcag cgggacccc 120
 gaggtgacct gtgtgggtggt ggacgtgtcc caggaggacc cggaggtcca gttcaactgg 180
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgccc aagaccaagg cccgggagga gcagttcaat 240
 agcacctacc gggtgtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 300
 gaatacaagt gtaaggtgtc caacaagggc ctgcccagca gcatcgagaa aaccatcagc 360
 aaggccaagg gccagcctcg ggagccccag gtgtacaccc tgccccctag ccaagaggag 420
 atgaccaaga atcaggtgtc cctgacctgc ctggtaagg gcttctaccc cagcgacatc 480
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccccgtg 540
 ctggacagcg acggcagctt cttccgtac agcaggctga cggtgacaa gagccggtgg 600
 caggaggcga acgtcttag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 660
 20 cagaagagcc tgcctgag cttggcaag atgttc 696

<210> 25
 <211> 60
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

30 <400> 25
 agccaggaag agatgaccaa gaaccagggtg tccctgacct gcctcgtaa gggcttctac 60

<210> 26
 <211> 696
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 26

10	agcgagagca agtacggccc tccctgcccc cttgcacctg ccccccagtt cctggggcgga	60
	cccaagcgtgt tccctgttccc ccccaagccc aaggacaccc tggatgtatcg ccggacccccc	120
	gaggtgaccc ttgtgggtggt ggacgtgtcc caggaggacc ccgaggtcca gttcaactgg	180
	tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgccc aagaccaagg cccggggagga gcagttccag	240
	agcacctacc ggggtgggtgc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag	300
	gaataacaagt gtaaggtgtc caacaagggc ctgcccagca gcacatcgagaa aaccatcagc	360
	aaggccaagg gccagcctcg ggagccccag gtgtacaccc tgccccctag ccaagaggag	420
	atgaccaaga atcaggtgtc cctgacctgc ctggtaagg gtttctaccc cagcgacatc	480
	gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccccgtg	540
	ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaggctga ccgtggacaa gagccgggtgg	600
	caggaggcga acgtcttag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc	660
	cagaagagcc tgtccctgag cctggcaag atgttc	696

15 <210> 27
 <211> 696
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 27

agcgagagca agtacggccc tccctgcccc ccttgccctg ccccccagtt cgaaggcggaa	60
cccagcgtgt tcctgttccc ccccaagccc aaggacaccc tgatgatcag ccggacccccc	120
gaggtgacct gtgtgggtgt ggacgtgtcc caggaggacc ccgaggtcca gttcaactgg	180
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc cccgggagga gcagttccag	240
agcacctacc gggtgtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag	300
gaataacaagt gtaagggtgtc caacaagggc ctgcccagca gcatcgagaa aaccatcagc	360
aaggccaagg gccagcctcg ggagccccag gtgtacaccc tgccccctag ccaagaggag	420
atgaccaaga atcagggtgtc cctgacactgc ctggtaagg gcttctaccc cagcgacatc	480
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccccgtg	540
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaggctga ccgtggacaa gagccggtgg	600
caggagggca acgtctttag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc	660
cagaagagcc tgtccctgag cctgggcaag atgttc	696

<210> 28

<211> 711

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 28

atggtgtcca agggcgagga actgatcaaa gaaaacatgc acatgaagct gtacatggaa	60
ggcacccgtga acaaccacca cttcaagtgc accagcgagg gagagggcaa gccctacgag	120
ggcacccaga ccatgoggat caaggtggtc gagggoggac ctctgcctt cgccttcgac	180
atcctggcca caagttcat gtacggcagc aagaccttca tcaaccacac ccagggcatc	240
cccgatttct tcaagcagag cttcccgag ggcttcacct gggagagagt gaccacctac	300
gaggacggcg gcgtgctgac cgcacccag gacaccagcc tgcaggacgg ctgcctgatc	360
tacaacgtga agatccgggg cgtgaacttc cccagcaacg gccccgtgat gcagaagaaa	420
accctggct gggaggccag caccgagatg ctgtaccctg ccgatggcgg cctggaaaggc	480
agagccgaca tggccctgaa actggtcggc ggagggcacc tgatctgcaa cctgaaaacc	540
acctacagaa gcaagaagcc cgccaagaac ctgaagatgc ccggcgtgta ctacgtggac	600
cggcggctgg aaaggatcaa agaggccgac aaagaaaacct acgtggagca gcacgaggtg	660
gccgtggccc ggtactgcga cctgcctcc aagctgggcc acaaaactgaa c	711

<210> 29
 <211> 333
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 29

atgatcgaga	agtccctcggt	gatcaccgac	ccccggctgc	ccgactaccc	tatcatcttt	60
gccagcgacg	gcttcctgga	actgaccgag	tacagccggg	aagagatcat	gggcccggAAC	120
gccagattcc	tgcagggccc	cgaaaccgat	caggccaccg	tgcagaagat	ccgggacGCC	180
atcagggacc	agccggaaac	cacagtgcag	ctgatcaact	acaccaagag	cgcaagaag	240
ttctggaacc	tgcgtcatct	gcagccgtg	cggatagaa	agggccgcct	gcagtacttc	300
atcggcgtgc	agctcggtgg	cagcgaccac	gtg			333

<210> 30
 15 <211> 675
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 30

atggccagca	gcgaggacgt	gatcaaagaa	ttcatcggt	tcaaagtgcg	gatggaaaggc	60
agcgtgaacg	gccacgagtt	cgagattgag	ggcgagggcg	aaggcagacc	ctacgagggaa	120
acacagaccg	ccaagctgaa	agtgaccaag	ggcggacccc	tgccttcgc	ctggatatac	180
ctgagccccc	atttccagta	cggcagcaag	gtgtacgtga	agcacccgc	cgacatcccc	240
gactacaaga	agctgagctt	ccccgagggc	ttcaagtggg	agagagtgtat	gaacttcgag	300
gacggcggcg	tcgtgaccgt	gacccaggat	agctctctgc	aggacggcag	cttcatactac	360
aaagtgaagt	ttatcggt	gaacttcccc	agcgacggcc	ccgtgatgca	aaaaaaagacc	420
atgggctggg	aggccagcac	cgagagactg	taccctagag	atggcgtgct	gaagggcggag	480
atccacaagg	ccctgaagct	gaaggatggc	ggccactacc	tggtgaaatt	caagagcatc	540
tacatggcca	agaaacccgt	gcagctgccc	ggctactact	acgtggacag	caagctggac	600
atcaccagcc	acaacgagga	ctacaccatc	gtgaaacagt	acgagcgggc	cgagggccgg	660
25 caccatctgt	ttctg					675

<210> 31
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 31

10

atggtgtcca	agggcgagga	actgttcacc	ggcgtggtgc	ccatcctgg	gaaactggat	60
ggcgacgtga	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg	gcgaaggcga	cggcacat	120
ggcaagctga	ccctgaagct	gatctgcacc	accggcaagc	tgccctgtcc	ttggcctacc	180
ctcgtgacca	cactgggcta	cggcctgcag	tgcttcgcca	gataccccga	ccatatgaag	240
cagcacgact	tcttcaagag	cggcatgccc	gagggctacg	tgcaggaacg	gaccatctc	300
ttaaggacg	acggcaacta	caagaccagg	gccgaagtga	agttcgaggg	cgacaccctc	360
gtgaaccgga	tcgagctgaa	gggcacatcgac	ttcaaagagg	acggcaacat	cctggccac	420
aagctggagt	acaactacaa	cagccacaac	gtgtacatca	ccgcccacaa	gcagaagaac	480
ggcatcaagg	ccaacttcaa	gatccggcac	aacatcgagg	acggcggcgt	gcagctggcc	540
gatcaactacc	agcagaacac	ccctatcgcc	gacggccctg	tgctgctgcc	cgacaatcac	600
tacctgagct	accagagcgc	cctgagcaag	gaccccaacg	agaagcggga	ccacatggtg	660
ctgctggaat	tcgtgaccgc	cgctggcatc	accctggca	tggacgagct	gtacaag	717

<210> 32

<211> 717

15

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

20

<400> 32

atggtgagca	aggcgagga	gctgttacc	gggggtggtgc	ccatcctgg	cgagctggac	60
ggcgacgtaa	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg	gcgagggcga	tgccacctac	120
ggcaagctga	ccctgaagtt	catctgcacc	accggcaagg	tgccctgtgc	ctggcccacc	180
ctcgtagcca	ccctgaccta	cggcgtgcag	tgcttcagcc	gctaccccg	ccacatgaag	240
cagcacgact	tcttcaagtc	cgccatgccc	gaaggctacg	tccaggagcg	caccatcttc	300
ttcaaggacg	acggcaacta	caagacccgc	gccgaggtga	agttcgaggg	cgacaccctg	360
gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcacatcgac	ttcaaggagg	acggcaacat	cctggggcac	420
aagctggagt	acaactacaa	cagccacaac	gtctatata	tggccgacaa	gcagaagaac	480
ggcatcaagg	tgaacttcaa	gatccggcac	aacatcgagg	acggcagcgt	gcagctcgcc	540
gaccactacc	agcagaacac	ccccatcg	gacggccccg	tgctgtgc	cgacaaccac	600
tacctgagca	cccagtccgc	cctgagcaaa	gaccccaacg	agaagcgcga	tcacatggc	660
ctgctggagt	tcgtgaccgc	cgccgggatc	actctcg	tggacgagct	gtacaag	717
<210> 33						
<211> 363						
5	<212> ADN					
<213> Secuencia artificial						
<220>						
<223> Oligonucleótido sintético						
10	<400> 33					
gccaagggcc						
agcctcg						
gccccaggtg						
tacaccctgc						
cccctagcca						
agaggagatg						
60						
accaagaatc						
aggtgtccct						
gacctgcctg						
gtgaagggct						
tctacccag						
cgacatcgcc						
120						
gtggagtgg						
agagcaacgg						
ccagcccgag						
aacaactaca						
agaccacccc						
ccctgtgc						
180						
gacagcgacg						
gcagcttctt						
cctgtacagc						
aggctgacccg						
tggacaagag						
cgggtggcag						
240						
gagggcaacg						
tcttagctg						
ctccgtgatg						
cacgaggccc						
tgcacaacca						
ctacacccag						
300						
aagagcctgt						
ccctgagcct						
gggcaagatg						
ttctacccat						
acgatgttcc						
agattacgct						
360						
tac						
363						
15	<210> 34					
<211> 708						
<212> ADN						
<213> Secuencia artificial						
20	<220>					
<223> Oligonucleótido sintético						
<400> 34						

atggtgagca	agggcgagga	gaccacaatg	ggcgtaatca	agcccgacat	gaagatcaag	60
ctgaagatgg	aggcaacgt	aatggccac	gccttcgtga	tcgagggcga	ggcgagggc	120
aagccctacg	acggcaccaa	caccatcaac	ctggaggtga	aggagggagc	ccccctgccc	180
ttctcctacg	acattctgac	caccgcgttc	gcctacggca	acagggcctt	caccaagtac	240
cccgacgaca	tccccaacta	cttcaagcag	tccttccccg	agggtactc	ttgggagcgc	300
accatgacct	tcgaggacaa	ggcgtcgta	aaggtaagt	ccgacatctc	catggaggag	360
gactccttca	tctacgagat	acacctcaag	ggcgagaact	tccccccaa	cgccccctg	420
atgcagaaga	agaccaccgg	ctgggacgcc	tccaccgaga	ggatgtacgt	gcgcgacggc	480
gtgctgaagg	gcgacgtcaa	gcacaagctg	ctgctggagg	gcggcggcca	ccaccgcgtt	540
gacttcaaga	ccatctacag	ggccaagaag	gcggtaagc	tgccgacta	tcacttttg	600
gaccaccgca	tcgagatcct	gaaccacgac	aaggactaca	acaaggtgac	cgtttacgag	660
agcgccgtgg	cccgcaactc	caccgacggc	atggacgagc	tgtacaag		708

<210> 35

5 <211> 423

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 35

aagcctacca	caacccctgc	ccccagacct	cctacacccg	ccctacaat	tgccagccag	60
cctctgtctc	tgaggccga	ggctttaga	cctgctgctg	gcggagccgt	gcacaccaga	120
ggactggatt	tcgcctgcga	caagcctacc	acaacccctg	ccccagacc	tcctacaccc	180
gcccctacaa	ttgccagcca	gcctctgtct	ctgaggcccg	aggctttag	acctgctgct	240
ggcggagccg	tgcacaccag	aggactggat	ttcgccctgcg	acagcagcgg	cgccggcggc	300
agcggcggcg	gcggcagcgg	cgccggcggc	agcgcgcagc	tgaaaaaaaa	actgcaggcg	360
ctgaaaaaaaa	aaaacgcgca	gctgaaatgg	aaactgcagg	cgctgaaaaa	aaaactggcg	420
cag						423

15

<210> 36

<211> 423

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 36

aaggctacca	caaccctgc	ccccagacct	cctacacccg	cccctacaat	tgccagccag	60	
cctctgtctc	tgaggcccga	ggctttaga	cctgctgctg	gcggagccgt	gcacaccaga	120	
ggactggatt	tcgcctgcga	caaggctacc	acaacccctg	ccccagacc	tcctacaccc	180	
gcccctacaa	ttgccagcca	gcctctgtct	ctgaggcccg	aggctttag	acctgctgt	240	
ggcggagccg	tgcacaccag	aggactggat	ttcgccctgcg	acagcagcgg	cggcggcggc	300	
agcggcggcgcg	gcggcagcgg	cggcggcggc	agcgcccagc	tggaaaaaga	gctgcaggcc	360	
ctggaaaaag	aaaacgctca	gctggaatgg	gaactgcagg	ctctggaaaa	agagctggcc	420	
cag						423	
5	<210> 37						
	<211> 69						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
10	<220>						
	<223> Oligonucleótido sintético						
	<400> 37						
	tggtgtctgg	tcgtggtggg	tggcgtgctg	gcctgctaca	gcctgctgg	60	
15	ttcatcatc					69	
	<210> 38						
	<211> 81						
	<212> ADN						
20	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
	<223> Oligonucleótido sintético						
25	<400> 38						
	attatctcat	tcttcctggc	cctgacctct	accgcctgc	tgtttctgct	gttctttctg	60
	accctgcgg	tcagcgtgg	g				81
	<210> 39						
30	<211> 84						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia artificial						
	<220>						
35	<223> Oligonucleótido sintético						
	<400> 39						
	atctacatct	ggcgccctt	ggccggact	tgtgggtcc	ttctcctgtc	actggttatc	60
	acccttact	gcaaccacag	gaac				84
40	<210> 40						

<211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 40

10 ctctgctacc tgctggatgg aatcctcttc atctatggtg tcatttcac tgccctgttc 60
 ctg 63

<210> 41
 <211> 144

15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 41

cagcggcgga agtacagaag caacaagggc gagagccccg tggaacctgc cgagccttgc 60
 agatacagct gccccagaga ggaagagggc agcaccatcc caatccagga agattaccgg 120
 aagcccgagc ccgcctgttag ccct 144

25 <210> 42
 <211> 132
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 42

ttttgggtga ggagcaagcg gagcagagggc ggccacagcg actacatgaa catgaccccc 60
 cggaggcctg gccccacccg gaagcactac cagccctacg cccctcccaag ggacttcgcc 120
 35 gcctaccgga gc 132

<210> 43
 <211> 132
 <212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 43

ttttgggtga ggagcaagcg gagcagaggc ggccacagcg acttcatgaa catgacccccc	60
cgaggcctg gccccacccg gaagcactac cagccctacg cccctccag ggacttcgcc	120
gcctaccgga gc	132
<210> 44	
<211> 108	
5 <212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido sintético	
10 <400> 44	
agggaccaga gactgcctcc cgatgcccac aaacctccag gcggcggaag cttcagaacc	60
cccatccagg aagaacaggc cgacgcccac agcaccctgg ccaagatt	108
15	
<210> 45	
<211> 126	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
20 <220>	
<223> Oligonucleótido sintético	
<400> 45	
25 aagcggggca gaaagaagct gctgtacatc ttcaagcagc cttcatgcg gcccgtgcag	60
accacccagg aagaggacgg ctgctcctgc agattcccg aggaagaaga aggccgctgc	120
gagctg	
126	
<210> 46	
<211> 102	
30 <212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
<223> Oligonucleótido sintético	
35 <400> 46	
aagaaaaagt acagcagcag cgtgcacgac cccaacggcg agtacatgtt catgcgggcc	60
gtgaacacccg ccaagaagtc cagactgacc gacgtgaccc tg	102
40 <210> 47	
<211> 336	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
45 <220>	
<223> Oligonucleótido sintético	
<400> 47	

cggtgaagt tcagccggag cgccgacgcc cctgcctacc agcagggcca gaaccagctg	60
tacaacgagc tgaacctggg ccggagggag gagtacgacg tgctggacaa gcggagaggc	120
cgggaccctg agatgggcgg caagccccgg agaaagaacc ctcaggaggg cctgtataac	180
gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tacagcgaga tcggcatgaa gggcgagcgg	240
cggaggggca agggccacga cggcctgtac cagggcctga gcaccgccac caaggataacc	300
tacgacgccc tgcacatgca ggccctgccc cccaga	336
<210> 48	
5 <211> 759	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
<220>	
10 <223> Oligonucleótido sintético	
<400> 48	
gatattcaga tgacccagag cccgagcagc ctgagcgcga gcgtggcga tcgcgtgacc	60
attacctgcc gcagcagcca gaacattgtg catagcaacg gcaacaccta tctggattgg	120
tatcagcaga ccccgccaa agcgccaaa ctgctgattt ataaagttag caaccgcttt	180
agcggcgtgc cgagccgctt tagcggcagc ggcagcggca ccgattttac ctttaccatt	240
agcagcctgc agccggaaga tattgcgacc tattattgct ttcagtatag ccattgtgcag	300
tggaccttg gccagggcac caaactgcag attaccggca gcaccccccgg cagcggcaag	360
cctggcagcg gcgagggcag caccaagggc agccaggtgc agctgcagca gagcggcgcg	420
gaagtgaaaa acccgccag cagcgtaaaa gtgagctgca aagcgagcgg ctataccttt	480
accaactatt atatttattt ggtgcgccag gcgcggggcc agggcctgga atggattggc	540
ggcatttaacc cgaccagcgg cggcagcaac tttaacgaaa aatttaaaac ccgcgtgacc	600
attaccgcgg atgaaagcag caccaccgcg tatatggaac tgagcagcct gcgcagcga	660
gataccgcgt tttattttg caccgcag ggccctgtggg ttgatagcga tggccgcggc	720
tttgattttt gggccaggg caccaccgtg accgtgagc	759
15 <210> 49	
<211> 732	
<212> ADN	
<213> Secuencia artificial	
20 <220>	
<223> Oligonucleótido sintético	
<400> 49	

gatattctgc tgacccagag cccgggtgatt ctgagcgtga gcccgggcga acgcgtgagc	60
tttagctgcc gcgcgagcca gagcattggc accaacattc attggtatca gcagcgcacc	120
aacggcagcc cgccctgct gattaaatat gcgagcgaaa gcattagcgg cattccgagc	180
cgcttagcg gcagcggcag cggcaccat tttaccctga gcattaacag cgtggaaagc	240
gaagatattg cggattatta ttgccagcag aacaacaact ggccgaccac ctttggcgcg	300
ggcaccaaac tggaaactgaa aggcagcacc tccggcagcg gcaaggctgg cagcggcag	360
ggcagcacca agggcagcca ggtgcagctg aaacagagcg gcccgggcct ggtgcagccg	420
agccagagcc tgagcattac ctgcaccgtg agcggctta gcctgaccaa ctagggcgtg	480
cattgggtgc gccagagccc gggcaaaggc ctggaatggc tggcgtgat ttggagcggc	540
ggcaacaccc attataacac cccgttacc agccgcctga gcattaacaa agataacagc	600
aaaagccagg tttttttaa aatgaacagc ctgcagagca acgataaccgc gatttattat	660
tgcgcgcg cgctgaccta ttatgattat gaatttgcgt attggggcca gggcaccctg	720
gtgaccgtga gc	732

<210> 50

5 <211> 726

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 50

gaagtgcagc tgcagcagag cggcccgaa ctggaaaaac cgggcgcgag cgtgaaactg	60
agctgcaaag cgagcggcta tagcttacc ggctataaca tgaactgggt gaaacagagc	120
catggcaaaa gcctggaatg gattggccat attgatccgt attatggcga taccagctat	180
aaccagaaaat ttcgcggcaa agcgaccctg accgtggata aaagcagcag caccgcgtat	240
atgcagctga aaagcctgac cagcgaagat agcgcggtgtt attattgcgt gaaaggcggc	300
tattatggcc attggattt tgatgtgtgg ggcgcgggca ccaccgtgac cgtgagcagc	360
ggcggaggcg gctctggcgg cggaggatca ggtggcggag gatccgatat tcagatgacc	420
cagagccgaa gcagcctgag cgcgaccctg ggcgaacgcg tgagcctgac ctgcccgcg	480
agccaggata ttggcagcag cctgaactgg ctgcagcagg gcccggatgg caccattaaa	540
cgcctgattt atgcgaccag cagcctggat agcggcgtgc cgaaacgcctt tagcggcagc	600
cgcagcggca gcgattatacg cctgaccatt agcagcctgg aaagcgaaga ttttgtggat	660
tattattgcc tgcagtatgt gagcagcccg ccgacccttg ggcgcggcac caaactggaa	720
ctgaaa	726

<210> 51

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 51

Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly
1															
														10	
															15

Gln	Asn	Gln	Ieu	Tyr	Asn	Glu	Ieu	Asn	Ieu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
															20
															25
															30

Asp	Val	Ieu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
															35
															40
															45

Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Ieu	Tyr	Asn	Glu	Ieu	Gln	Lys
															50
															55
															60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 85 90 95

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 52

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 52

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 100 105

15 <210> 53

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 53

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

5 <210> 54
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 54

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
85 90 95

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 55

<211> 2034

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 55

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg	60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg	120
gtgaccatca gctgccggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
gagcaggagg acatcgccac ctactttgc cagcagggca acacactgcc ctacacctt	360
ggcggcggaa caaaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
ggcgaggggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtgcc	480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgccttgcc cgactacggc	540
gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggctggagt ggctggcgt gatctggggc	600
agcgagacca cctactacaa cagcgcctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctggccccc ttggccctgcc	840
cccagttcc tggcgccacc cagcgtgttc ctgttccccc ccaagccaa ggacaccctg	900
atgatcagcc ggaccccgaa ggtgacctgt gtgggtggtg acgtgtccca ggaggacccc	960
gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc	1020
cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtgggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag	1080
gactggctga acggcaagga atacaagtgt aagggtgtcca acaagggcct gcccagcagc	1140
atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcgaa agcccccagggt gtacaccctg	1200
ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacccctgc ggtgaagggc	1260
ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagccga gaacaactac	1320
aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgcac ggcagcttc tcctgtacag caggctgacc	1380
gtggacaaga gccgggtggca ggagggcaac gtcttagct gtcctgtat gcacgaggcc	1440
ctgcacaacc actacaccca gaagagcctg tccctgagcc tggcaagat gttctgggtg	1500
ctggcgtgg tgggtggcgt gctggcctgc tacagcctgc tggtagcgt ggccttcatc	1560
atctttggg tgaggagcaa gcggagcaga ggcggccaca gcgactacat gaacatgacc	1620

ccccggaggc ctggcccac ccggaagcac taccagccct acgcccctcc cagggactc	1680
gcccgcctacc ggagccgggt gaagttcagc cggagcgccg acgcccctgc ctaccagcag	1740
ggccagaacc agctgtacaa cgagctgaac ctgggccgga gggaggagta cgacgtgctg	1800
gacaagcgg aaggccggga ccctgagatg ggcggcaagc cccggagaaa gaaccctcag	1860
gagggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggctacag cgagatcggc	1920
atgaagggcg agcggcggag gggcaagggc cacgacggcc tgtaccaggg cctgagcacc	1980
gccaccaagg atacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgccccccag atga	2034

<210> 56

<211> 2040

5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 56

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tggagctgc cccacccgc ctttctgctg	60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga ggcgcagcct gggcgaccgg	120
gtgaccatca gctgccggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
aagcccacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
cccagccgtt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
gagcaggagg acatcgccac ctactttgc cagcaggca acacactgac ctacacctt	360
ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
ggcgaggggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtgcc	480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgac cgactacggc	540
gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctggcgt gatctggggc	600
agcgagacca cctactacaa cagcgcctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
agcaagagcc aggtgttcct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctggccccc ttggccctgac	840
cccgagttcc tggcgccacc cagcgtgttc ctgttccccc ccaagccaa ggacaccctg	900
atgatcagcc ggaccccgaa ggtgacctgt gtgggtgtgg acgtgtccaa ggaggacccc	960
gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc	1020
cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtgggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag	1080
gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaagggcct gcccagcagc	1140
atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaaaggc cagcctcgaa agcccccagggt gtacaccctg	1200

ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaaggc	1260
ttctacccca gcgacatcg cgtggagtgg gagagcaacg gccagcccgaaacaactac	1320
aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tcctgtacag caggctgacc	1380
gtggacaaga gccgggtggca ggagggcaac gtcttttagct gctccgtgat gcacgaggcc	1440
ctgcacaacc actacacccca gaagagcctg tccctgagcc tggcaagat gatctacatc	1500
tgggcccctc tggccggcac ctgtggcgtg ctgctgctga gcctggcat caccctgtac	1560
tgcaaccacc ggaacaagag aggccggaag aaactgctgt acatcttcaa gcagcccttc	1620
atgcggcccg tgcagaccac ccaggaagag gacggctgca gctgccggtt ccccgaggaa	1680
gaggaaggcg gctgcgaact gcgggtgaag ttcagccgga gcgcccacgc ccctgcctac	1740
cagcagggcc agaaccagct gtacaacgag ctgaacctgg gccggaggga ggagtacgac	1800
gtgctggaca agcggagagg ccgggaccct gagatgggcg gcaagccccg gagaaagaac	1860
cctcaggagg gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgag	1920
atcggcatga agggcgagcg gcggaggggc aagggccacg acggcctgta ccagggcctg	1980
agcaccggcca ccaaggatac ctacgacgcc ctgcacatgc aggccctgcc ccccagatga	2040

<210> 57

<211> 2037

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 57

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg	60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tcagcctga gcgcagcct gggcgaccgg	120
gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
aagcccacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300
gagcaggagg acatcgccac ctactttgc cagcagggca acacactgcc ctacacctt	360
ggcggcggaa caaagctgga gatcaccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtggcc	480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctggcgt gatctggggc	600
agcgagacca cctactacaa cagcgcctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
agcaagagcc aggtgttctt gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720

tactgtgcc	agcactacta	ctacggcg	gc agctacgcca	tggactactg	gggccagg	gc	780												
accagcgt	ga ccgtgtcc	ag	cgagaga	caag	tacggcc	ctc	ctgcccc	ttgccc	ctg	cc	840								
ccc	gagtt	cc	ttcc	ggacc	cag	cgtgtt	tc	cttcccc	cca	agccaa	ggacacc	ctg	900						
atgatcag	cc	ggac	cccc	ga	gg	tgac	ctgt	gtgt	gg	ac	gttccc	ggaggac	ccc	960					
gagg	tc	caactgg	ta	cgtggac	ggc	gtgg	agg	gtgc	aca	acg	ccaa	gacca	aggccc	1020					
cg	ggagg	ggc	agtt	caat	ag	cac	ctacc	gg	gtgg	gtcc	tg	ctgac	cacc	gt	1080				
gact	gg	gt	gt	ca	at	gg	ac	gg	gt	cc	ca	ac	ggccc	1140					
atc	gag	aaaa	ccat	cag	caa	gg	ccaa	gg	cc	ctcg	gg	ac	ccctg	gt	1200				
cccc	ctag	cc	aag	agg	ag	at	cca	aga	at	cg	gt	cc	ct	gg	ta	agg	gc	cc	1260
tt	c	tac	ccca	gc	gac	at	cg	cg	at	gg	gt	cc	tt	cc	gt	cc	gt	cc	1320
aag	acc	ac	cc	cc	ct	gt	gt	ct	gg	at	cc	tg	ac	cc	tc	cc	gt	cc	1380
gt	gg	aca	aga	aa	gg	ca	gg	ca	ac	ac	gt	cc	gg	cc	ca	cc	gt	cc	1440
ct	gc	caca	acc	act	ac	ac	cc	ca	gg	cct	g	ag	cc	tc	at	cc	at	cc	1500
tt	gg	ccc	c	tt	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1560
tg	ca	acc	acc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1620
ac	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1680
tt	cg	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1740
cag	gg	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1800
ct	gg	aca	ac	gg	gg	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1860
cag	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	1920
gg	cat	ga	agg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	1980
acc	gg	cc	ac	ca	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	2037

<210> 58

<211> 2037

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 58

ES 2 764 471 T3

atgctgctgc tggtgaccag cctgctgctg tgtgagctgc cccaccccgc ctttctgctg	60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgcgcgcct gggcgaccgg	120
gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
aagcccgacg gcaccgtcaa gctgctgatc taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgaccat ctccaacctg	300

gaggcaggagg acatcgccac ctactttgc cagcagggca acacactgcc ctacaccctt	360
ggcggcggaa caaagctgga gatcacccgc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
ggcgagggca gcaccaaggg cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctggtgcc	480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctggcgt gatctgggc	600
agcgagacca cctactacaa cagcgccctg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
agcaagagcc aggtgttccct gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
tactgtgccca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgcccctgcc	840
cccgagttcc tggcgccacc cagcgtgttc ctgttcccccc ccaagcccaa ggacaccctg	900
atgatcagcc ggaccccccga ggtgacctgt gtggtggtgg acgtgtccca ggaggacccc	960
gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgccaa gaccaagccc	1020
cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag	1080
gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaagggcct gcccagcagc	1140
atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcgaa agccccaggt gtacaccctg	1200
ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc	1260
ttctacccttca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcccgaa gaacaactac	1320
aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgcac ggcagcttctc tctgtacag caggctgacc	1380
gtggacaaga gccgggtggca ggagggcaac gtcttttagct gctccgtgat gcacgaggcc	1440
ctgcacaacc actacacccca gaagagcctg tccctgagcc tggcaagat gattatctca	1500
ttcttccctgg ccctgacctc taccgcctg ctgtttctgc tgtttttctt gaccctgogg	1560
ttcagcgtgg tcaagagagg ccggaagaaaa ctgctgtaca tcttcaagca gcccttcatg	1620
cgccccgtgc agaccaccca ggaagaggac ggctgcagct gccgggttccc cgaggaagag	1680
gaaggcggct gcgaactgcg ggtgaagttc agccggagcgc ccgacgcccc tgcctaccag	1740
cagggccaga accagctgta caacgagctg aacctggcc ggagggagga gtacgacgtg	1800
ctggacaagc ggagaggccg ggaccctgag atggcgccaa agccccggag aaagaaccct	1860
caggagggcc tggataacga actgcagaaaa gacaagatgg ccgaggccta cagcgagatc	1920
ggcatgaagg gcgagcggcg gaggggcaag ggccacgacg gcctgtacca gggcctgagc	1980
accgccccca aggataccta cgacgcctg cacatgcagg ccctgcccccc cagatga	2037

<210> 59

<211> 2160

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10 <400> 59

atgctgctgc	tggtgaccag	cctgctgctg	tgtgagctgc	cccaccccg	ctttctgctg	60
atccccgaca	tccagatgac	ccagaccacc	tccagcctga	gcccacggct	gggcgaccgg	120
gtgaccatca	gctgccgggc	cagccaggac	atcagcaagt	acctgaactg	gtatcagcag	180
aagcccacg	gcaccgtcaa	gctgctgatc	taccacacca	gccggctgca	cagcggcgtg	240
cccagccggt	ttagcggcag	cggctccggc	accgactaca	gcctgaccat	ctccaacctg	300
gagcaggagg	acatcgccac	ctactttgc	cagcaggggca	acacactgca	ctacacctt	360
ggcggcggaa	caaagctgga	gatcaccggc	agcacctccg	gcagcggcaa	gcctggcagc	420
ggcgaggggca	gcaccaaggg	cgaggtgaag	ctgcaggaga	gcggccctgg	cctggtgcc	480
cccagccaga	gcctgagcgt	gacctgtacc	gtgtccggcg	tgtccctgca	cgactacggc	540
gtgtcctgga	tccggcagcc	ccctaggaag	ggcctggagt	ggctggcgt	gatctggggc	600
agcgagacca	cctactacaa	cagcggccctg	aagagccggc	tgaccatcat	caaggacaac	660
agcaagagcc	aggtgttcct	gaagatgaac	agcctgcaga	ccgacgacac	cgccatctac	720
tactgtgcca	agcactacta	ctacggcggc	agctacgcca	tggactactg	gggccagggc	780
accagcgtga	ccgtgtccag	cgagagcaag	tacggccctc	cctggccccc	ttggccctgca	840
cccagttcc	tggcggacc	cagcgtgttc	ctgttccccc	ccaagccaa	ggacaccctg	900
atgatcagcc	ggaccccccga	ggtgacctgt	gtgggtggtg	acgtgtccca	ggaggacccc	960
gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	acaacgccaa	gaccaagccc	1020
cgggaggagc	agttcaatag	cacctaccgg	gtgggtgtccg	tgctgaccgt	gctgcaccag	1080
gactggctga	acggcaagga	atacaagtgt	aagggtgtcca	acaagggcct	gcccagcagc	1140
atcgagaaaa	ccatcagcaa	ggccaagggc	cagcctcggt	agccccaggt	gtacaccctg	1200
ccccctagcc	aagaggagat	gaccaagaat	caggtgtccc	tgacccctgc	ggtgaagggc	1260
ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaacg	gccagcccga	gaacaactac	1320
aagaccaccc	ccccctgtgct	ggacagcgcac	ggcagcttc	tcctgtacag	caggctgacc	1380
gtggacaaga	gccgggtggca	ggagggcaac	gtcttttagct	gctccgtat	gcacgaggcc	1440
ctgcacaacc	actacaccca	gaagagcctg	tccctgagcc	tggcaagat	gttctgggtg	1500
ctggcgtgtgg	tgggtggcgt	gctggcctgc	tacagcctgc	tggtgacagt	ggccttcatc	1560
atcttttggg	tgaggagcaa	gcggagcaga	ggcggccaca	gcgactacat	gaacatgacc	1620
ccccggagggc	ctggcccccac	ccggaagcac	taccagccct	acgcccctcc	cagggacttc	1680
cccgccctacc	ggagcaagag	aggccggaag	aaactgctgt	acatctcaa	gcagcccttc	1740

atgcggcccg tgcagaccac ccaggaagag gacggctgca gctgccggtt ccccgagggaa	1800
gaggaaggcg gctgcgaact gcgggtgaag ttcagccgga gcgccgacgc ccctgcctac	1860
cagcagggcc agaaccagct gtacaacgag ctgaacctgg gccggaggga ggagtacgac	1920
gtgctggaca agcggagagg ccgggaccct gagatgggcg gcaagccccg gagaaagaac	1980
cctcaggagg gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc ctacagcgag	2040
atcggcatga agggcgagcg gcggaggggc aagggccacg acggcctgta ccagggcctg	2100
agcaccgcca ccaaggatac ctacgacgcc ctgcacatgc aggcctgcc cccagatga	2160

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un receptor de antígeno quimérico codificado por una secuencia de ADN según el SEQ ID NO: 5.
- 5 2. Una célula T transformada que expresa el polipéptido de la reivindicación 1.
3. La célula T transformada de la reivindicación 2, donde la célula es una célula inmortalizada.
- 10 4. La célula T transformada de la reivindicación 2, donde la célula T es una célula T alfa beta, una célula T gamma delta o una célula NKT.
- 5 5. Una preparación farmacéutica que comprende la célula T transformada de cualquiera de las reivindicaciones 2-4.
- 15 6. Un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende una secuencia según el SEQ ID NO: 5.
7. El ácido nucleico de la reivindicación 6, donde el ácido nucleico está comprendido en una célula T.
- 20 8. El ácido nucleico de la reivindicación 7, donde la célula T es una célula T alfa beta, una célula T gamma delta, una célula NKT o una célula T derivada de una célula pluripotente.
9. Un vector de transposición de la Bella Durmiente que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende una secuencia según el SEQ ID NO: 5.
- 25 10. Una célula T que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico codificado por una secuencia según el SEQ ID NO: 5.
- 30 11. Una célula T que comprende un vector de transposición de la Bella Durmiente que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 6.
12. La célula T de la reivindicación 10 que comprende además una citocina unida a membrana.
- 35 13. La célula T de la reivindicación 12, donde la citocina unida a la membrana es IL-15 unida a la membrana.
14. La célula T según las reivindicaciones 10-13 para uso en el tratamiento del cáncer.
- 40 15. La célula T para uso según la reivindicación 14, donde el cáncer es un tumor maligno de células B o linfoma.

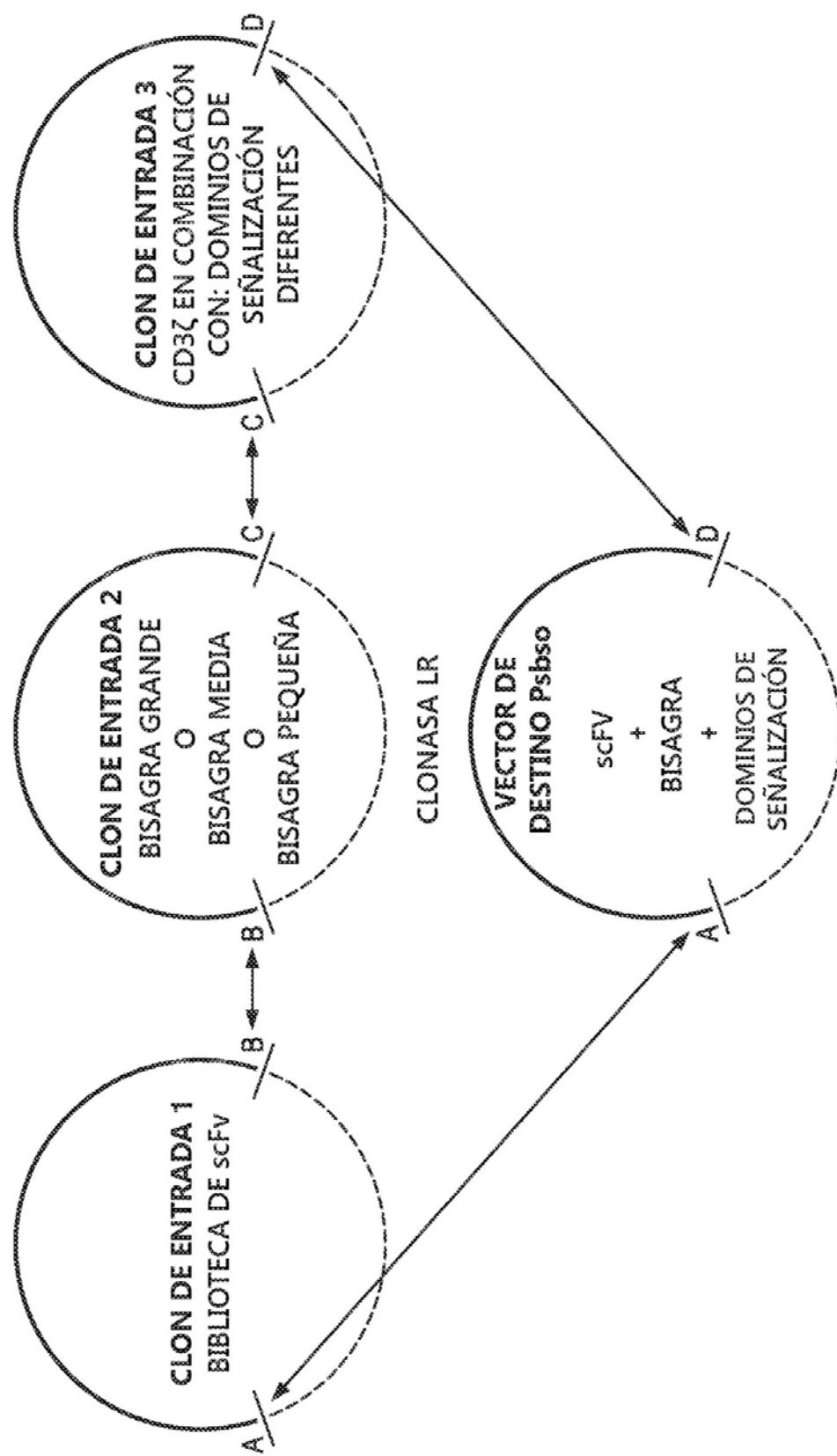


FIG. 1

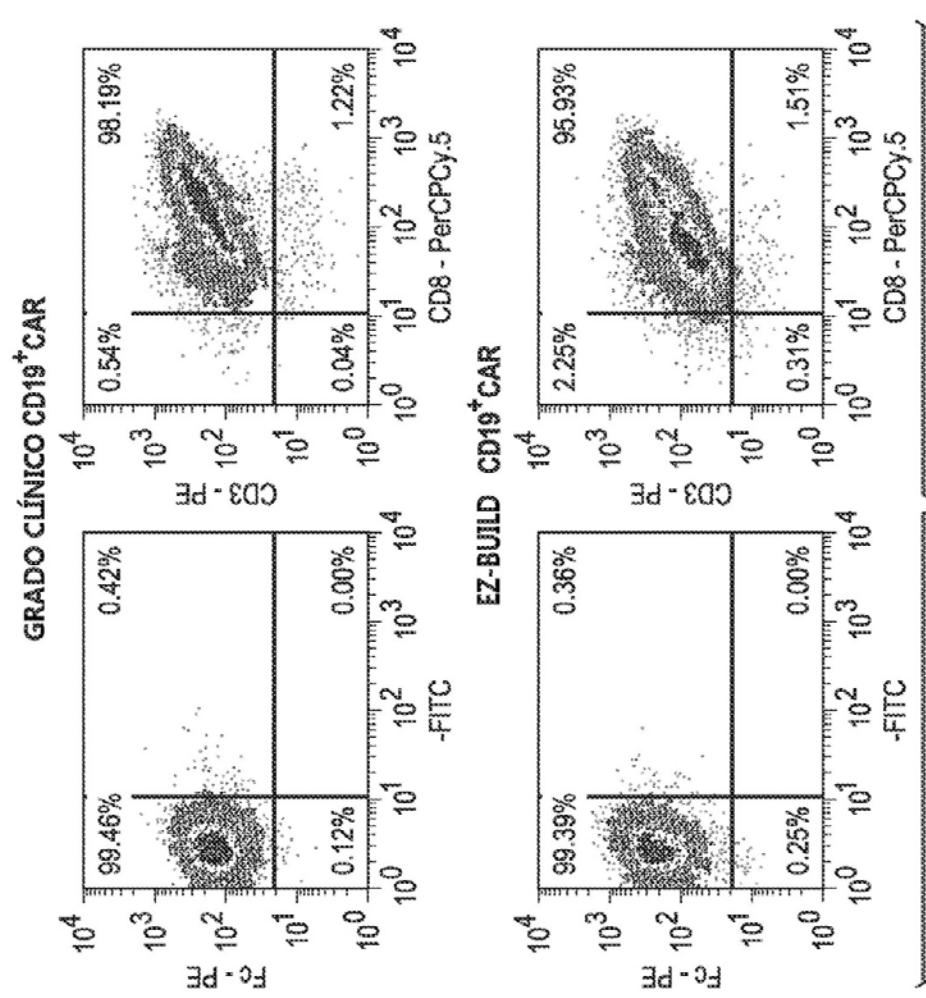


FIG. 2A

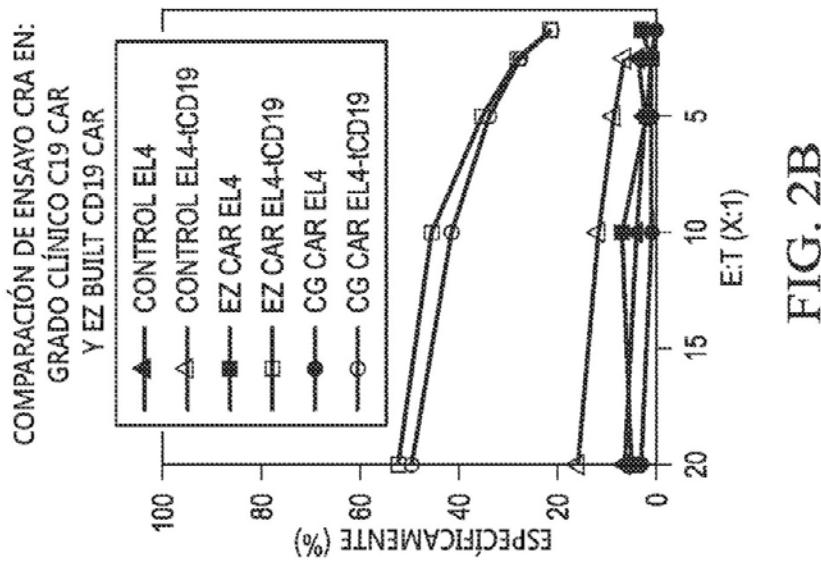


FIG. 2B

FRA		BISAGRA		4-1BB		CD3z	
		VL	VH	CD8 Y TM			
212	19r-CD8hTm-BB-z						
213	19r-CD8hTm-28-z	VL	VH	CD8 Y TM		CD28	CD3z
214	19R-CD8Tm-BB-z				CD8	4-1BB	CD3z
215	19R-CD8Tm-28-z				TM		
216	19R-BB Tm-BB-z				CD8	CD28	CD3z
217	19R-28Tm-BB-z				TM	4-1BB	CD3z
218	19R-28Tm-28-BB-z				CD28	4-1BB	CD3z
193	19R-28Tm-28-z				TM	CD28	CD3z
CAR	19R-28Tm-28-z				CD28	CD28	CD3z
19R	CAR CON BISAGRA E IgG4-Fc				CD19scFv		
19r	CAR SIN BISAGRA O Fc				VL	VH	

FIG. 3

PLÁSMIDOS DE SEGUIMIENTO DE LA BELLA DURMIENTE*

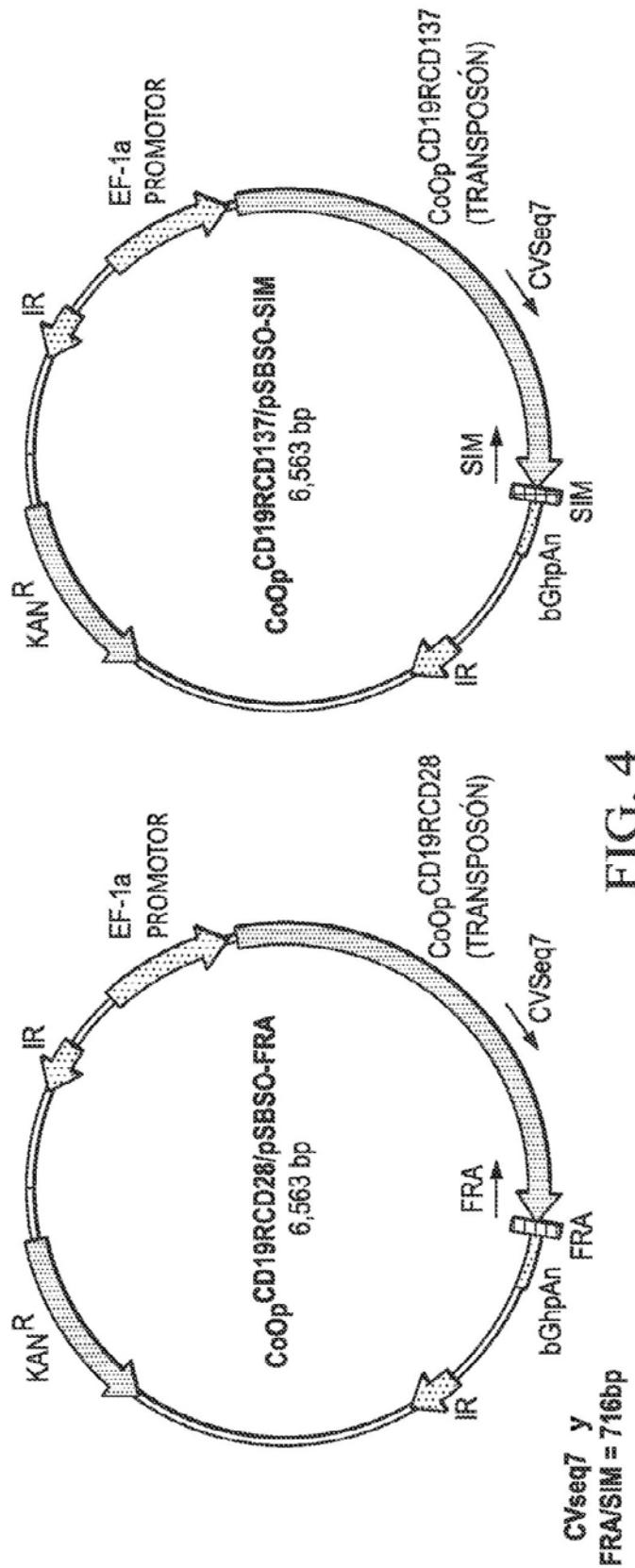


FIG. 4

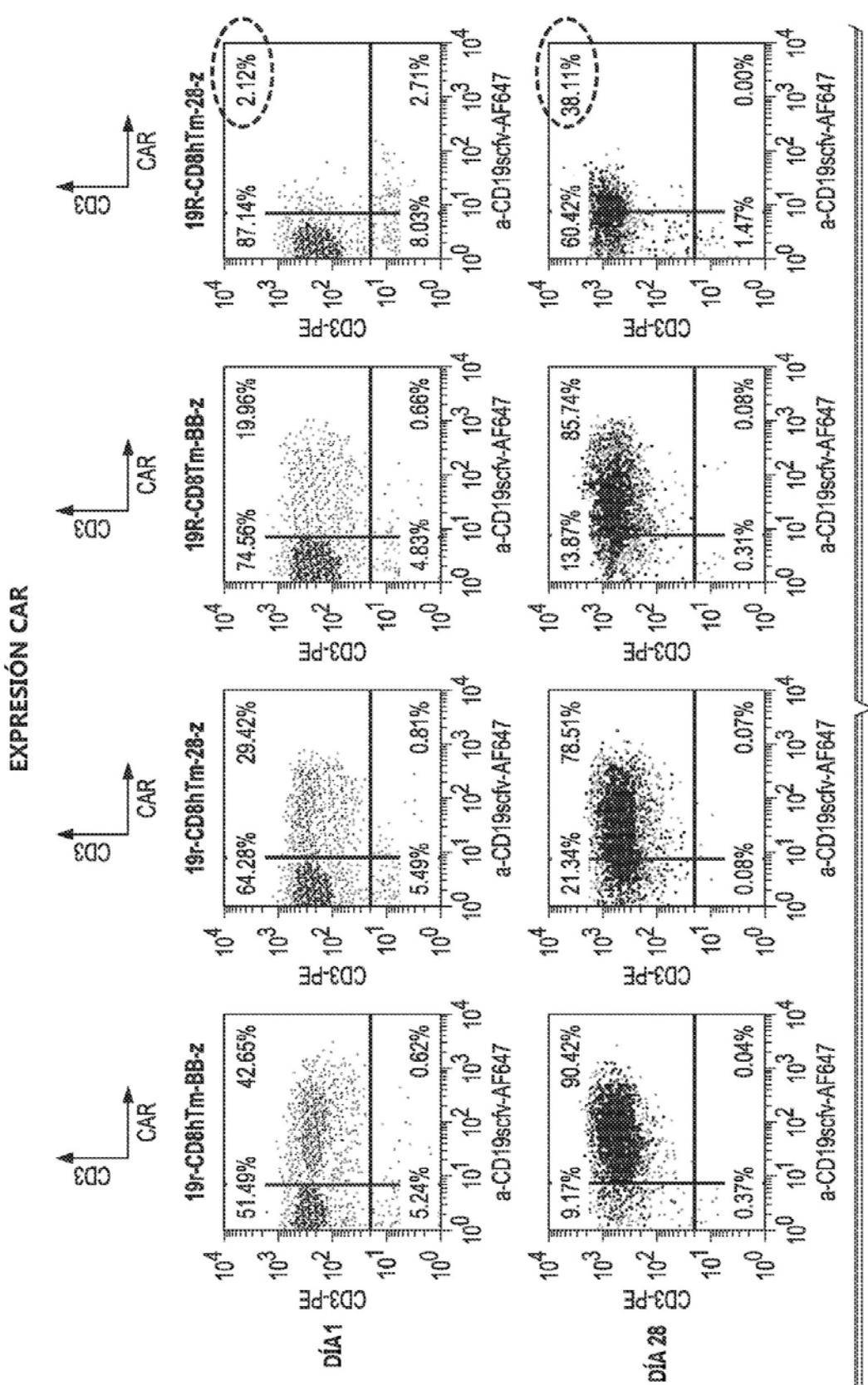


FIG. 5-1

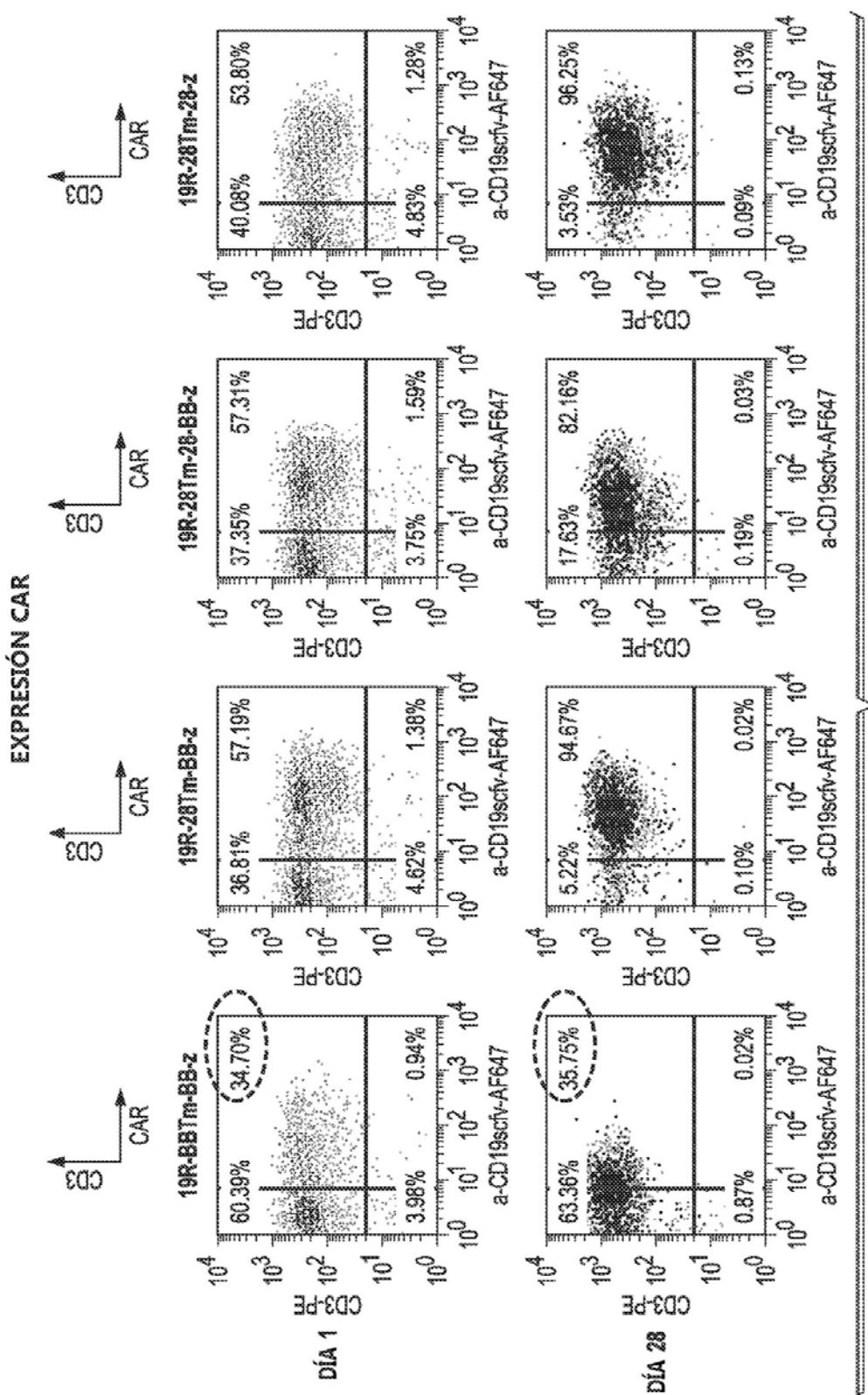
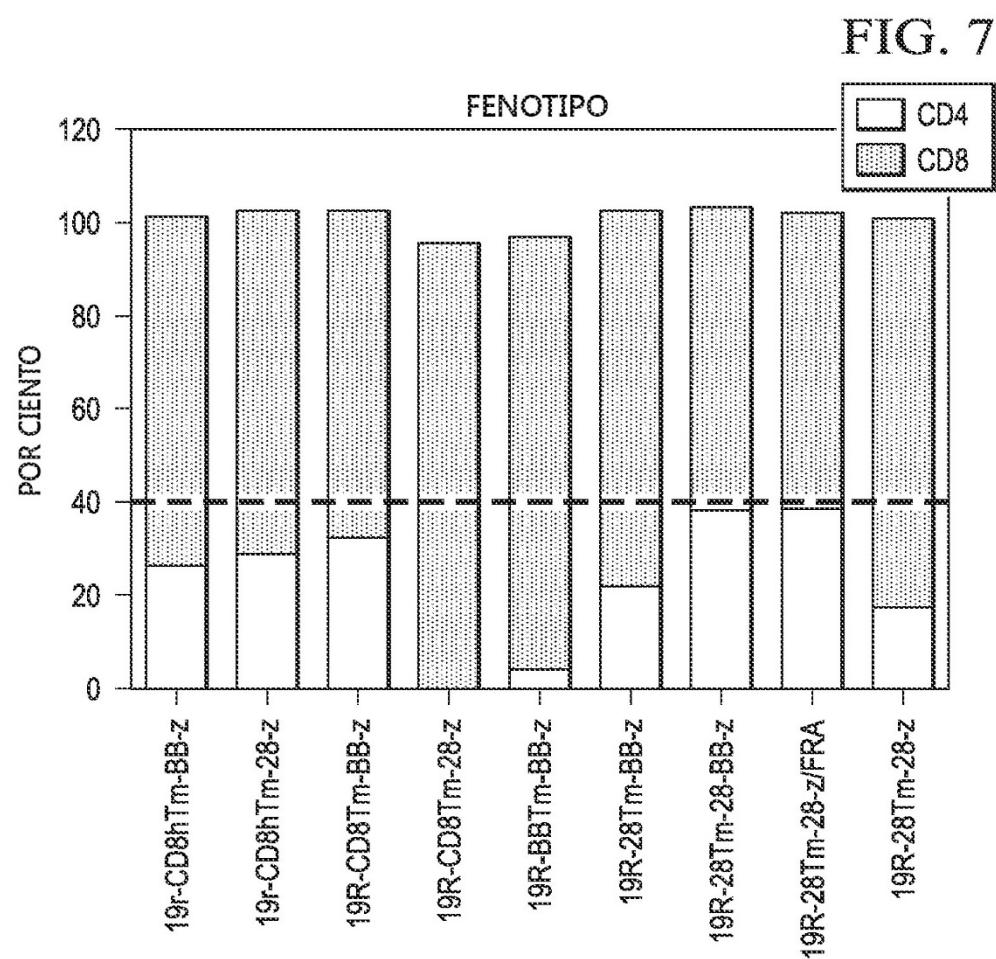
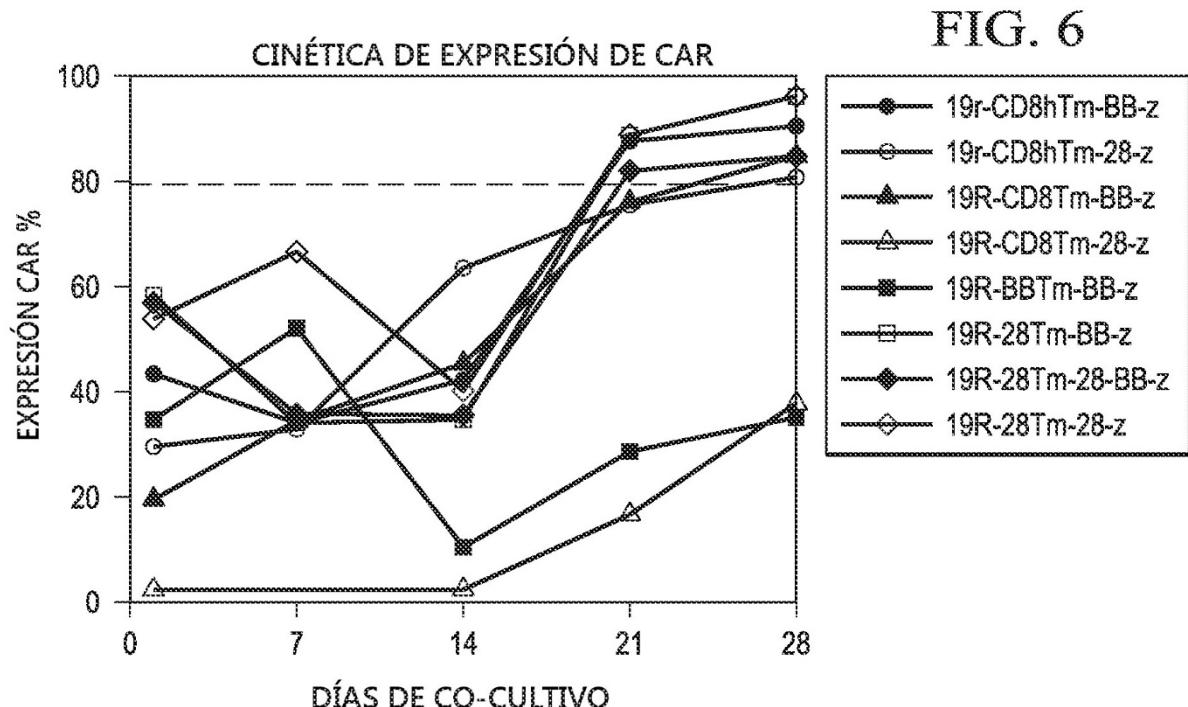


FIG. 5-2



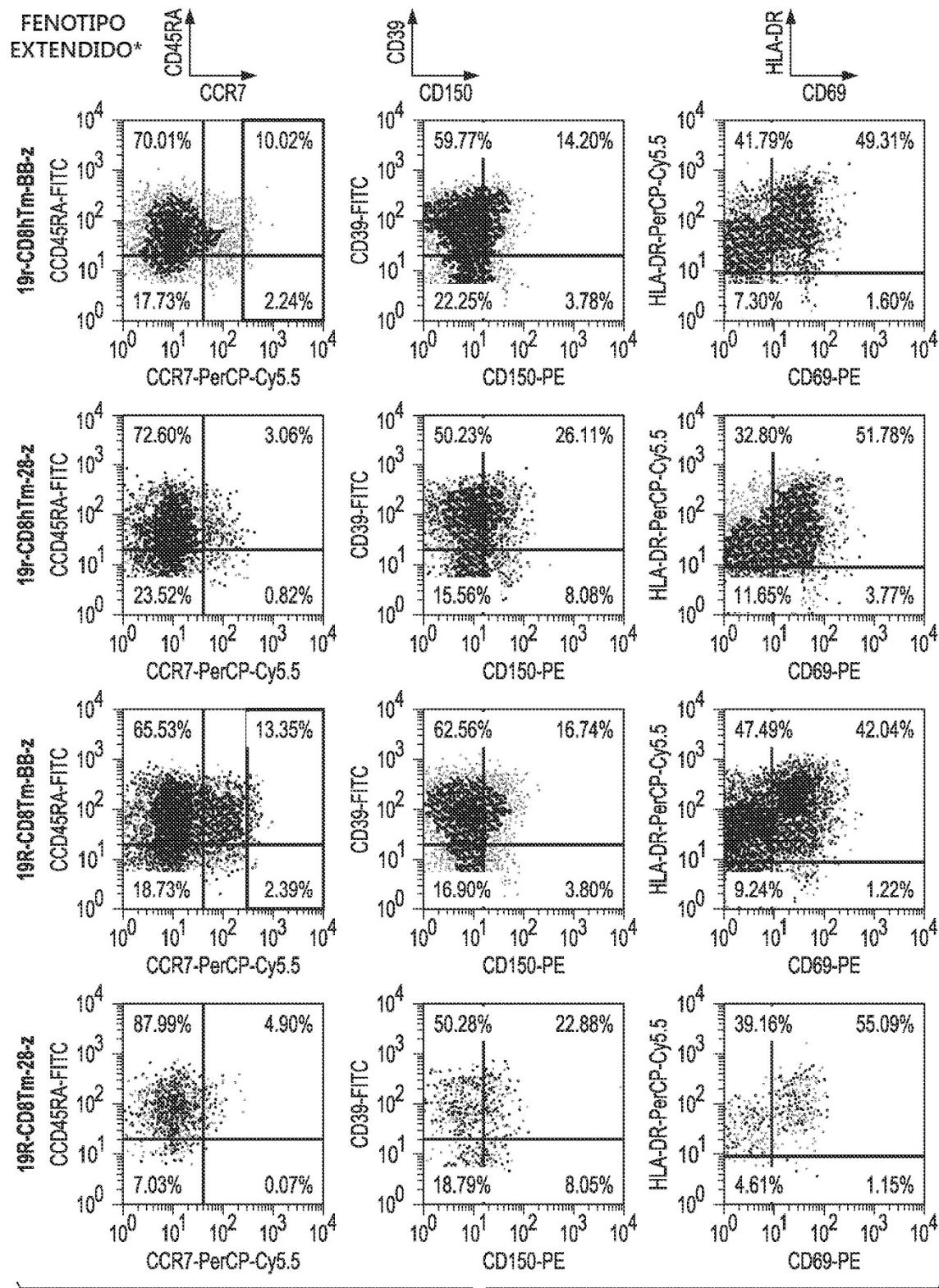


FIG. 8A-1

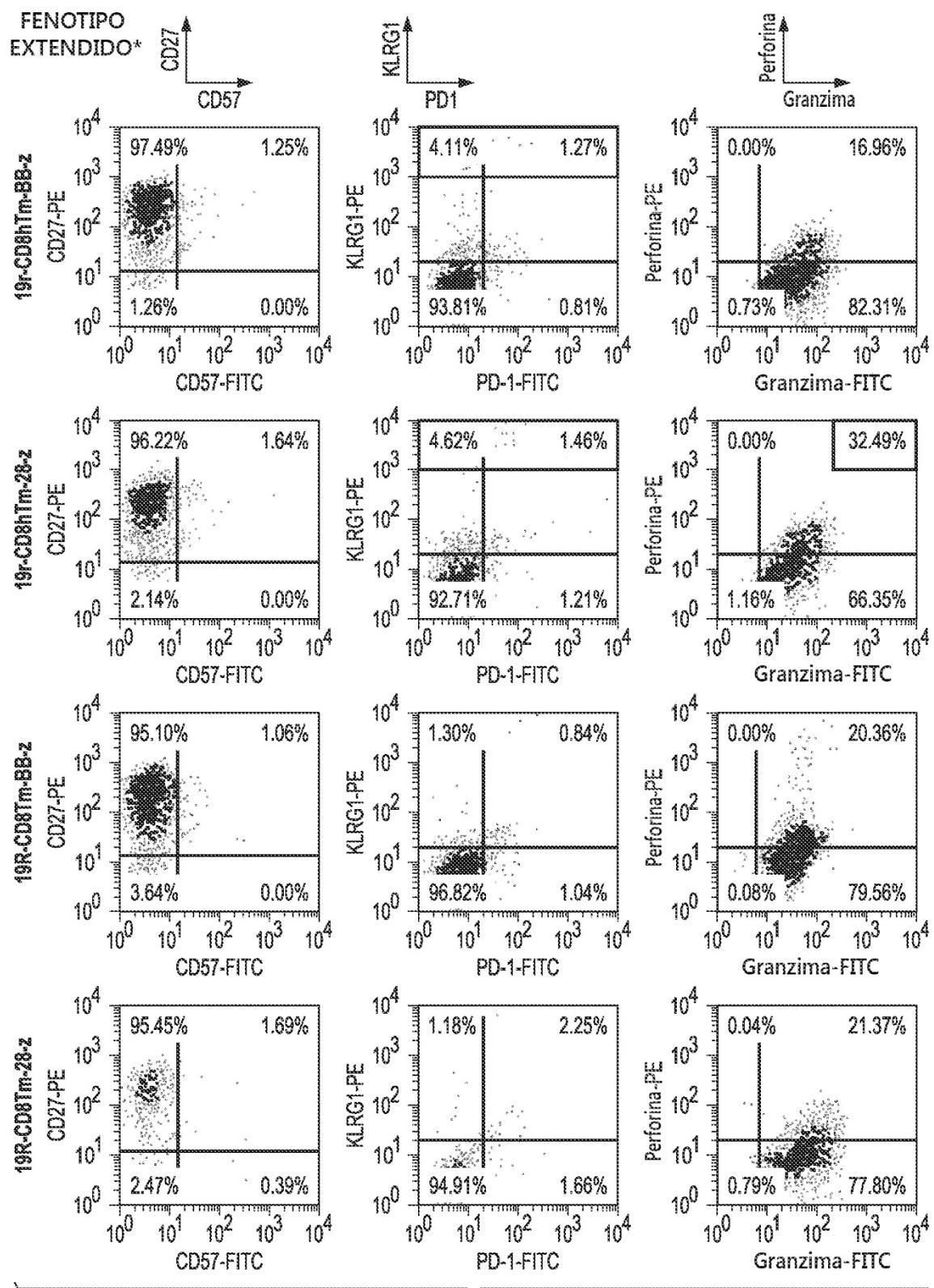


FIG. 8A-2

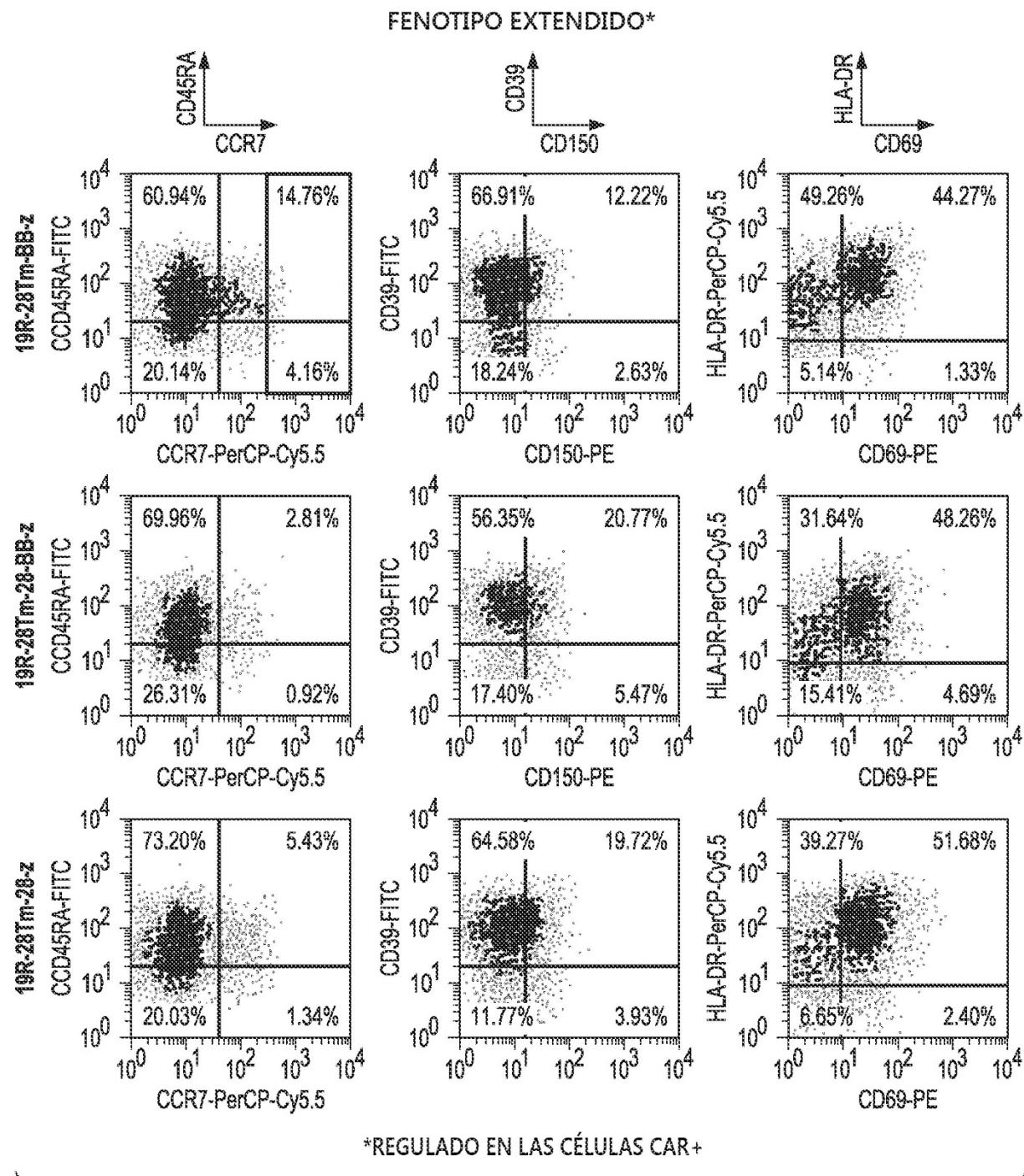


FIG. 8B-1

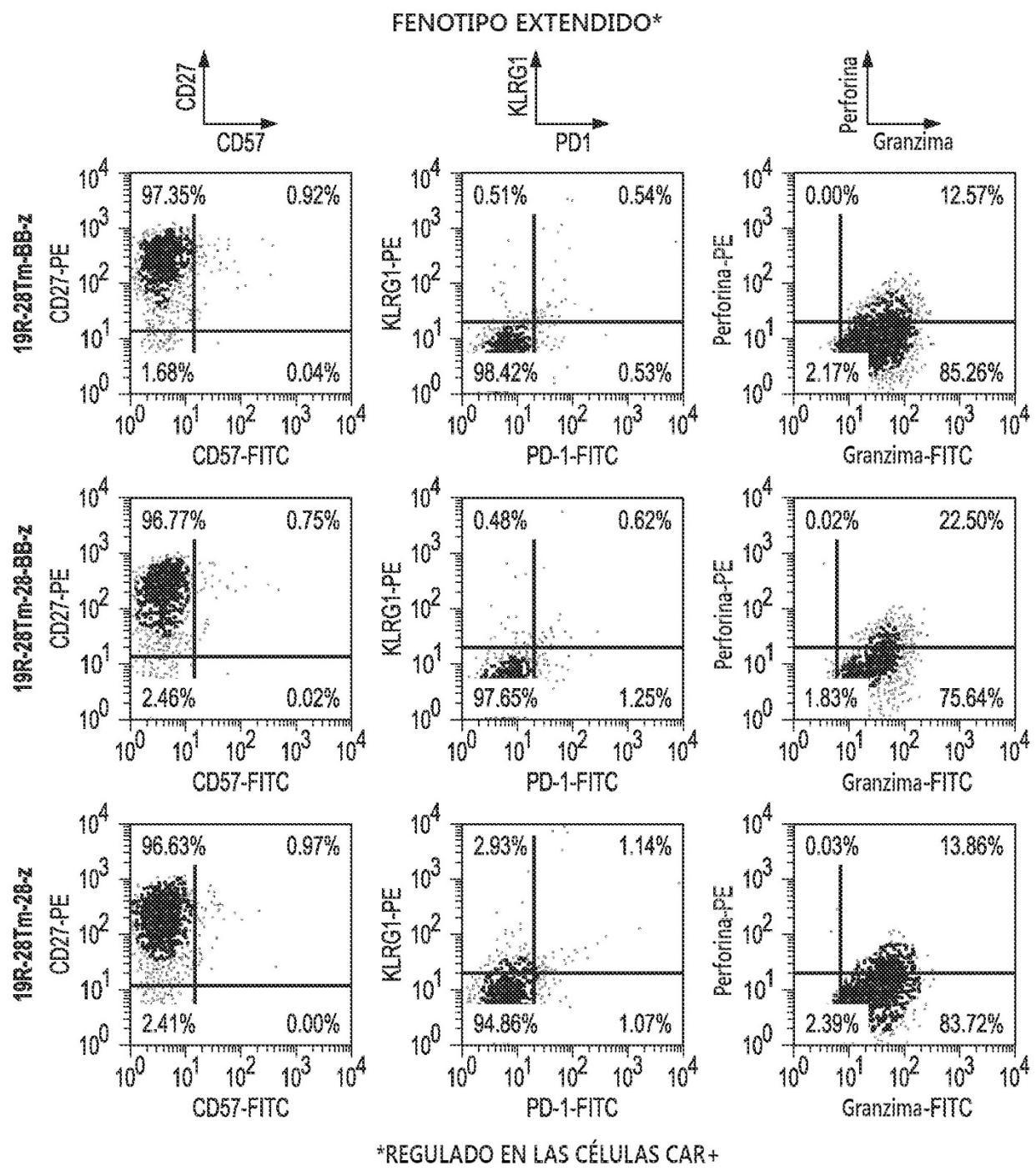


FIG. 8B-2

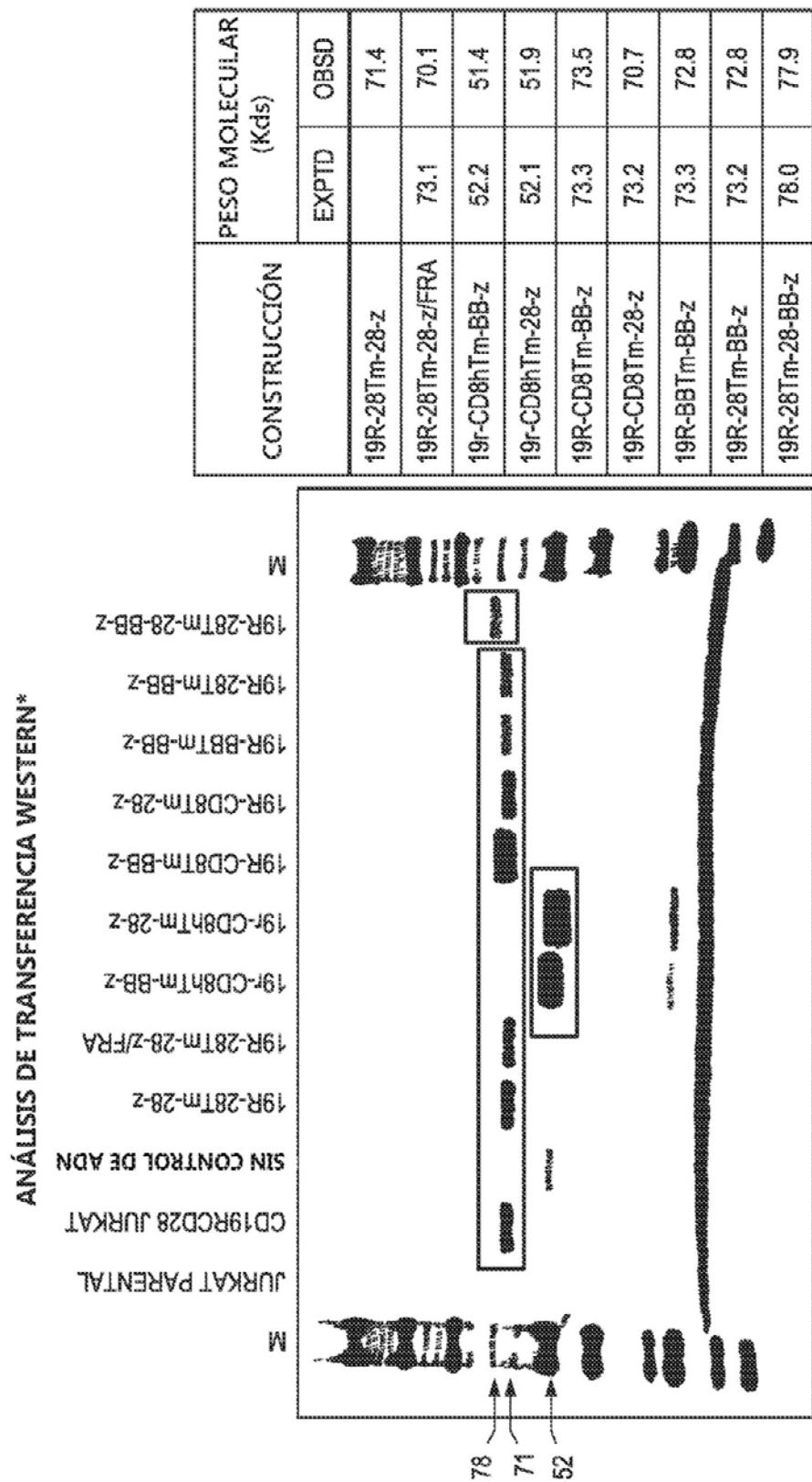
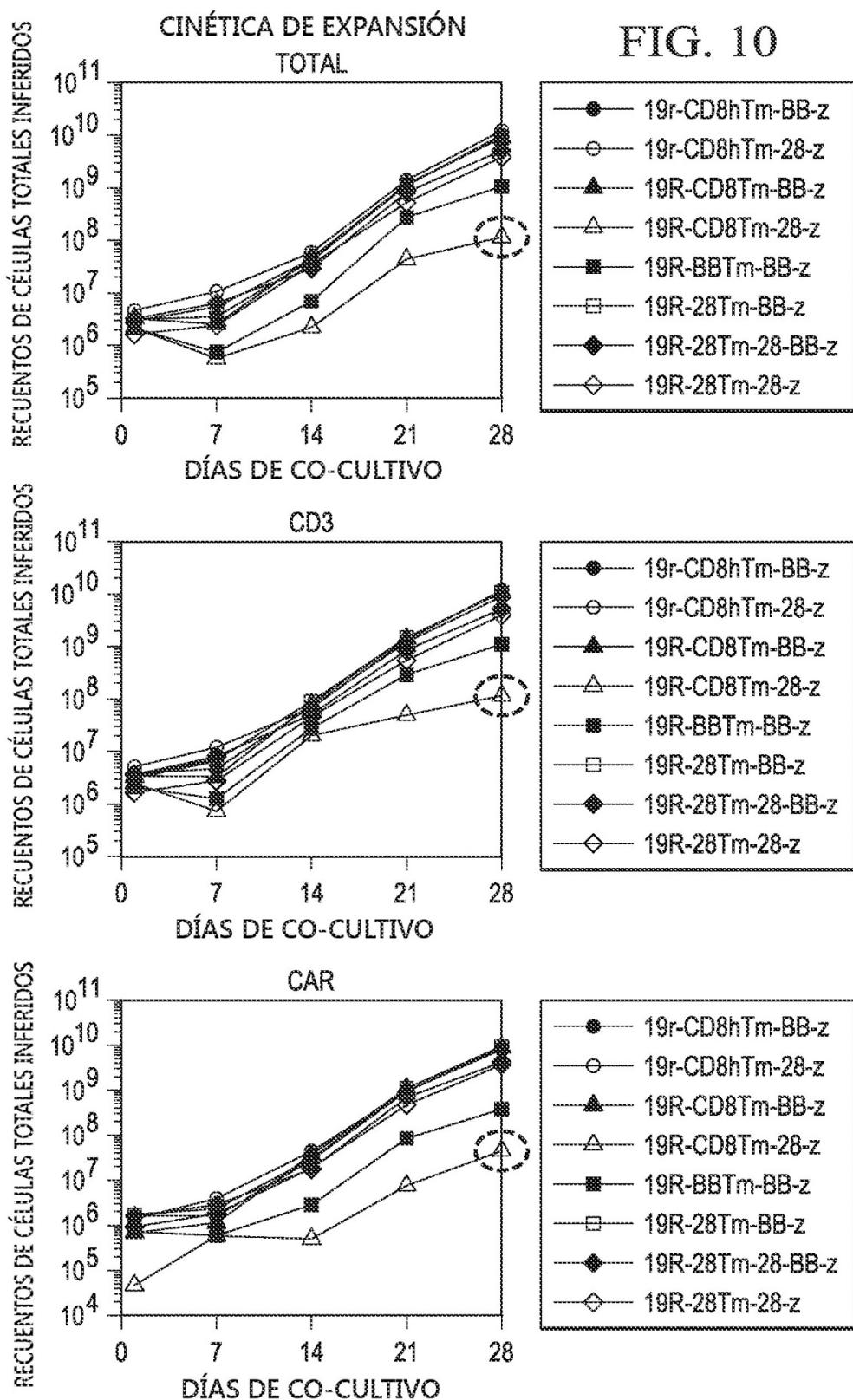


FIG. 9



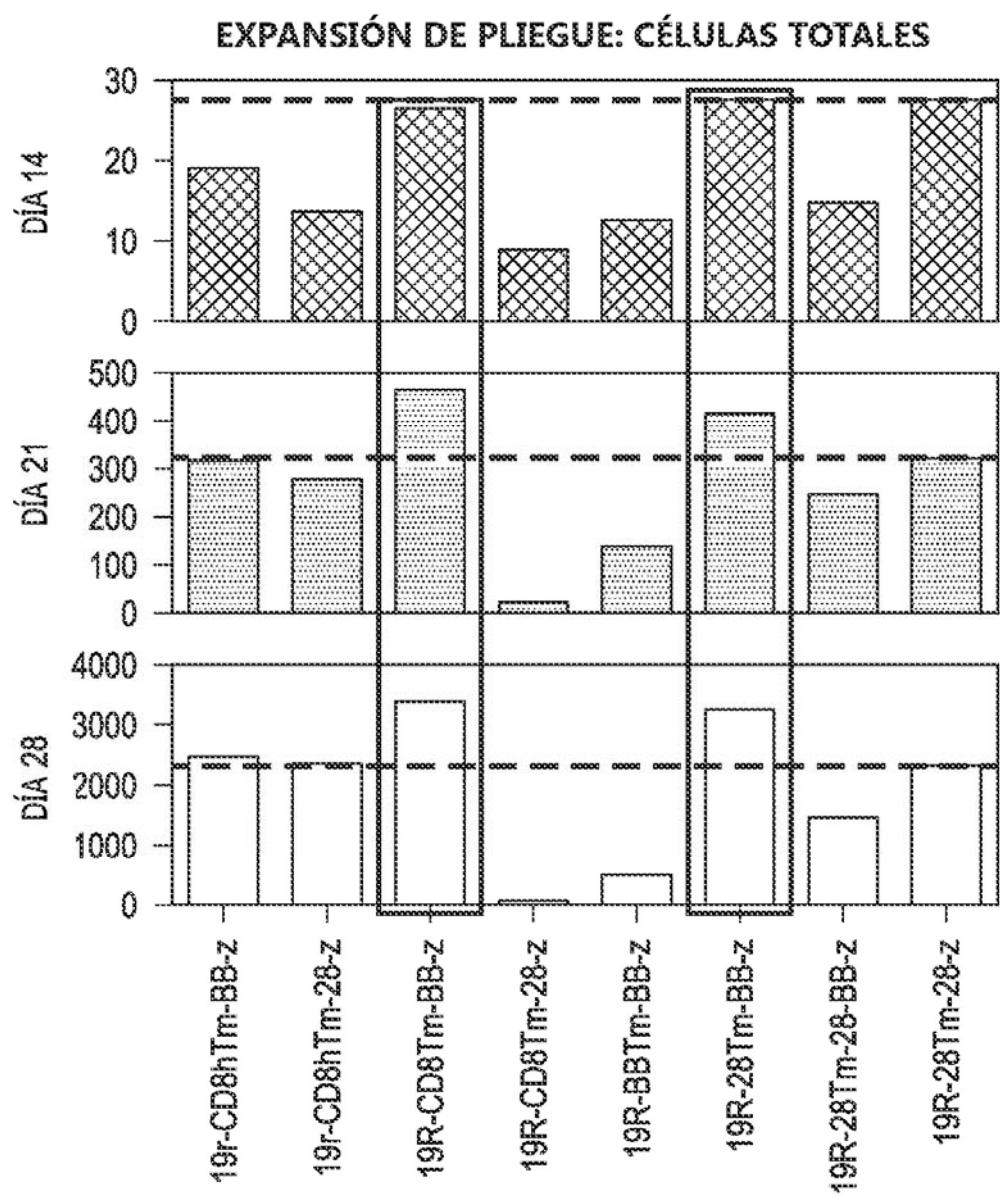


FIG. 11

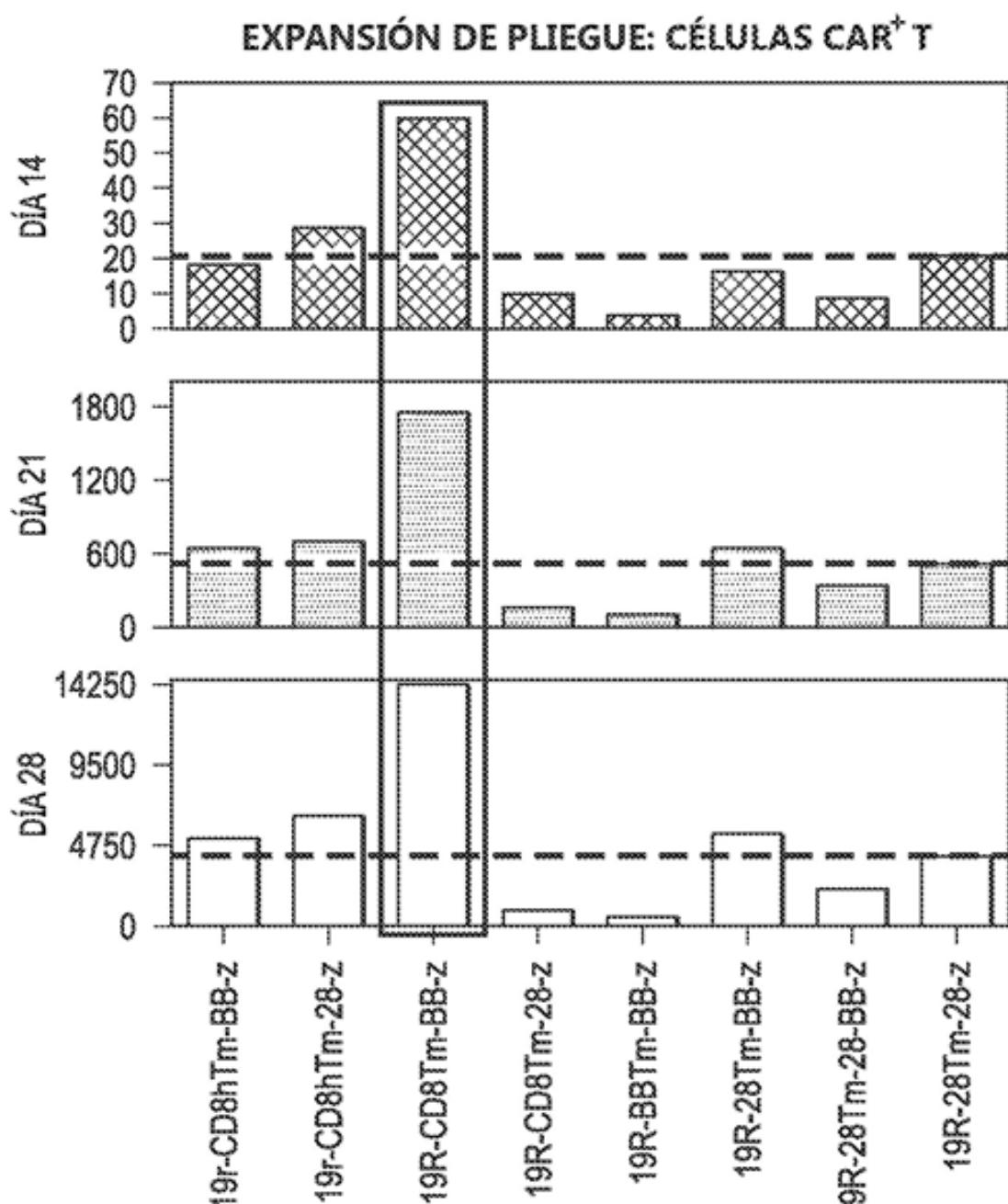
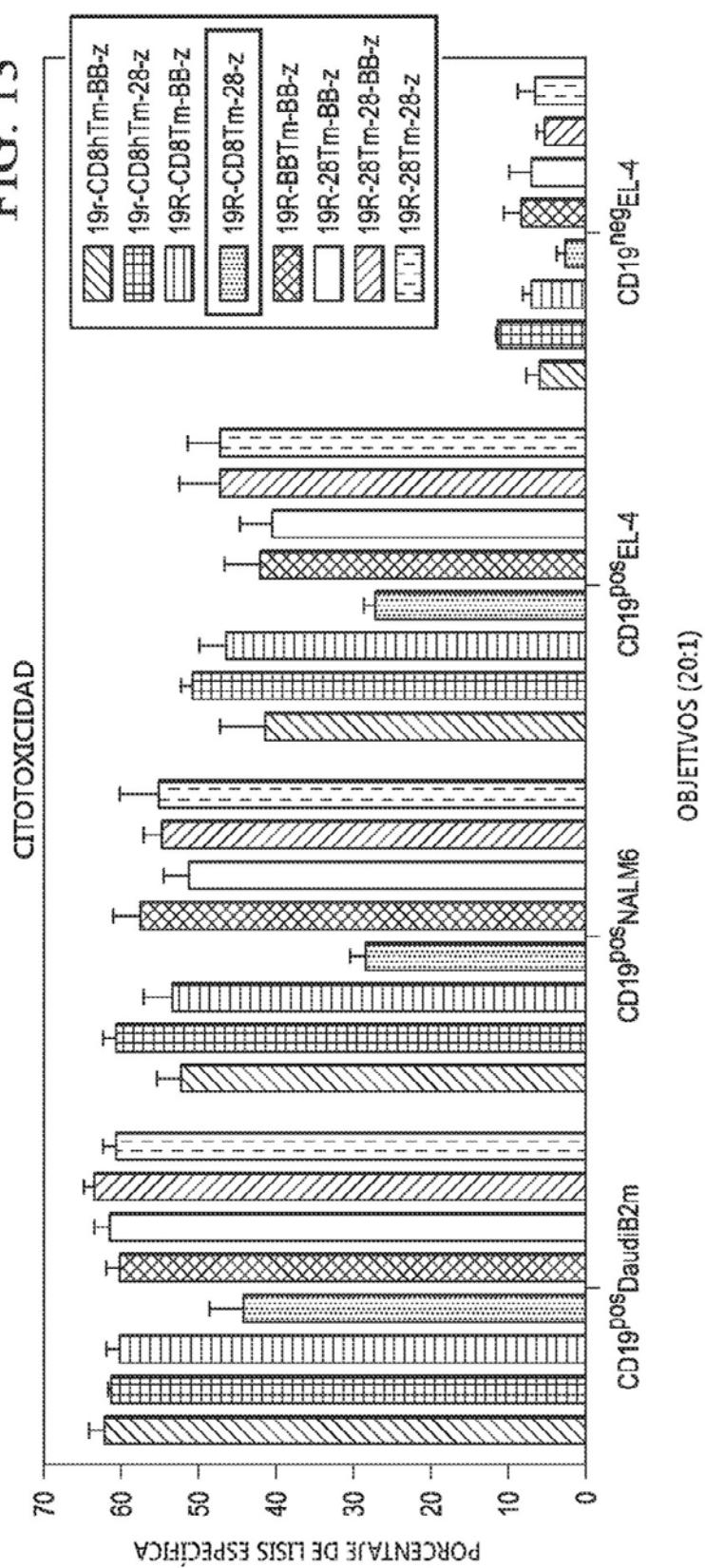
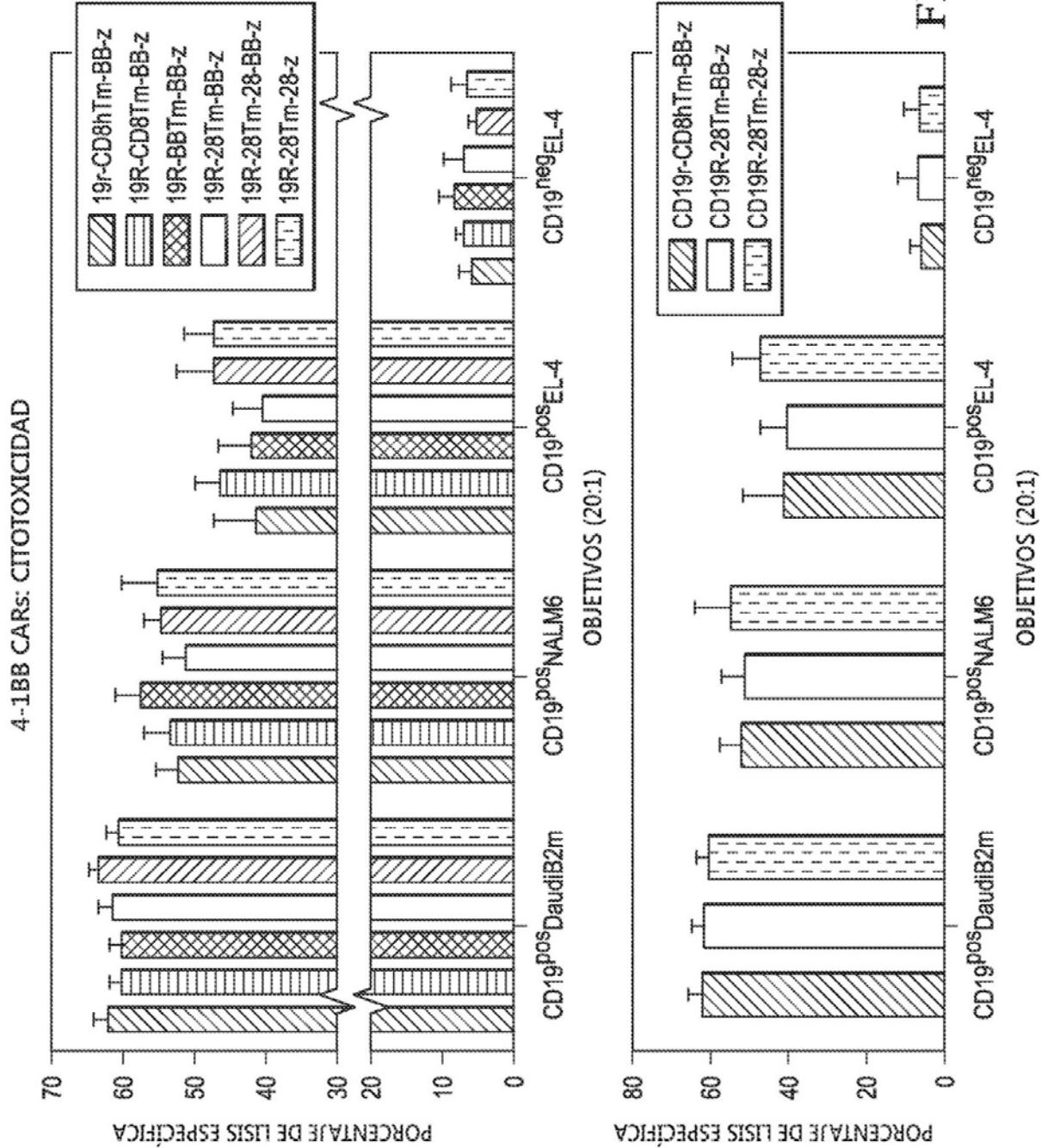


FIG. 12

FIG. 13





DOMINIO DE TM: CITOTOXICIDAD

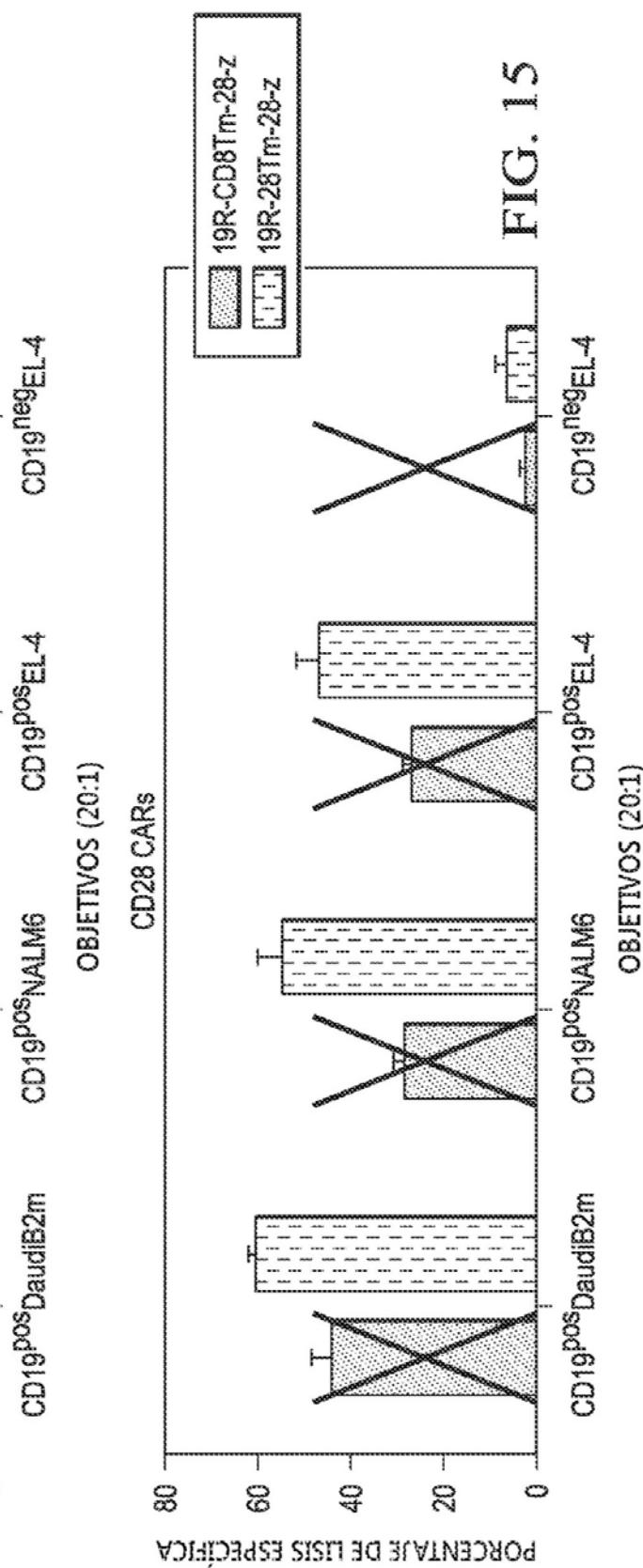
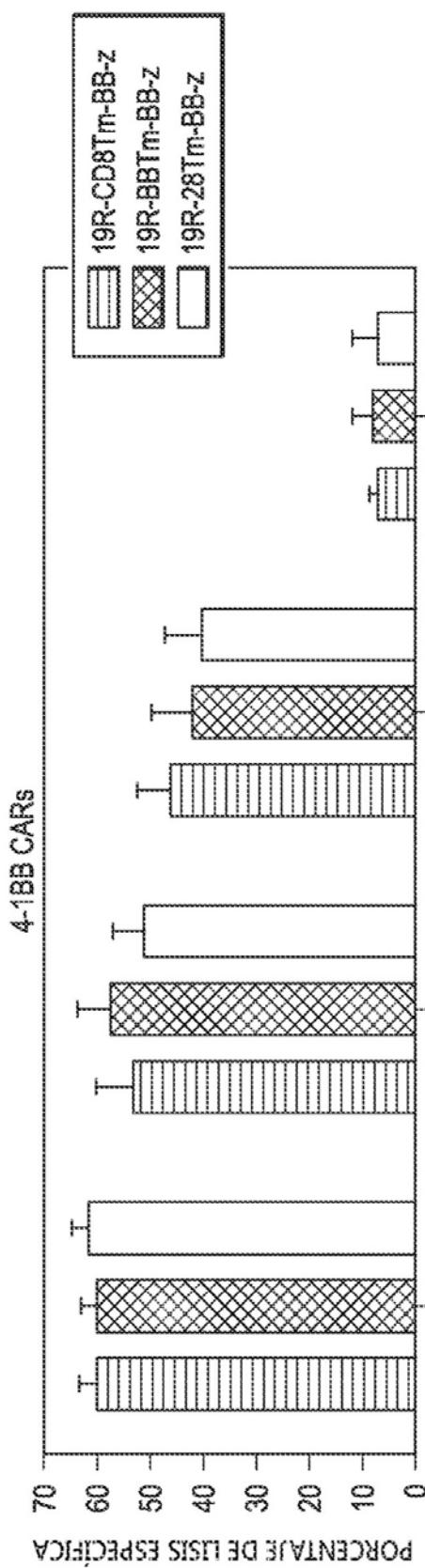


FIG. 15

SEPARADOR (IgG4 VS CD8): CITOTOXICIDAD

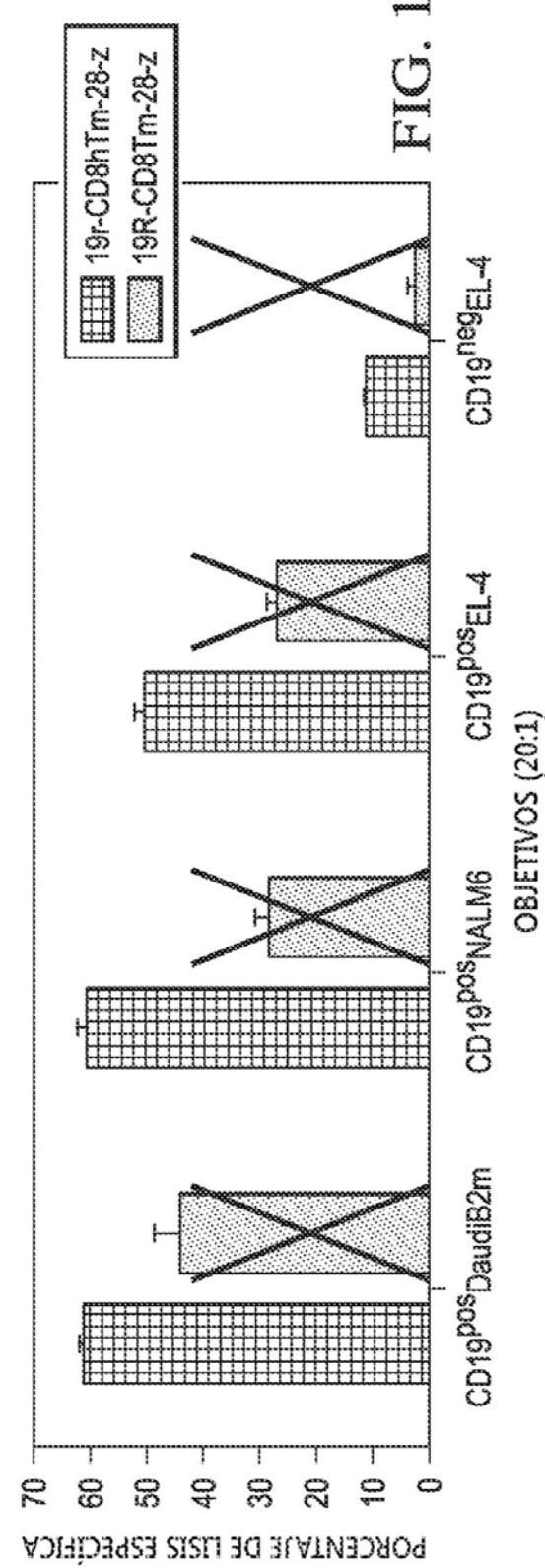
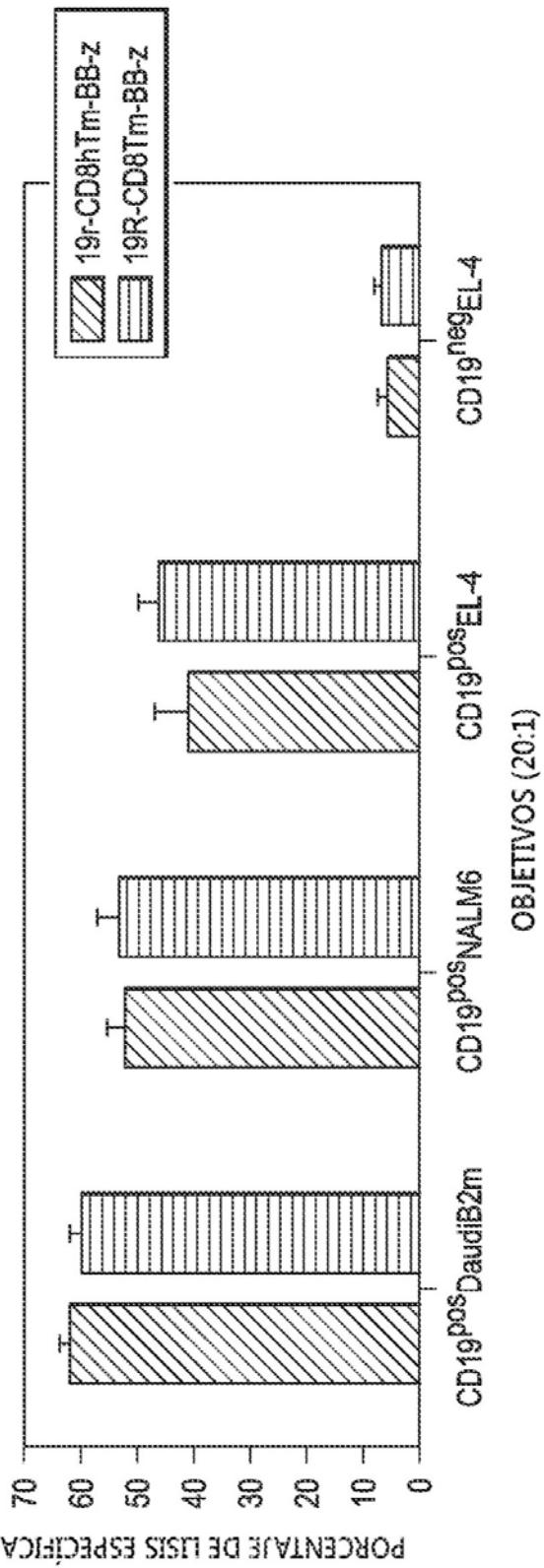
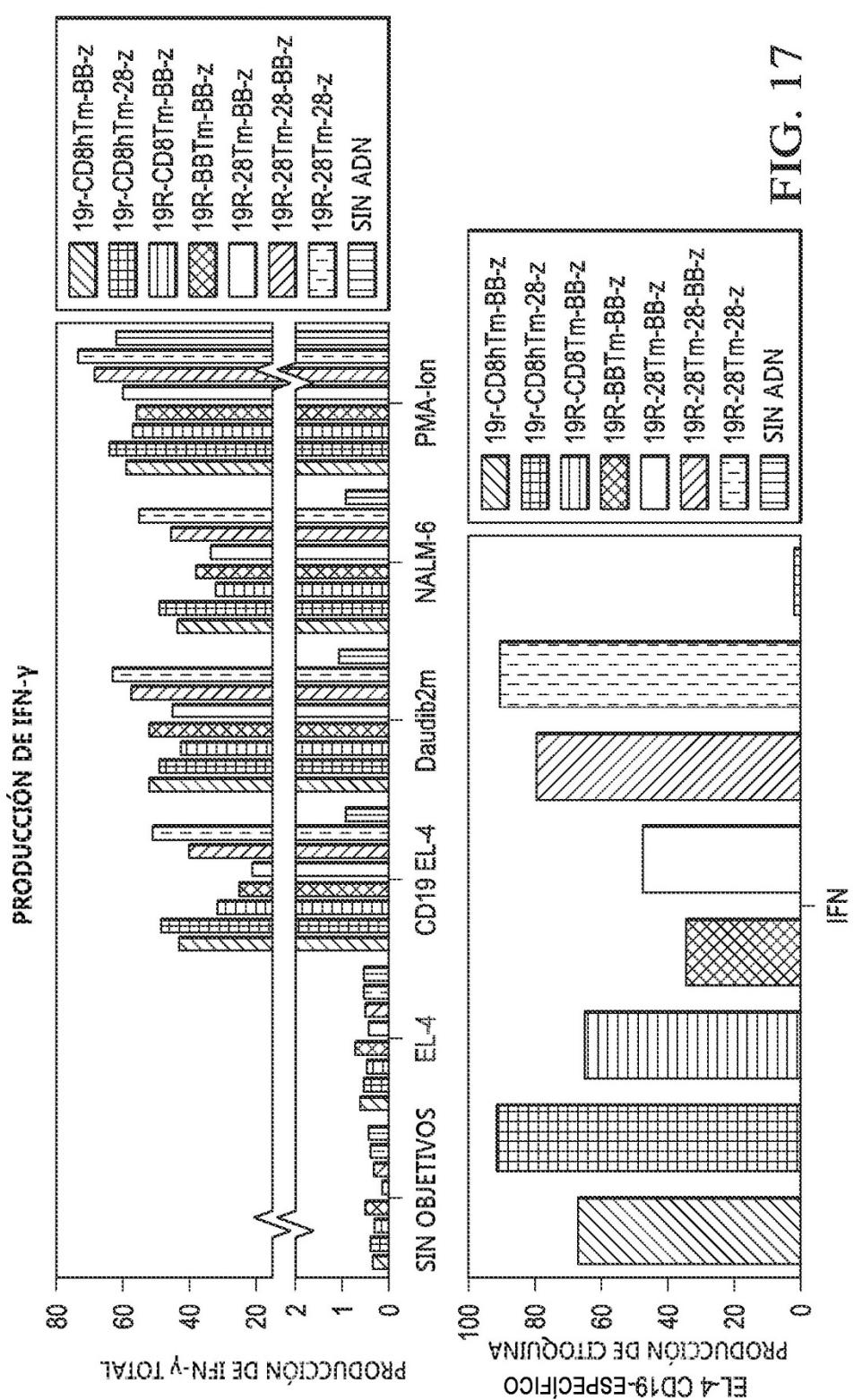
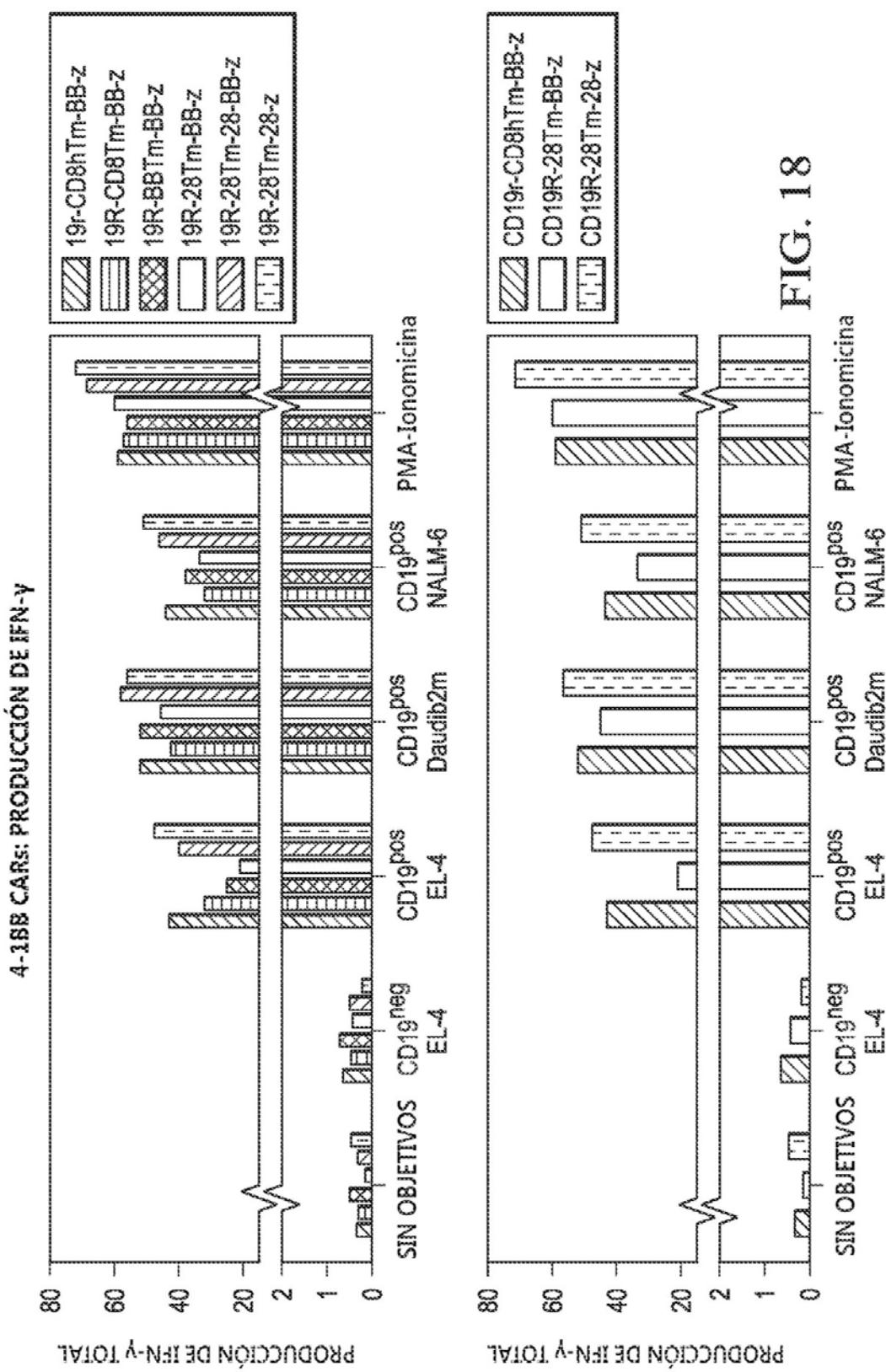


FIG. 16





DOMINIO DE TM: PRODUCCIÓN DE IFN-γ

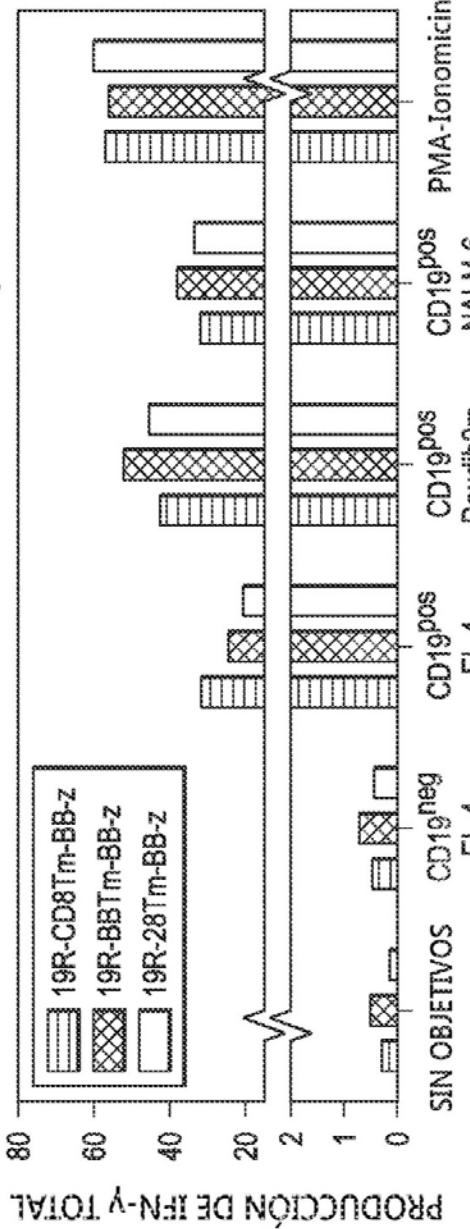


FIG. 19

SEPARADOR (IgG4 VS CDS): PRODUCCIÓN DE IFN-γ

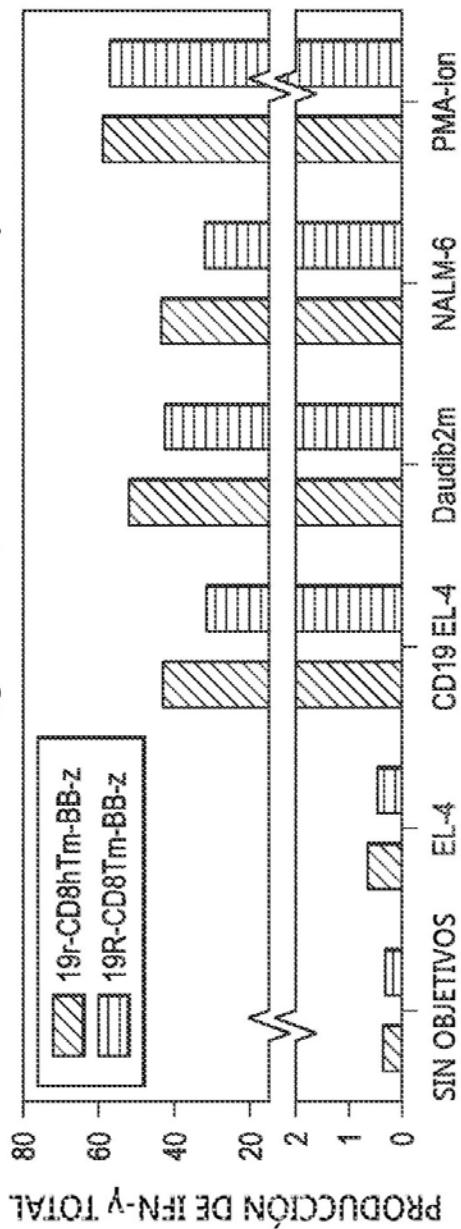


FIG. 20

FIG. 21

SEGURIDAD: SB11 PCR *

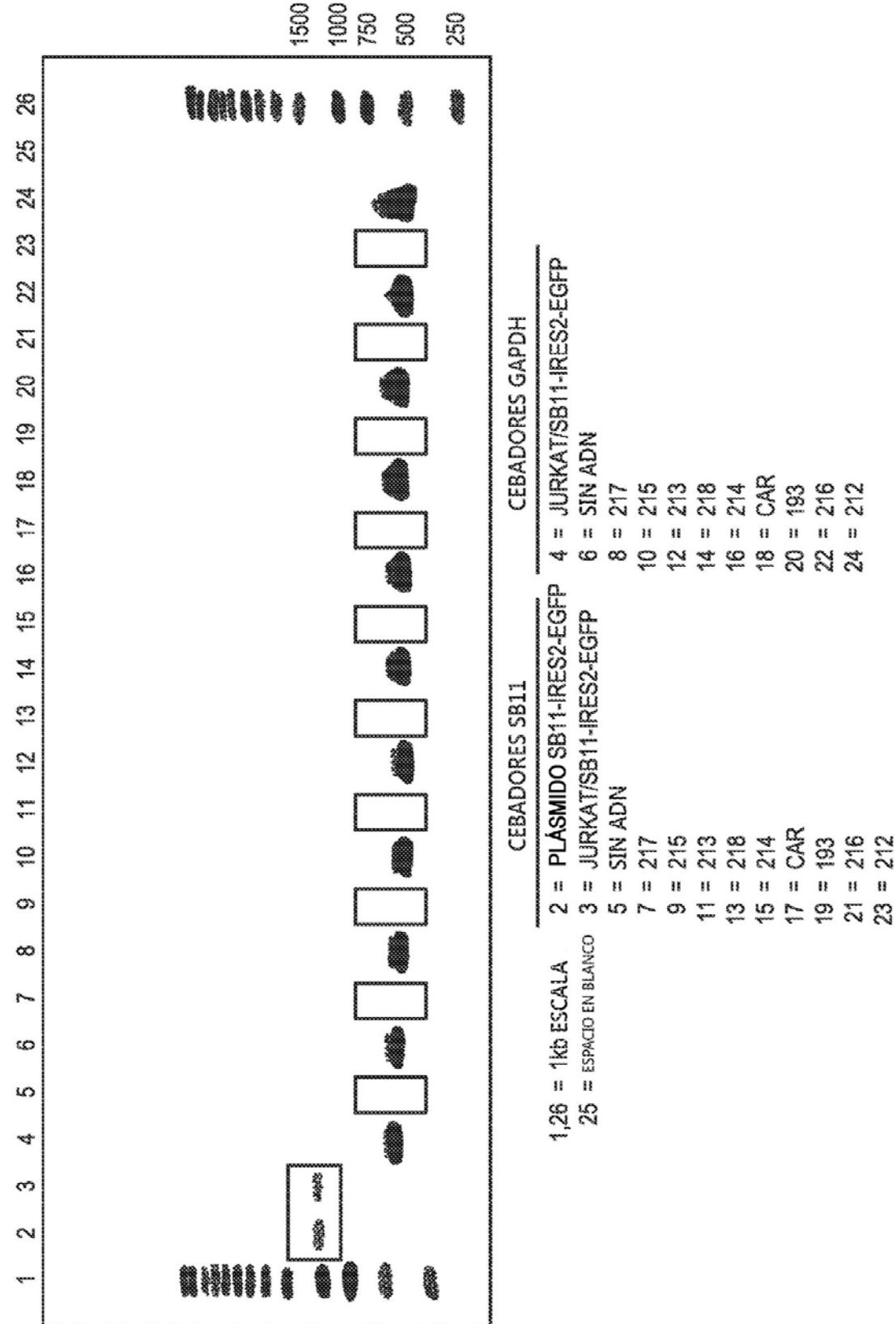


FIG. 22

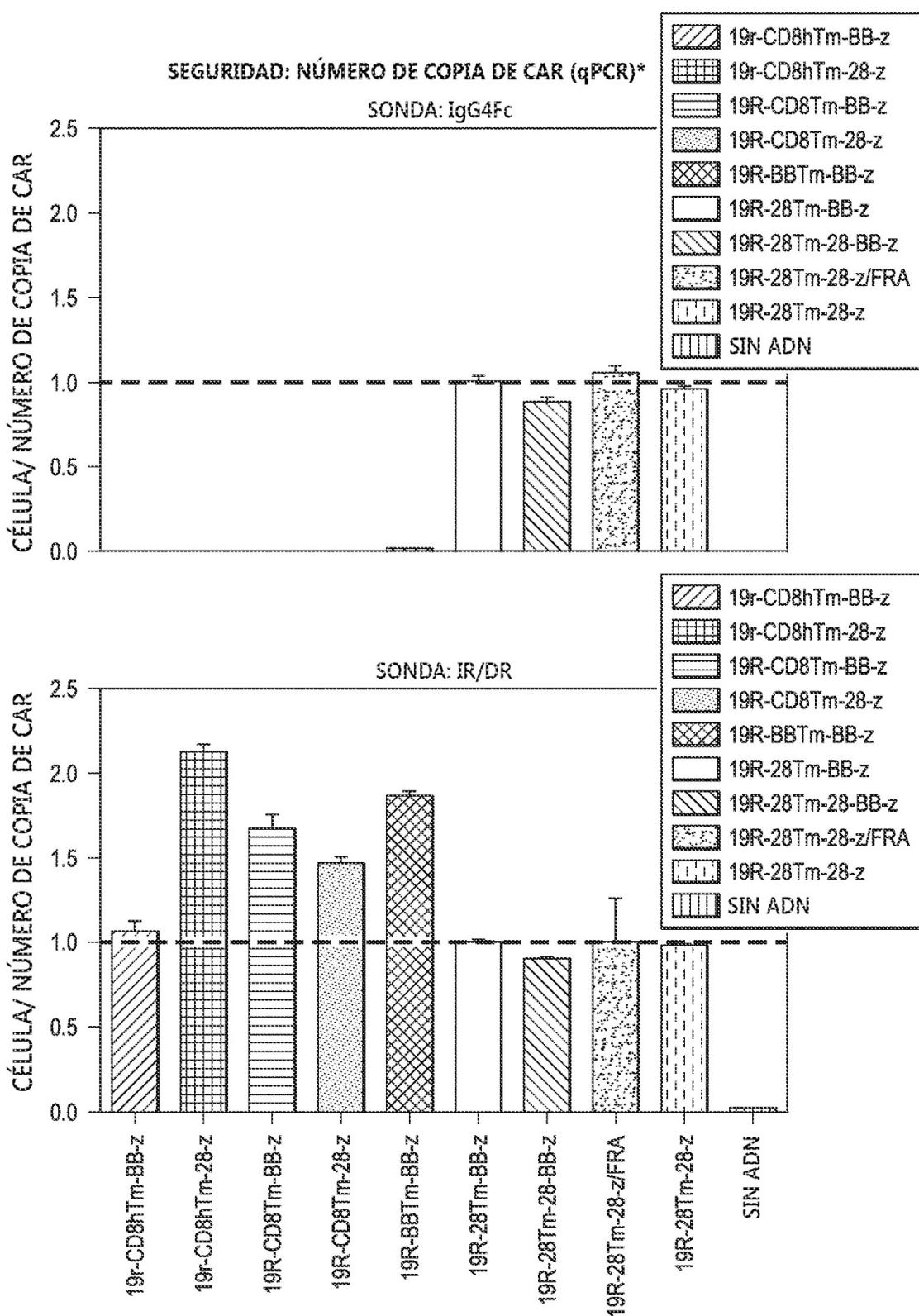
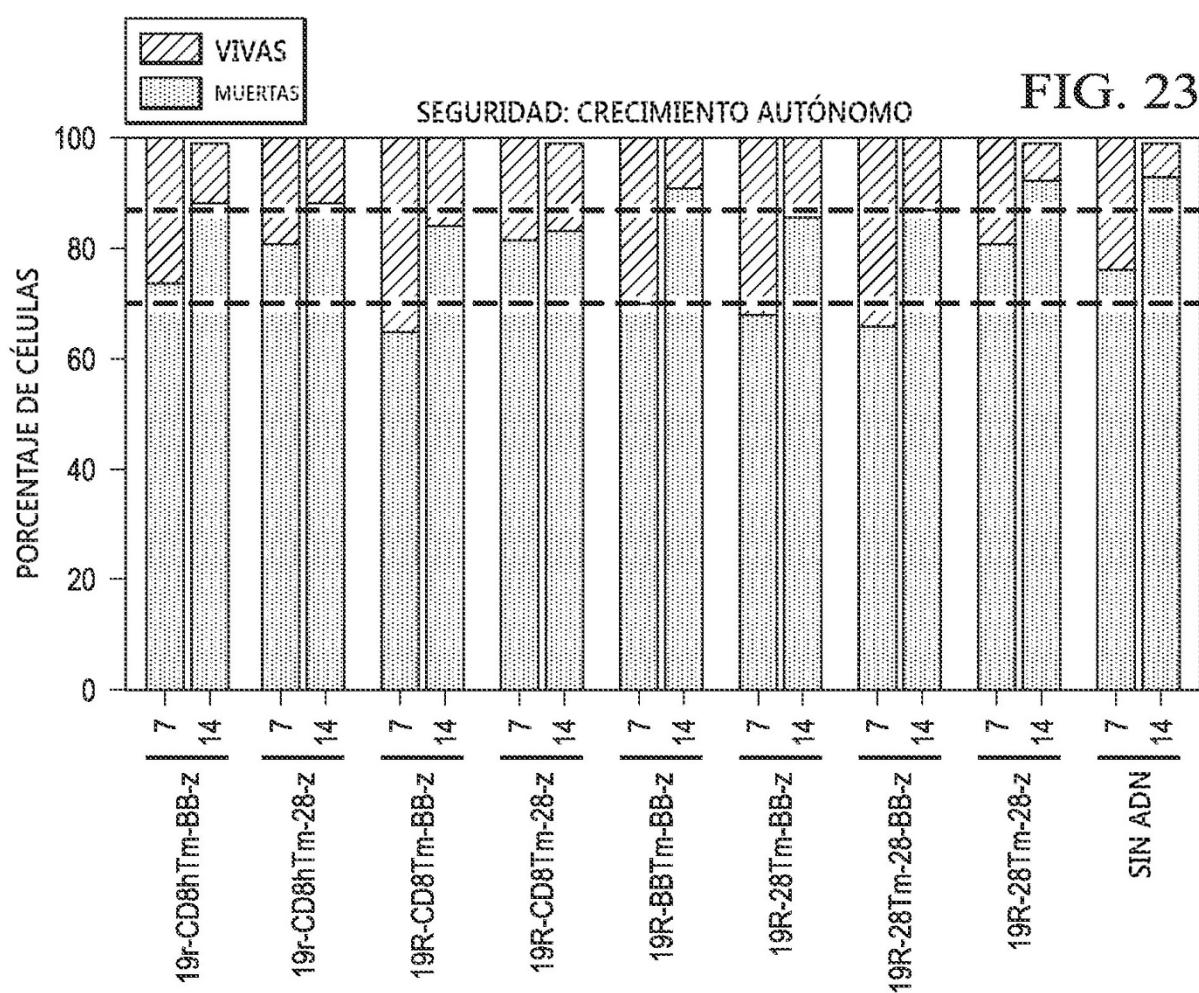


FIG. 23



DISEÑO DE CAR

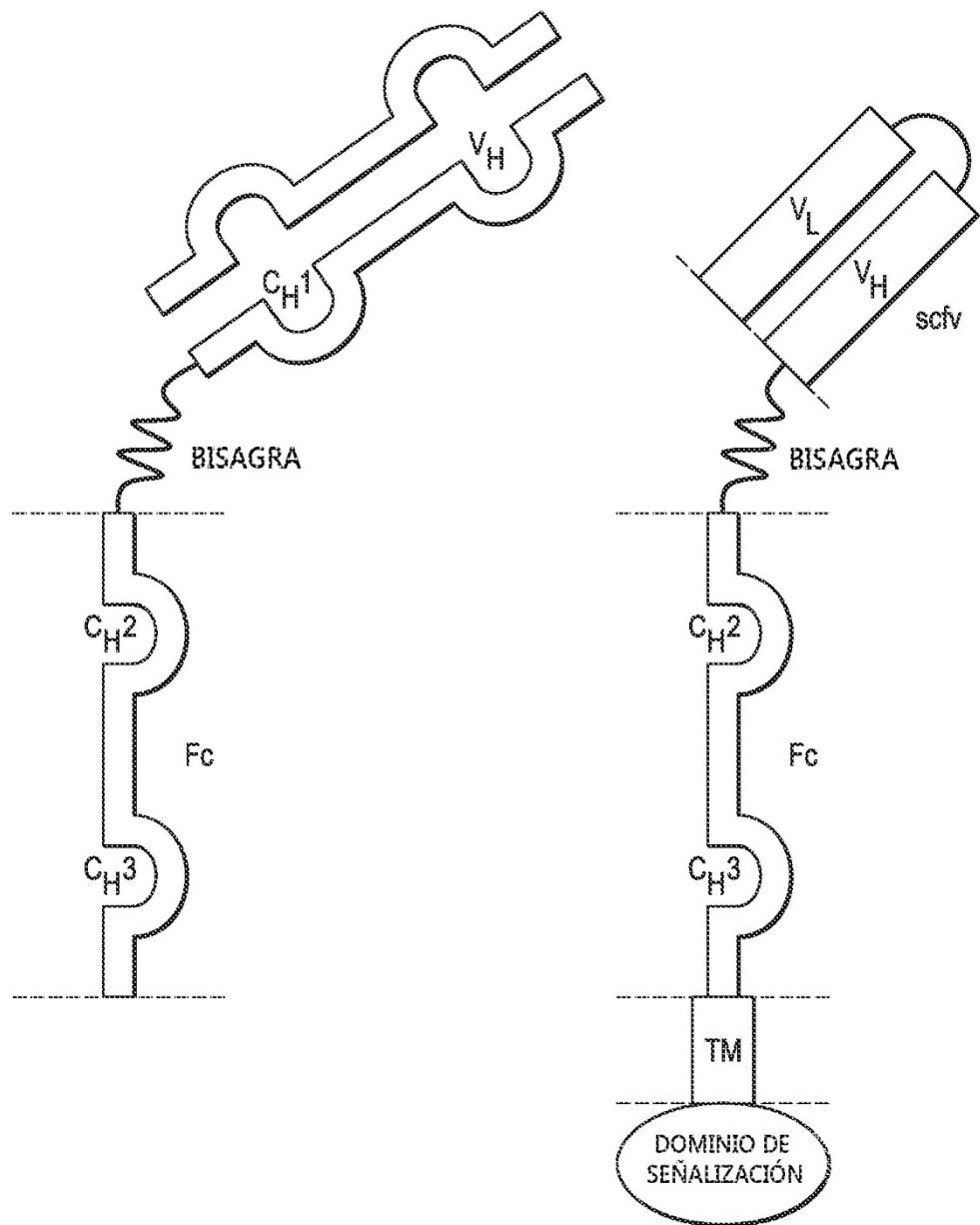


FIG. 24

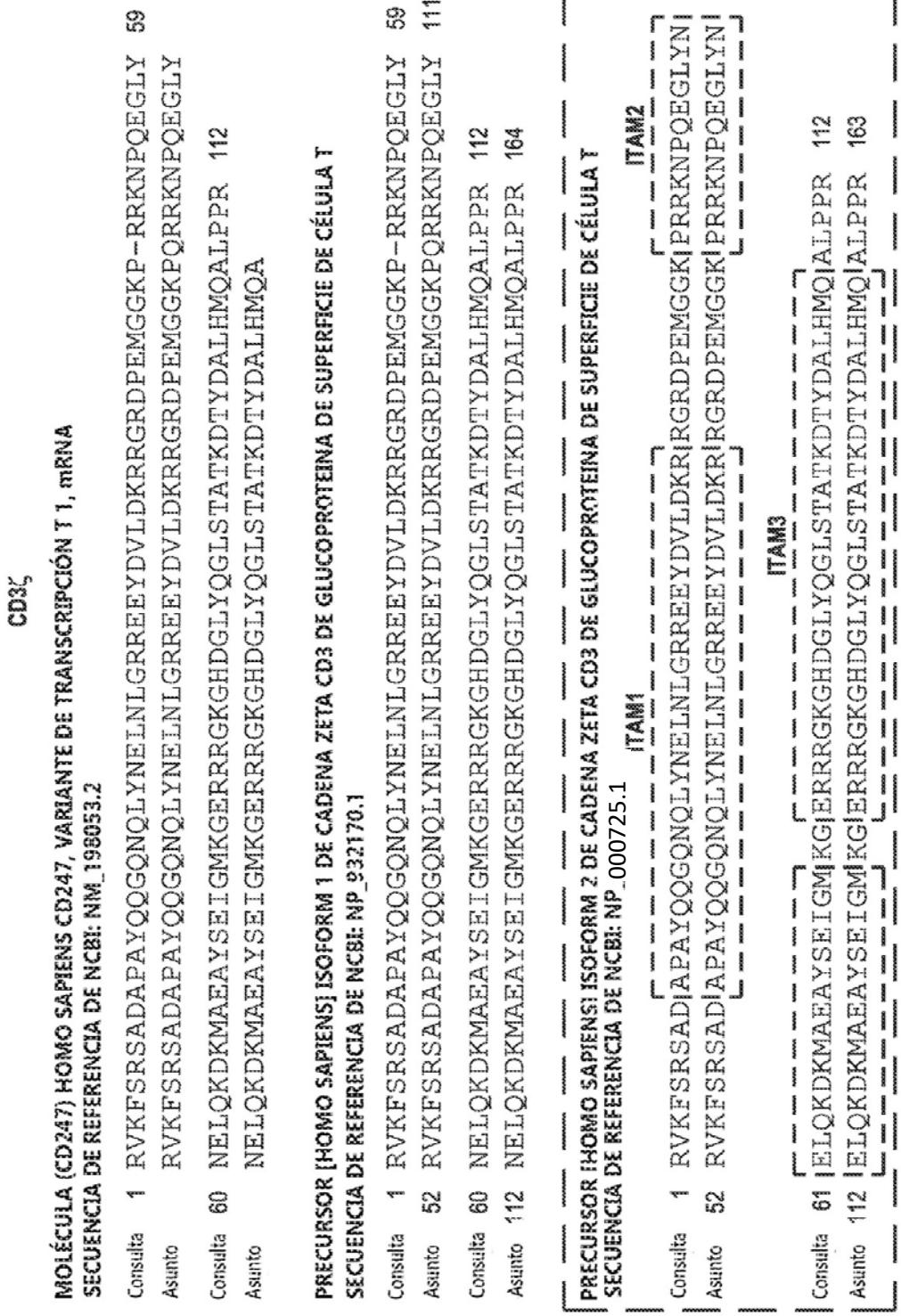
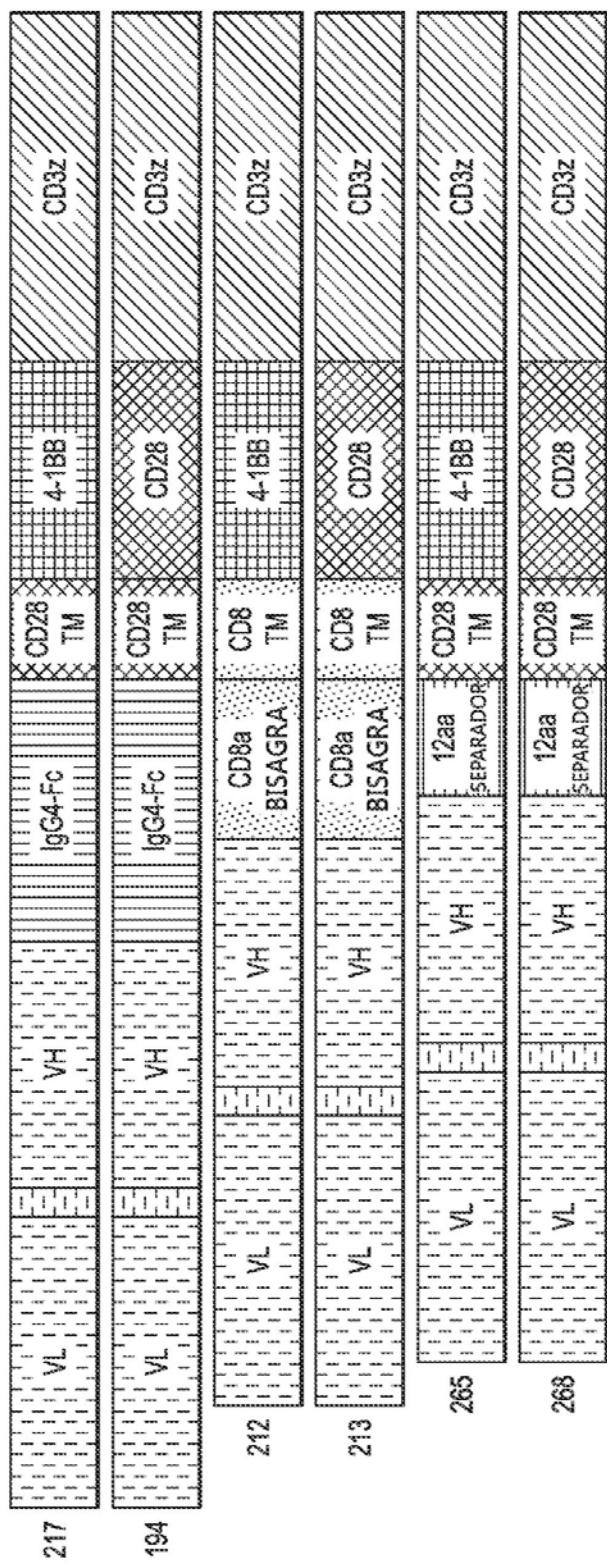


FIG. 25

FIG. 26

CARS*



ESKYGGPPCPPCP = IgG4 Fc BISAGRA = 12aa SEPARADOR

FIG. 27

CARS

CAR →	COOPER
SEPARADOR	CD28
Fc (230aa)	194
CD8 (47aa)	213
CORTO (12aa)	265
CD3 ₅	WT

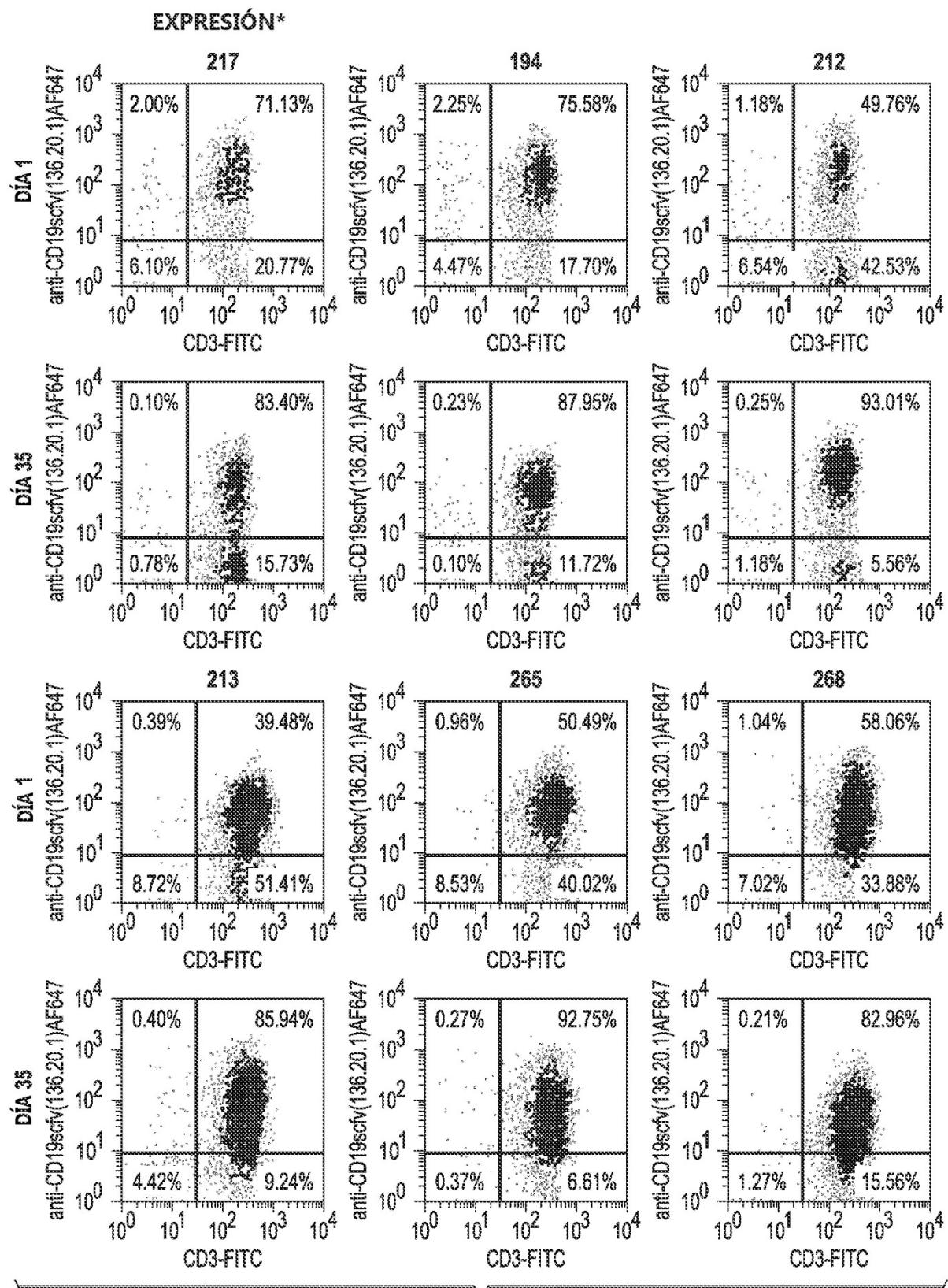
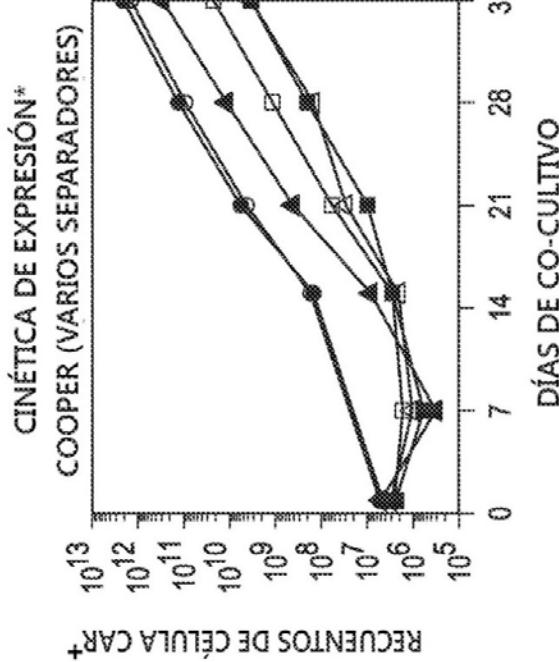
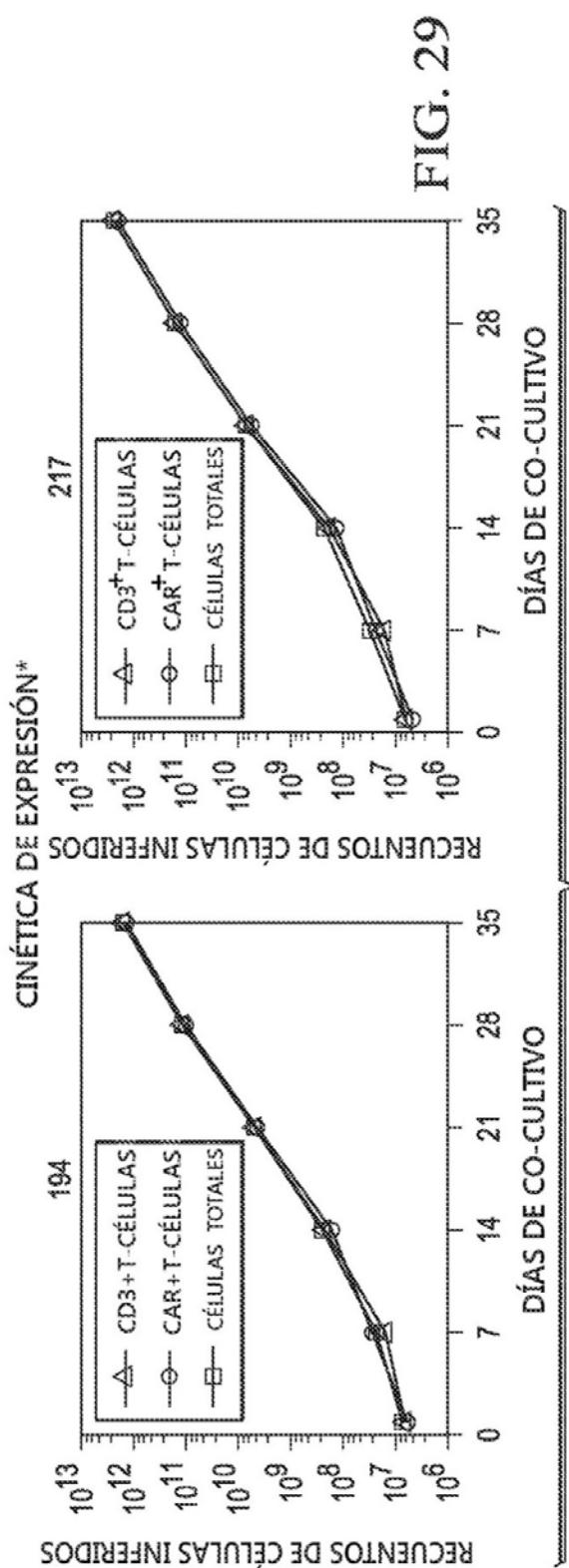


FIG. 28



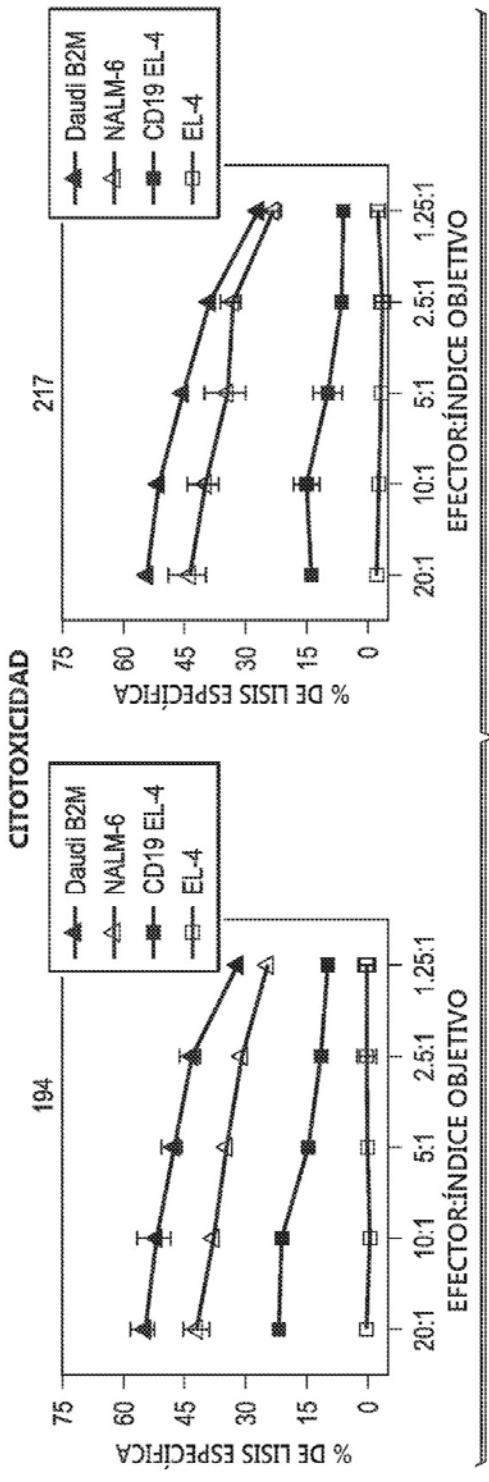


FIG. 31

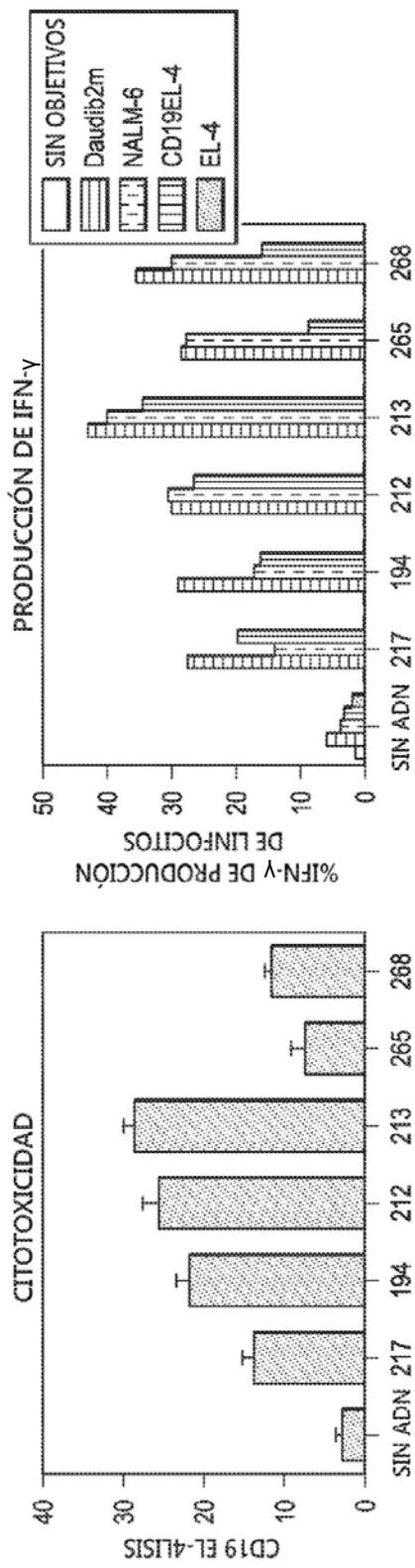


FIG. 32
FIG. 34

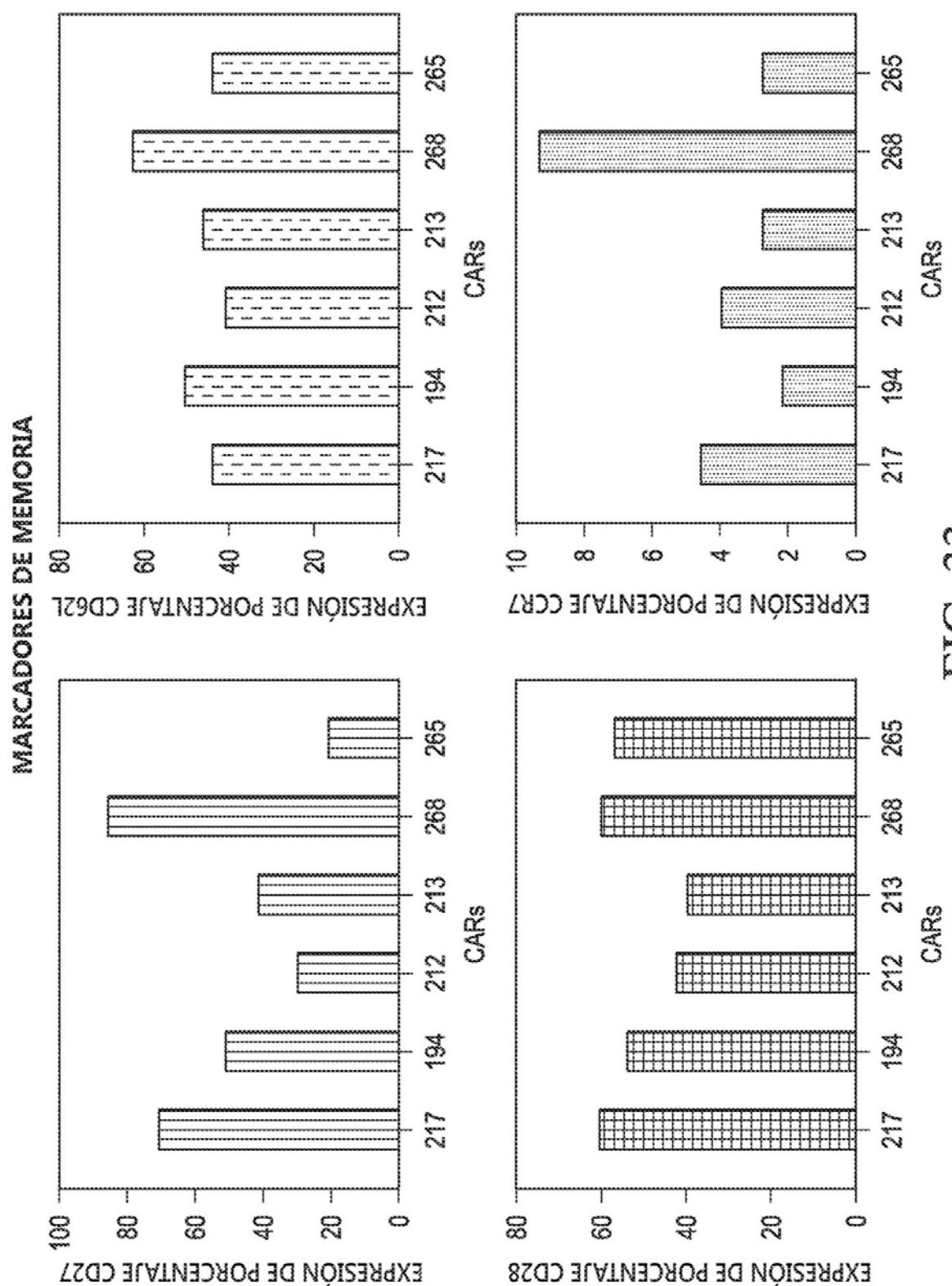


FIG. 33

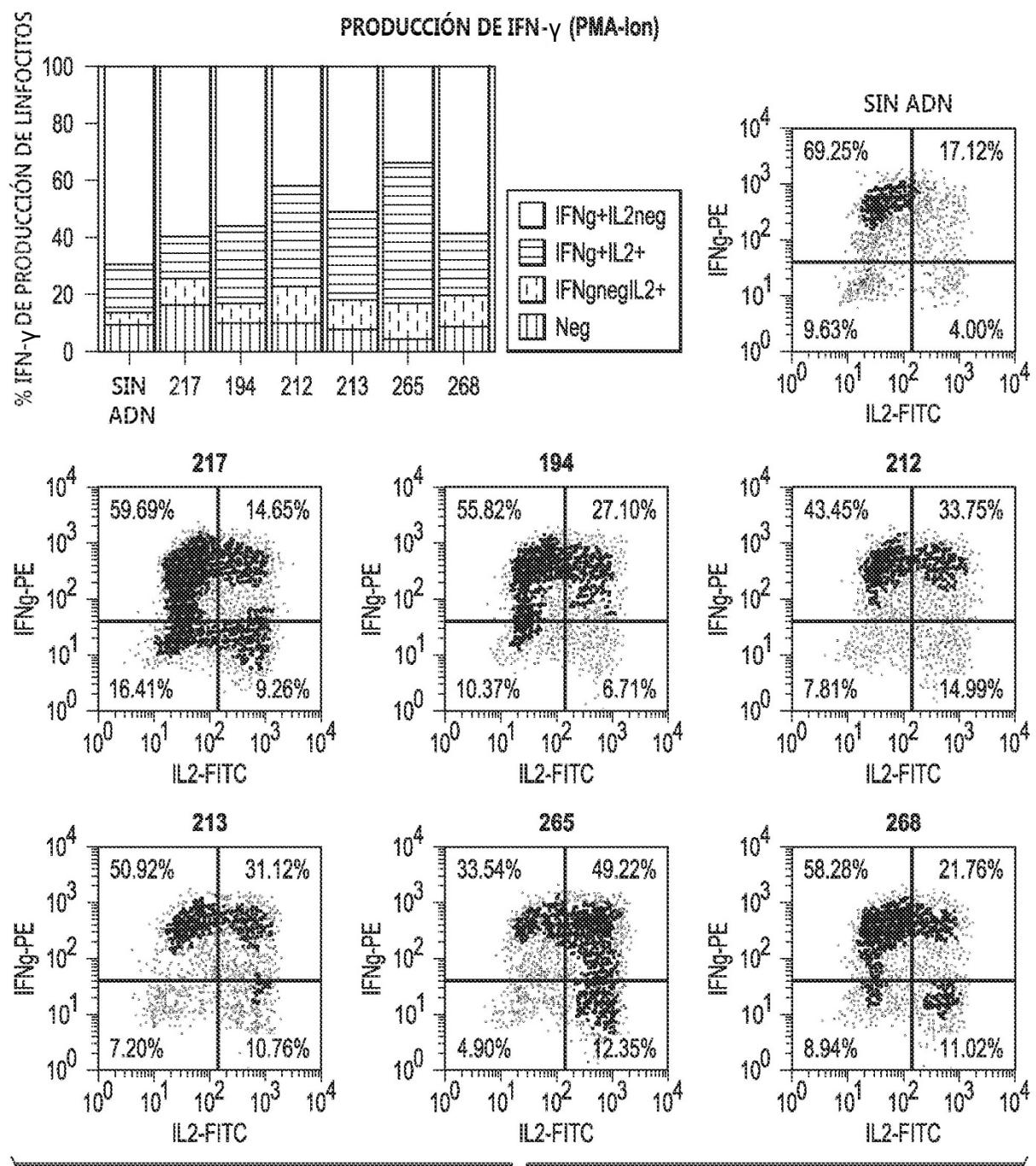
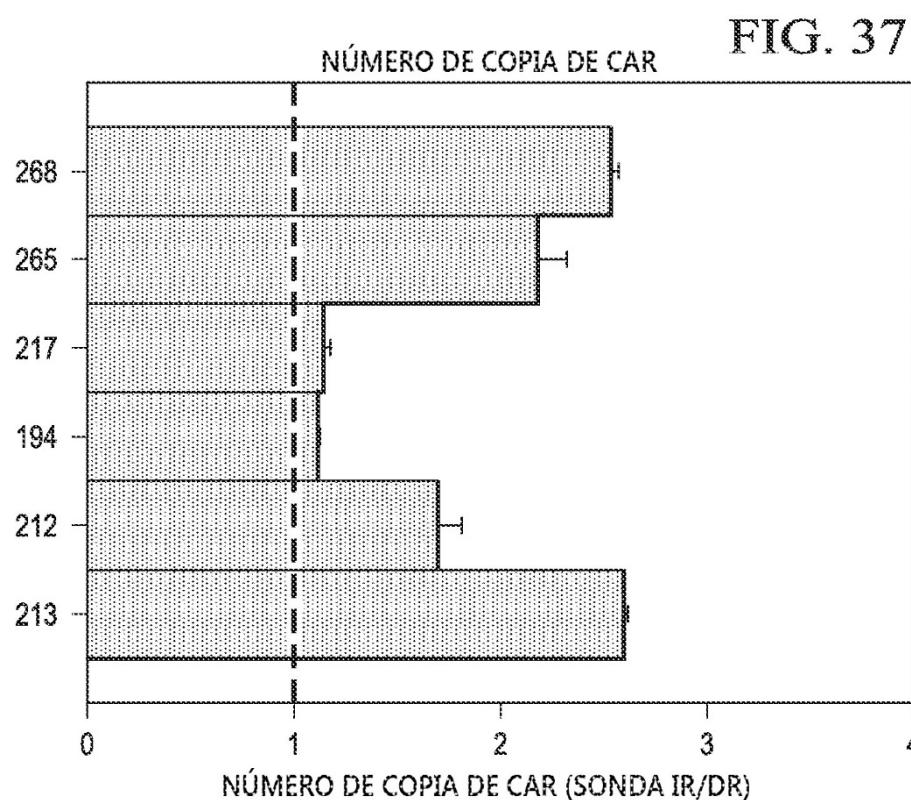
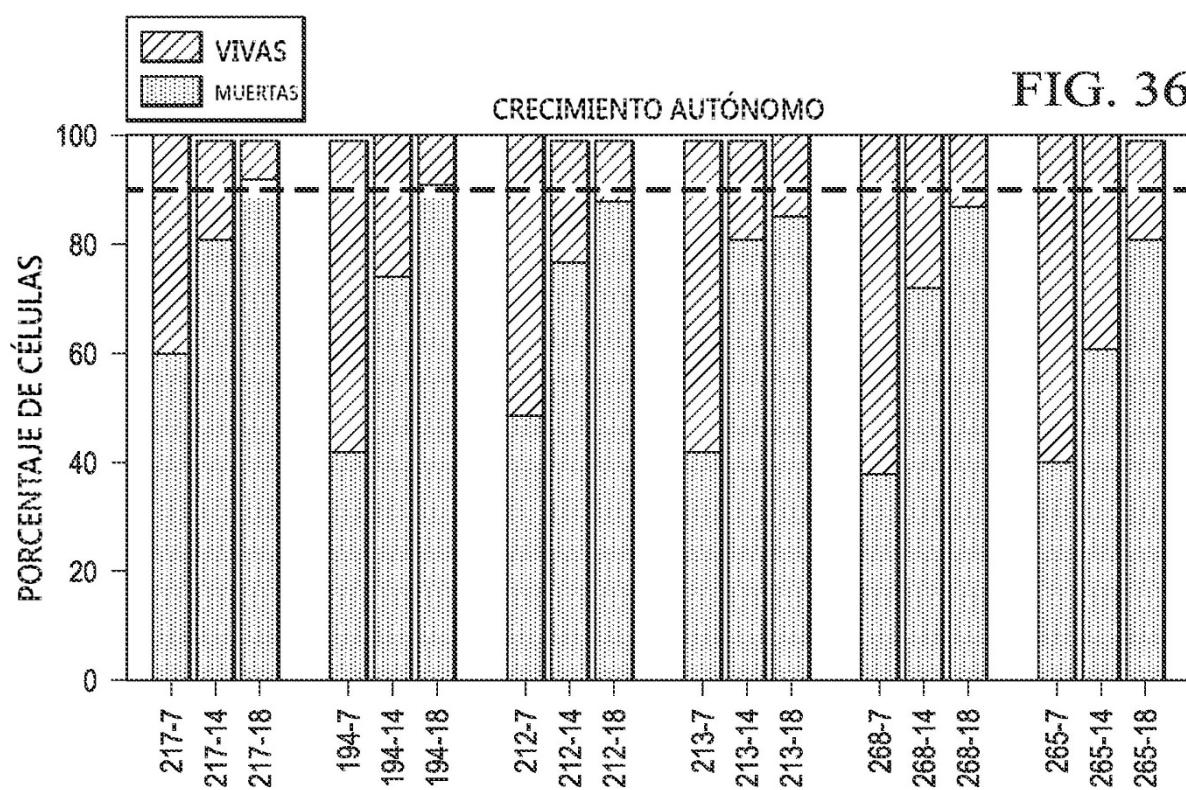
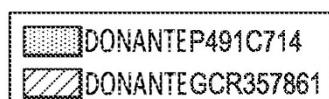


FIG. 35





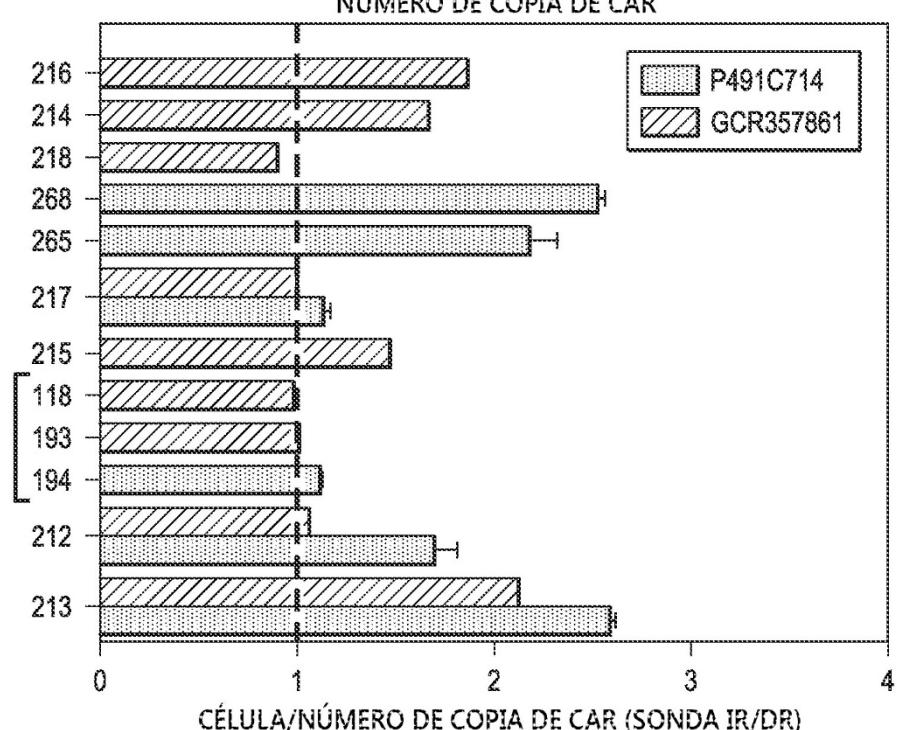
NÚMERO DE COPIA DE CAR

FIG. 38

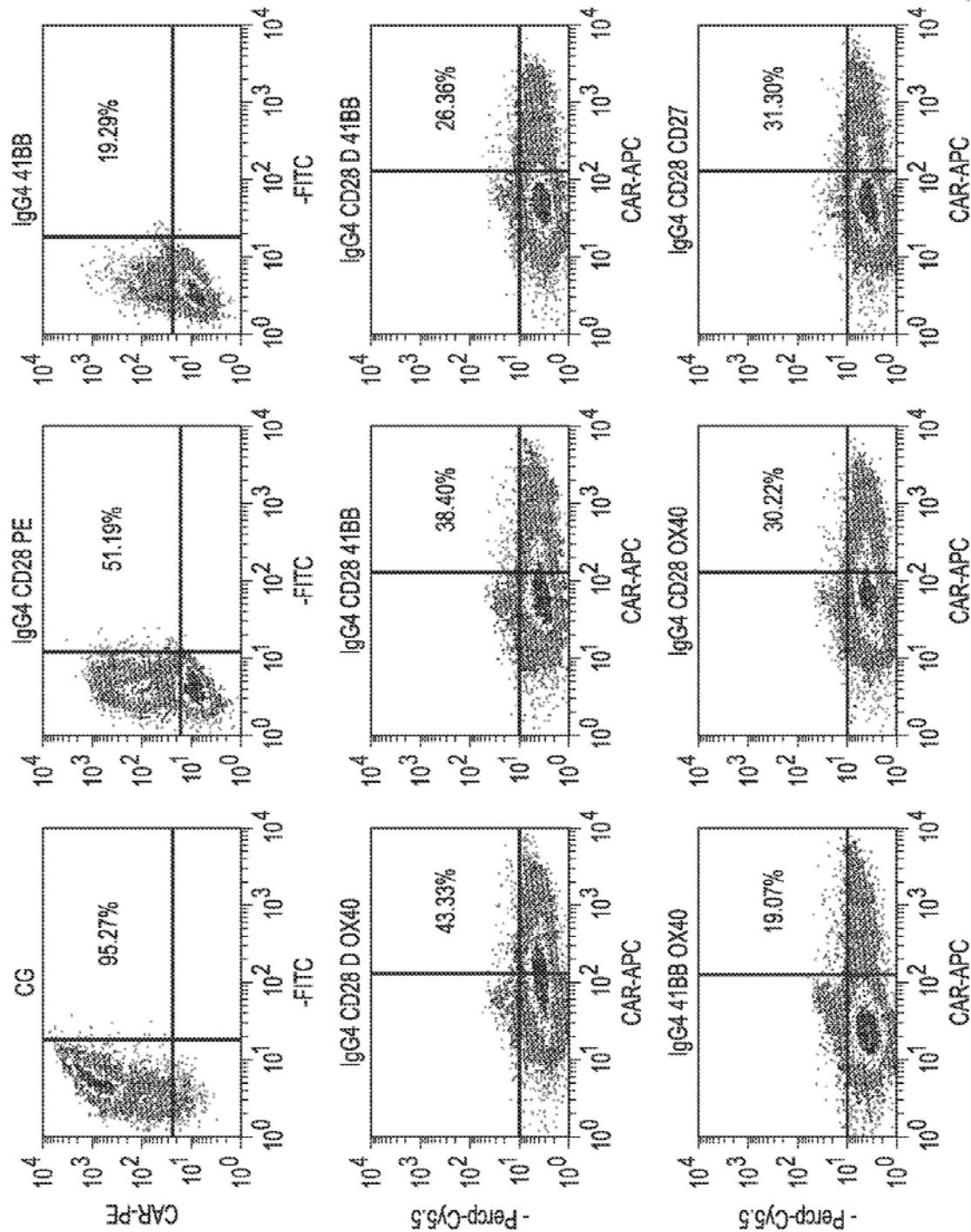
DOMINIOS	COOPER						
SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR	CD28			CD137			CD28+ CD137
TM/SEPARADOR	CD8	CD28	CD137	CD8	CD28	CD137	CD28
Fc (230aa)	215 (1.48)	194 (1.12) 193 (1.01) 118 (0.98)		214 (1.67)	217 (1.01, 1.14)	216 (1.87)	218 (0.90)
CD8 (47aa)	213 (2.13, 2.6)			212 (1.06, 1.7)			
CORTO (12aa)		265 (2.18)			268 (2.53)		
CD3 ζ	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

NÚMERO DE COPIA DE CAR

FIG. 39



TRANSFECIÓN DE CÉLULAS 293 HEK
CD19R CAR CON BISAGRAS Ig4 Y DIFERENTES ENDODOMINIOS:



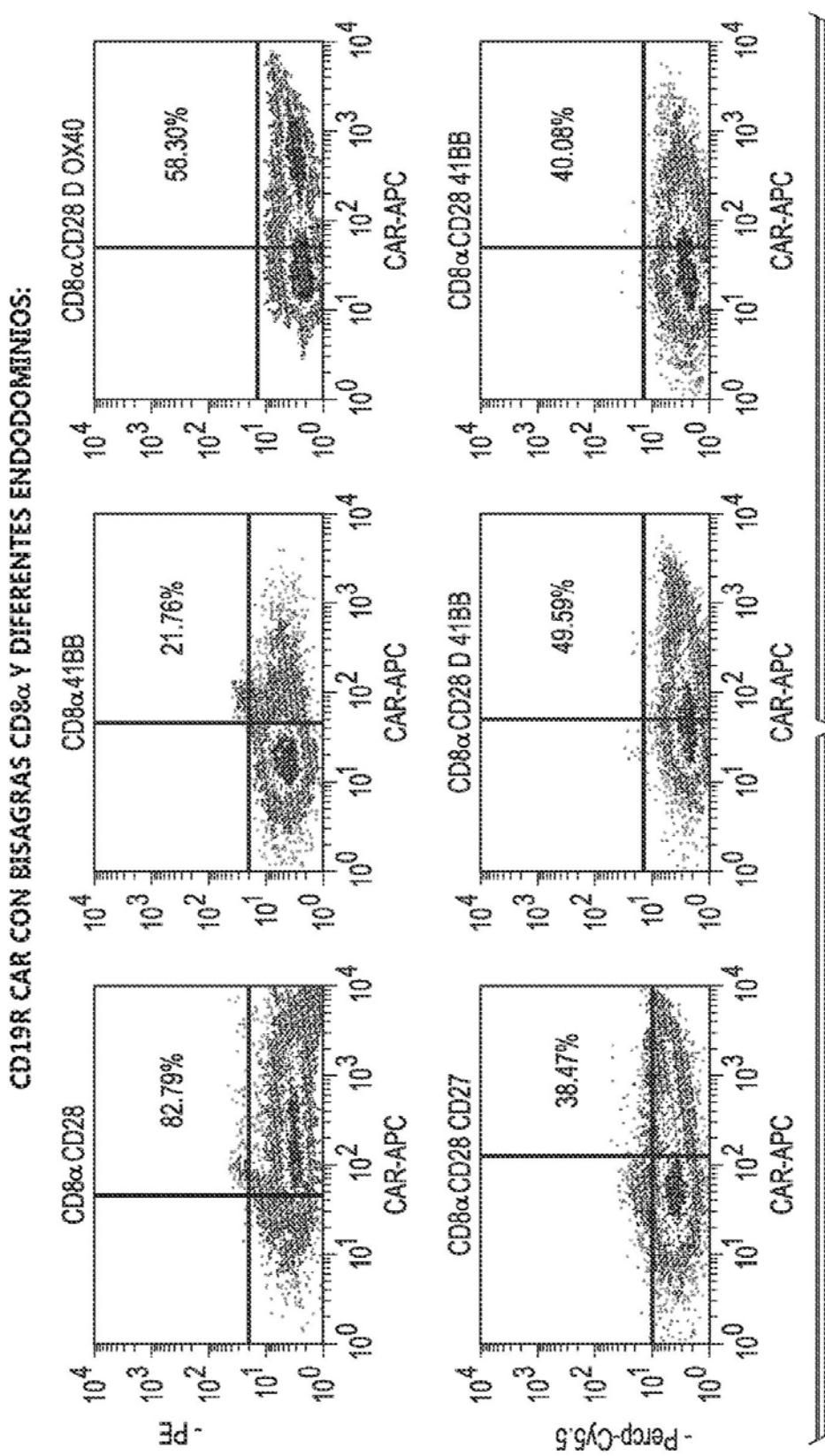


FIG. 40B

CD19R CAR CON t-12AA Y BISAGRAS t-20AA (CORTAS) Y DIFERENTES ENDODOMINIOS :

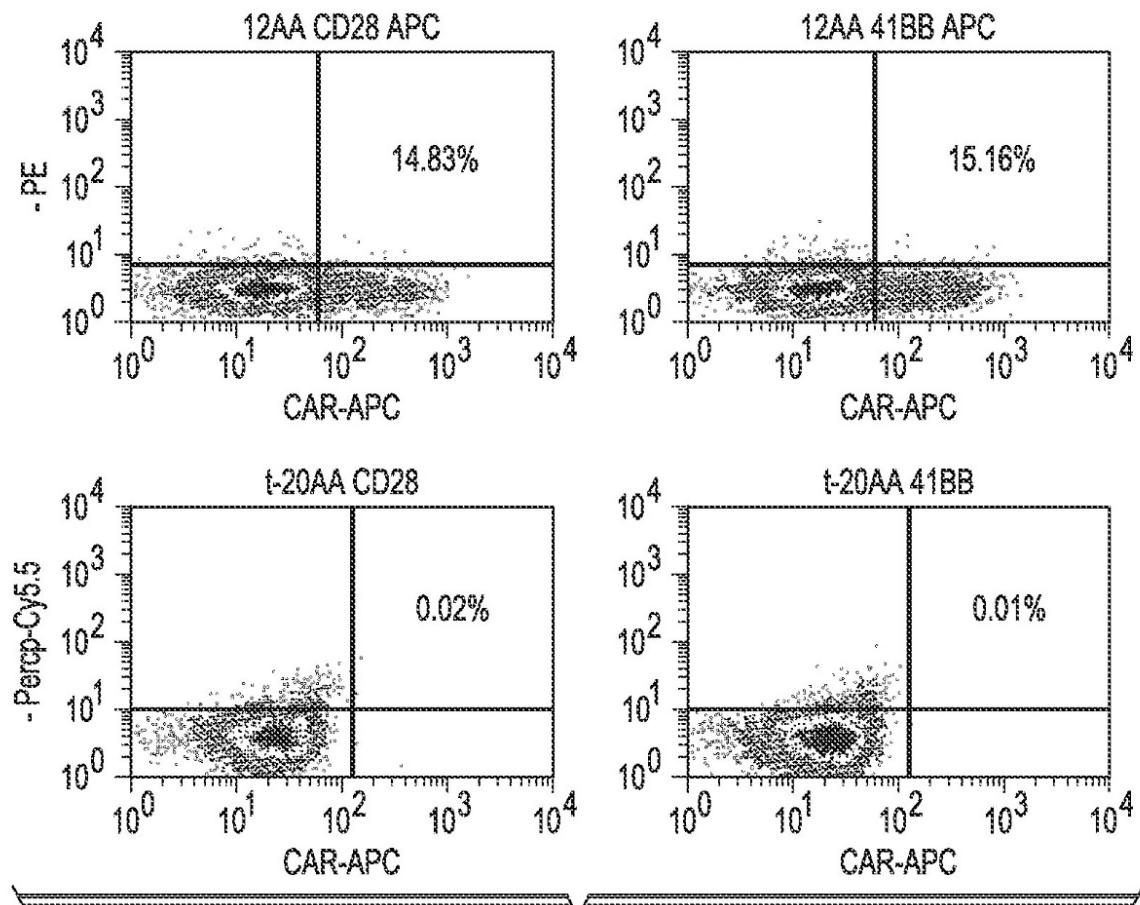


FIG. 40C

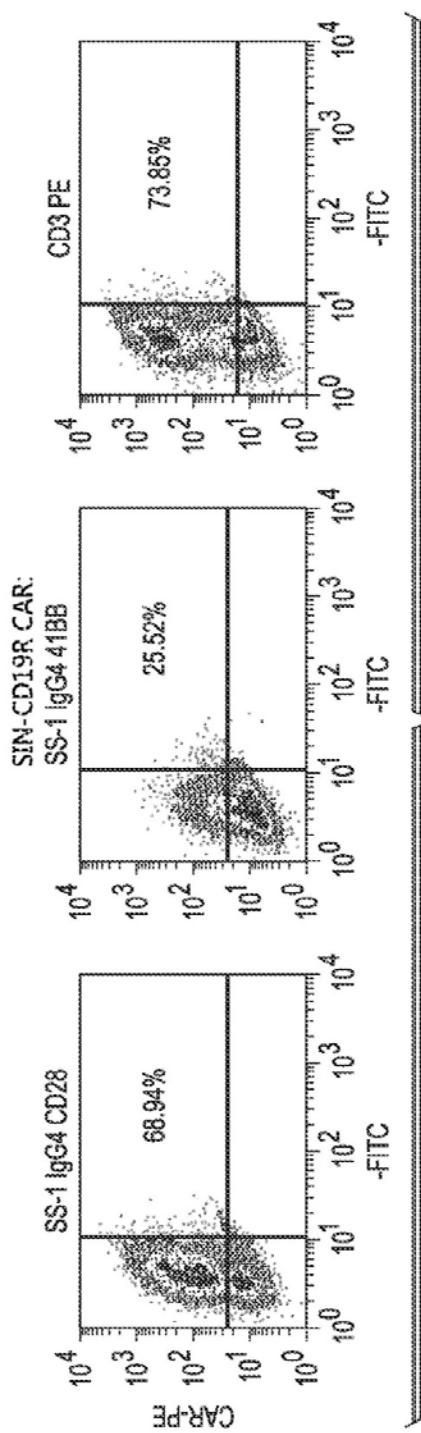


FIG. 40D

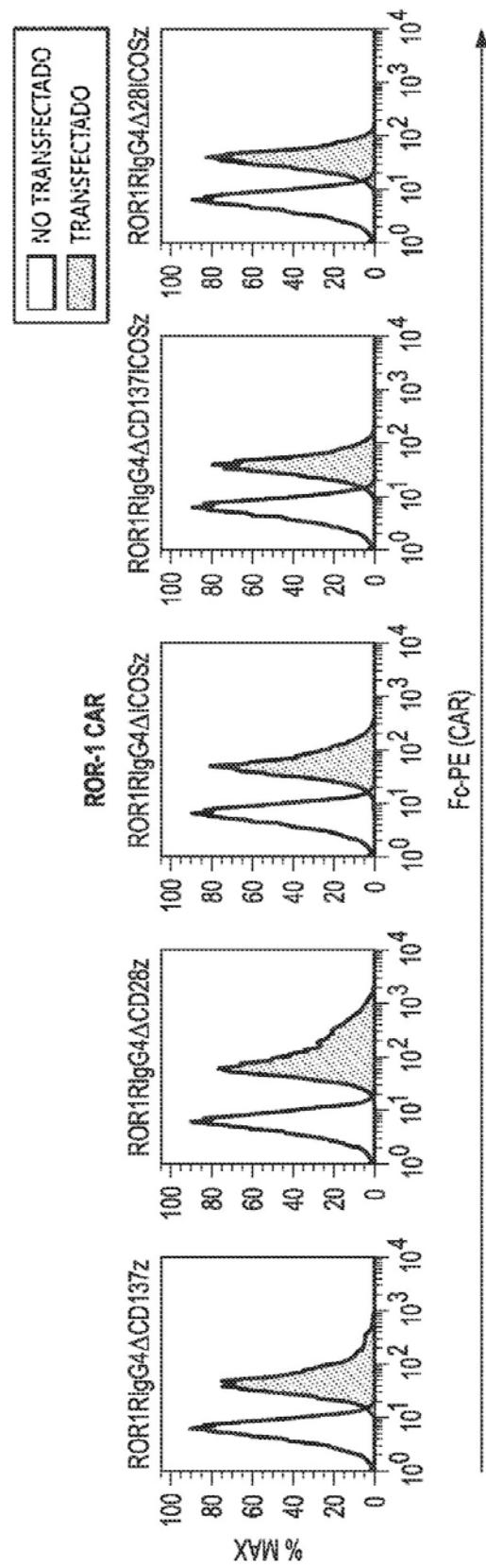


FIG. 40E

ESTRATEGIA DE REGULACIÓN PARA IDENTIFICAR LAS CÉLULAS EFECTORAS Y OBJETIVO QUE EXPRESAN GFP:

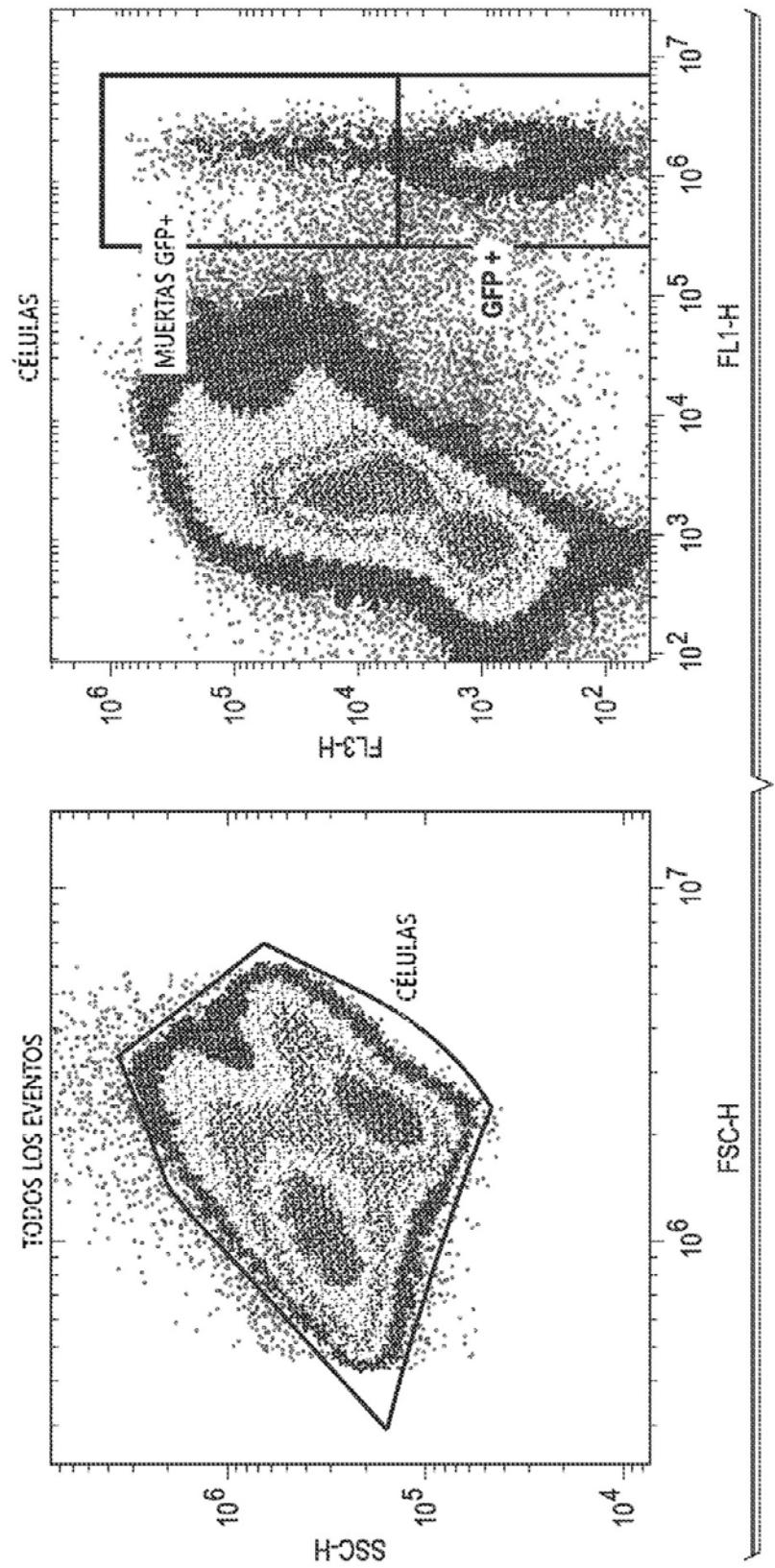


FIG. 41A-1

VISUALIZACIÓN EN TIEMPO REAL DE LA ADQUISICIÓN DE DATOS

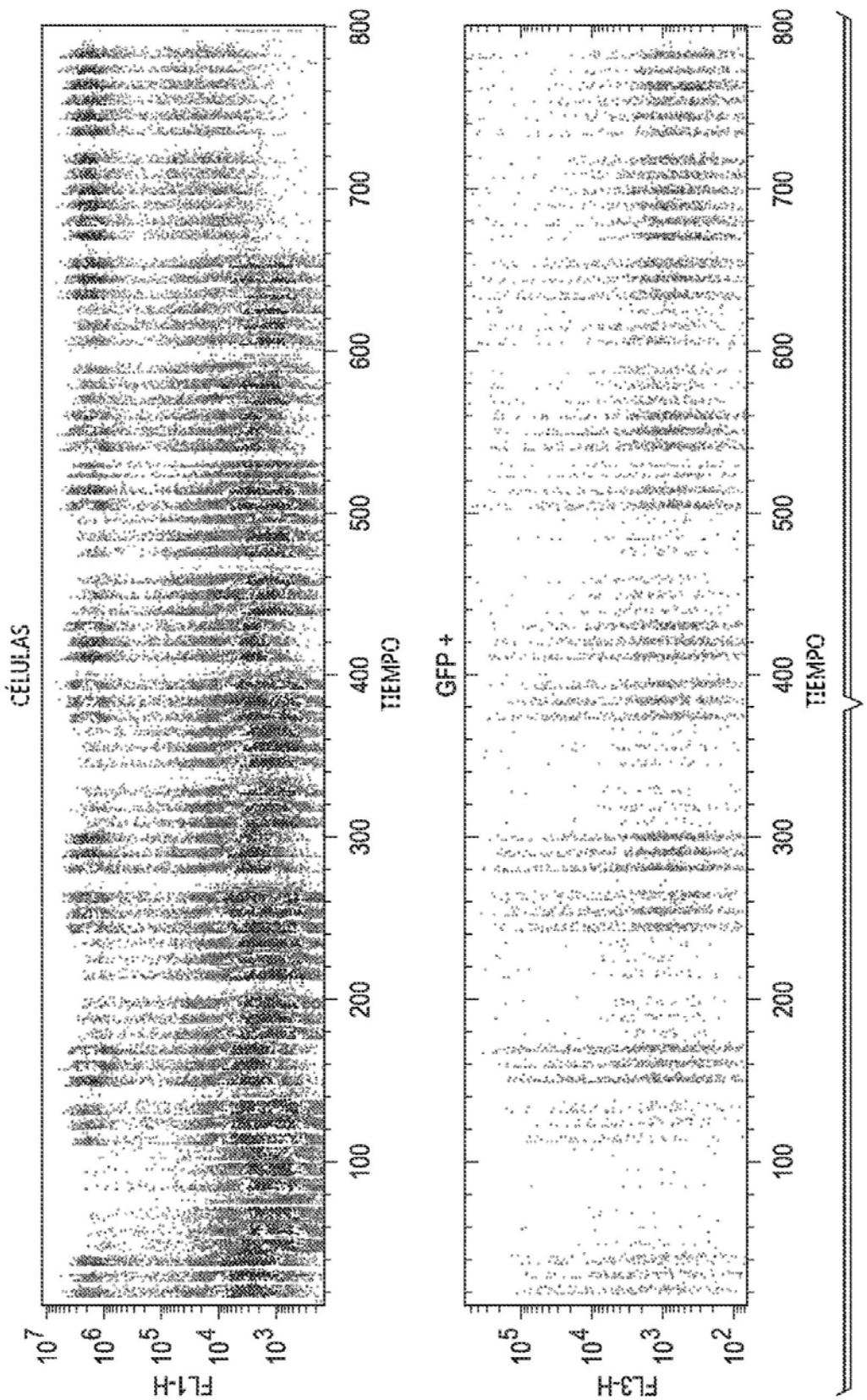


FIG. 41A-2

COMPARACIÓN DE ENSAYO DE DESTRUCCIÓN EN: EZ CAR CON DIFERENTES BISAGRAS EN IntelliCyt's iQue™

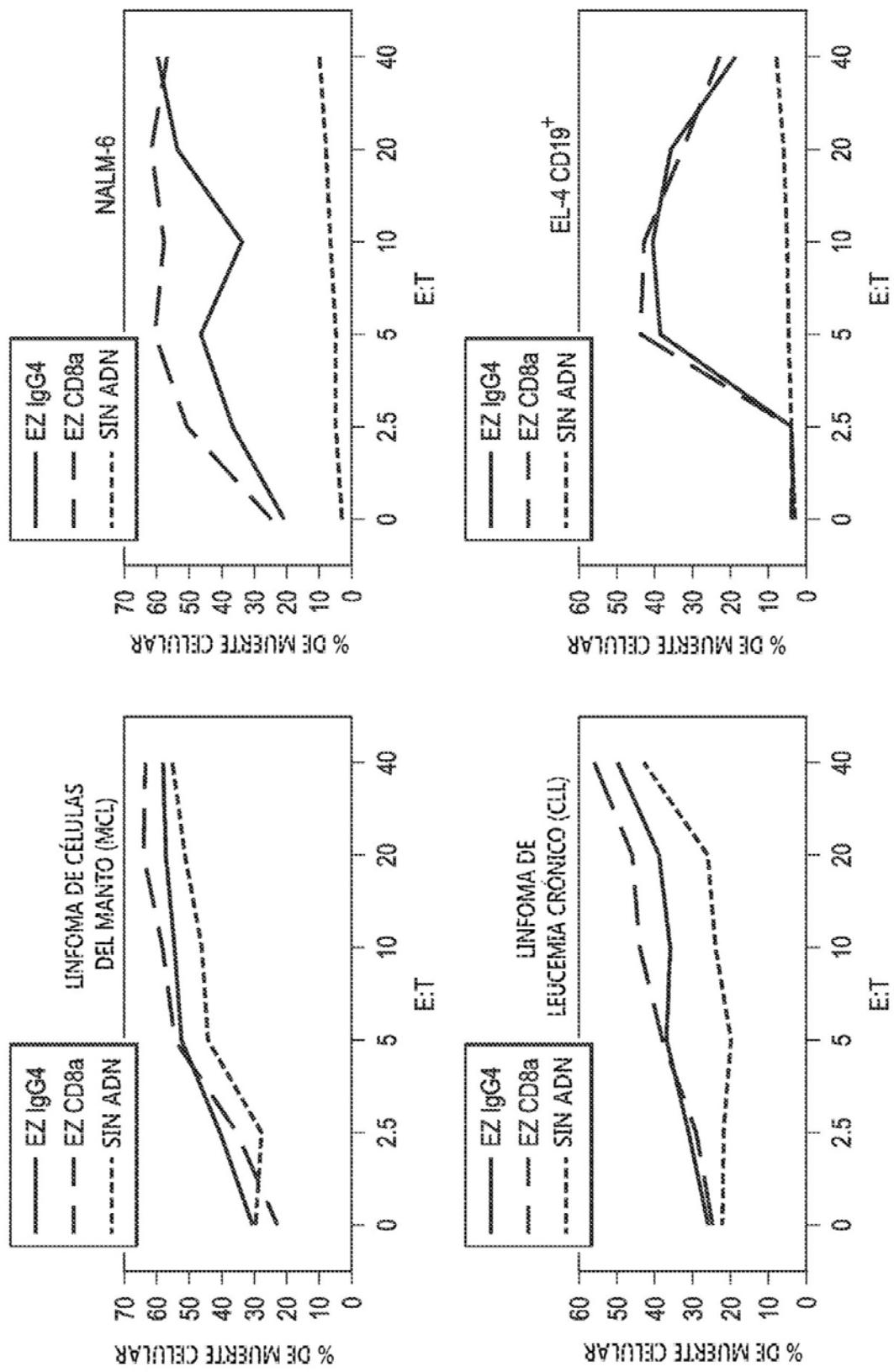
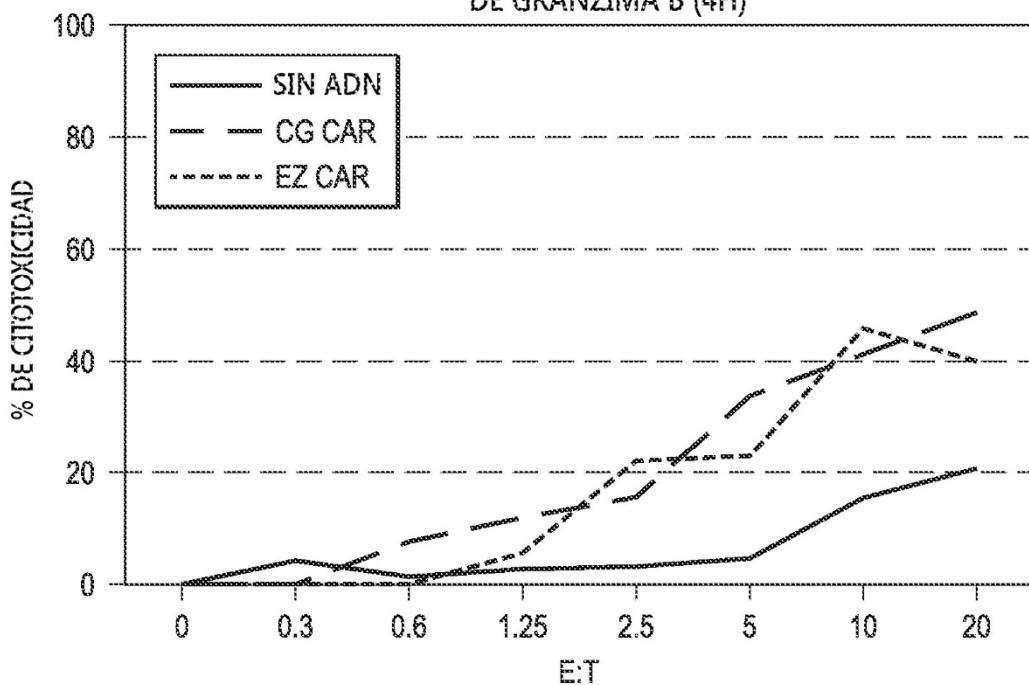


FIG. 41B

EL-4 CD19⁺ REPORTERO
DE GRANZIMA B (4H)

FIG. 42

EL-4 CD19⁺ REPORTERO
DE GRANZIMA B (10H)