

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 791**

51 Int. Cl.:

C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2017 PCT/US2017/030872**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.11.2017 WO17192741**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2017 E 17724672 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.10.2021 EP 3452583**

54 Título: **Nucleasas de ingeniería útiles para el tratamiento de la hemofilia A**

30 Prioridad:

03.05.2016 US 201662331335 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JANTZ, DEREK;
SMITH, JAMES, JEFFERSON;
BARTSEVICH, VICTOR;
BEARD, CLAYTON y
NICHOLSON, MICHAEL, G.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 905 791 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

Nucleasas de ingeniería útiles para el tratamiento de la hemofilia A

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere al el campo de la biología molecular y la tecnología de ácidos nucleicos recombinantes. En particular, la invención se refiere a nucleasas de ingeniería que tienen especificidad para una secuencia de reconocimiento dentro del intrón 22 de un gen del Factor VIII, dentro de la secuencia int22h-1. Dichas nucleasas de ingeniería son útiles en los procedimientos para tratar la hemofilia A caracterizada por una inversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La hemofilia A es un trastorno hemorrágico genético común con una incidencia de 1 de cada 5000 hombres en todo el mundo. Esta enfermedad genética puede ser el resultado de varias mutaciones dentro del gen del Factor VIII de la coagulación (F8) situado en el cromosoma X, que incluyen grandes deleciones, inserciones, inversiones y mutaciones puntuales. Clínicamente, la hemofilia A puede clasificarse en base a la actividad relativa del Factor VIII en el plasma del paciente como leve (5-30 % de actividad; 50 % de los pacientes), moderada (2-5 % de actividad; 10 % de los
15 pacientes) o grave (<1 % de actividad; 50 % de los pacientes). En la actualidad, no hay cura para la hemofilia A. La terapia estándar incluye la administración de Factor VIII recombinante, pero este enfoque está limitado por el coste, la necesidad de inyecciones frecuentes y la formación de anticuerpos inactivadores del Factor VIII en el sujeto que reducen la eficacia de la terapia. Por lo tanto, sigue existiendo una clara necesidad de tratamientos alternativos para la hemofilia A. La terapia génica, dirigida a las mutaciones en el gen del Factor VIII, sigue siendo un enfoque atractivo
20 aunque esquivo para el tratamiento.

El factor VIII es un componente esencial de la cascada de coagulación. La proteína circula en el cuerpo en una forma inactiva que se une al factor von Willebrand. En respuesta a una lesión, el Factor VIII se activa (Factor VIIIa) y se separa del factor de von Willebrand, luego interactúa con el Factor IXa como parte de la cascada de coagulación que conduce a la formación de fibrina y a la coagulación estable. Varios estudios han sugerido que el Factor VIII es
25 producido por las células endoteliales sinusoidales del hígado, así como por las células hematopoyéticas extrahepáticas de todo el cuerpo.

El gen del factor VIII en el cromosoma X es grande y estructuralmente complejo, que comprende ~180 kb y 26 exones. El gen del Factor VIII de tipo salvaje codifica dos proteínas. La primera proteína es la proteína del Factor VIII de longitud completa, que está codificada por las 9030 bases que se encuentran en los exones 1 a 26, y tiene una forma
30 circulante que contiene 2332 residuos de aminoácidos. La segunda proteína, denominada Factor VIIIb, está codificada por 2598 bases en 5 exones presentes en el gen del Factor VIII. La proteína resultante comprende 216 aminoácidos y tiene una función actualmente desconocida.

Aproximadamente el 45 % de los casos de hemofilia A grave están causados por una inversión intracromosómica que afecta al intrón 22 del gen del Factor VIII. Esta inversión se produce cuando un ~9,5 kb del intrón 22, denominado
35 int22h-1, se recombina con una de las dos copias repetidas (denominadas int22h-2 e int22h-3, respectivamente) que están situadas aproximadamente a 400 kb y 500 kb teloméricas del gen del factor VIII en el cromosoma X. Tras la recombinación, los exones 1-22 del gen del Factor VIII se invierten en el genoma con respecto a los exones 23-26, lo que da lugar a la expresión de una proteína del Factor VIII truncada e inactiva que carece de los aminoácidos codificados por los exones 23-26 (Sauna et al. (2015) Blood 125(2): 223-228).

40 La copia repetida corriente arriba implicada en la inversión del exón 1-22 está orientada en la dirección opuesta a la de int22h-1. Los primeros estudios sugirieron que tanto int22h-2 como int22h-3 estaban en orientación inversa con respecto a int22h-1, lo que permitía que se produjera la recombinación con cualquiera de las dos secuencias repetidas. Esto se denominó inversión de tipo I e inversión de tipo II. Sin embargo, pruebas más recientes indican que int22h-2 e int22h-3 se encuentran en una orientación inversa entre sí en el cromosoma X, y forman parte de un palíndromo
45 imperfecto (Fig. 1). La recombinación de secuencias dentro de este palíndromo permite que int22h-2 e int22h-3 intercambien lugares en el genoma y, en consecuencia, cambien su orientación respecto a int22h-1. Como resultado, la secuencia int22h-1 puede, en diferentes circunstancias, recombinarse con la repetición int22h-2 o la repetición int22h-3, dependiendo de cuál esté en la orientación opuesta a int22h-1 (Bagnall et al. (2006) Journal of Thrombosis and Haemostasis 4: 591-598).

50 Cabe destacar que el intrón 22 del gen del Factor VIII contiene una isla CpG que actúa como promotor bidireccional para otros dos genes, denominados F8A1 (Factor VIII-asociado 1) y F8B. La isla CpG y el gen F8A1 sin intrón (SEQ ID NO: 5) están contenidos en la secuencia int22h-1 (y, por consiguiente, en int22h-2 e int22h-3) y se transcriben en la dirección opuesta al gen del Factor VIII (Bowen (2002) J. Clin. Pathol. Mol. Pathol. 55: 127-144). Curiosamente, los inventores han determinado que la secuencia del gen F8A1 es la única región del gen del Factor VIII humano que
55 presenta una homología significativa con el gen del Factor VIII en el genoma canino, y en particular en una población clínicamente relevante de caninos con deficiencia de Factor VIII y que presentan una inversión de los exones 1-22 en su gen del Factor VIII (Lozier et al. (2002) PNAS 99(20): 12991-12996).

La presente invención requiere el uso de endonucleasas de corte raro específicas para el sitio que están de ingeniería para reconocer secuencias de ADN dentro de la secuencia int22h-1 con el fin de generar una ruptura de doble cadena y promover la recombinación entre int22h-1 y una secuencia repetida inversamente orientada (int22h-2 o int22h-3) posicionada teloméricamente al gen del Factor VIII. Los inventores han descubierto que la recombinación inducida por nucleasas entre estas regiones da lugar a una inversión o reversión de los exones 1-22 del gen del Factor VIII.

Los procedimientos para producir endonucleasas específicas de sitio de ingeniería son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) pueden ser de ingeniería para reconocer y cortar sitios predeterminados en un genoma. Las ZFN son proteínas quiméricas que comprenden un dominio de unión al ADN de dedo de zinc fusionado con el dominio nucleasa de la enzima de restricción FokI. El dominio del dedo de zinc puede ser rediseñado por medios racionales o experimentales para producir una proteína que se una a una secuencia de ADN predeterminada ~18 pares de bases de longitud. Al fusionar este dominio proteico de ingeniería con la nucleasa FokI, es posible dirigir las roturas de ADN con especificidad a nivel del genoma. Los ZFN se han utilizado ampliamente para dirigir la adición, eliminación y sustitución de genes en una amplia gama de organismos eucariotas (revisado en S. Durai et al., *Nucleic Acids Res* 33, 5978 (2005)).

Asimismo, se pueden generar nucleasas efectoras TAL (TALENs) para escindir sitios específicos en el ADN genómico. Al igual que un ZFN, un TALEN comprende un dominio de unión al ADN específico del sitio diseñado fusionado con el dominio de la nucleasa FokI (revisado en Mak, et al. (2013) *Curr Opin Struct Biol.* 23:93-9). En este caso, sin embargo, el dominio de unión al ADN comprende un conjunto en tándem de dominios efectores TAL, cada uno de los cuales reconoce específicamente un único par de bases de ADN.

Las TALEN compactas son una arquitectura de endonucleasas alternativa que evita la necesidad de dimerización (Beurdeley, et al. (2013) *Nat Commun.* 4:1762). Un TALEN compacto comprende un dominio de unión al ADN del efector TAL específico del sitio, fusionado con el dominio de la nucleasa de la endonucleasa de anidamiento I-TevI. A diferencia de FokI, I-TevI no necesita dimerizarse para producir una rotura de doble cadena de ADN, por lo que un TALEN compacto es funcional como monómero.

Las endonucleasas de ingeniería basadas en el sistema CRISPR/Cas9 también son conocidas en la técnica (Ran, et al. (2013) *Nat Protoc.* 8:2281-2308 Mali et al. (2013) *Nat Methods.* 10:957-63). Una endonucleasa CRISPR consta de dos componentes: (1) una nucleasa efectora de caspasas, típicamente la Cas9 microbiana; y (2) un "ARN guía" corto que comprende una secuencia de direccionamiento de ~20 nucleótidos que dirige la nucleasa a un lugar de interés en el genoma. Al expresar varios ARN guía en la misma célula, cada uno de ellos con una secuencia de orientación diferente, es posible dirigir las roturas de ADN simultáneamente a múltiples lugares del genoma.

En la realización preferida de la invención, el agente inductor de la ruptura del ADN es una endonucleasa de anidamiento de ingeniería (también llamada "meganucleasa"). Las endonucleasas anidamiento son un grupo de nucleasas de origen natural que reconocen sitios de corte de 15-40 pares de bases que se encuentran comúnmente en los genomas de plantas y hongos. Con frecuencia se asocian a elementos de ADN parásitos, como los intrones autoempalmados del grupo 1 y las inteínas. Promueven de forma natural la recombinación homóloga o la inserción de genes en lugares específicos del genoma del huésped produciendo una rotura de doble cadena en el cromosoma, que recluta la maquinaria celular de reparación del ADN (Stoddard (2006), *Q. Rev. Biophys.* 38: 49-95). Las endonucleasas anidamiento se agrupan comúnmente en cuatro familias: la familia LAGLIDADG, la familia GIY-YIG, la familia His-Cys box y la familia HNH. Estas familias se caracterizan por motivos estructurales, que afectan a la actividad catalítica y a la secuencia de reconocimiento. Por ejemplo, los miembros de la familia LAGLIDADG se caracterizan por tener una o dos copias del motivo conservado LAGLIDADG (véase Chevalier et al. (2001), *Nucleic Acids Res.* 29(18): 3757-3774). Las endonucleasas de anidamiento LAGLIDADG con una sola copia del motivo LAGLIDADG forman homodímeros, mientras que los miembros con dos copias del motivo LAGLIDADG se encuentran como monómeros.

I-Crel (SEQ ID NO: 1) es un miembro de la familia LAGLIDADG de endonucleasas de anidamiento que reconoce y corta una secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases en el cromosoma del cloroplasto del alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Se han utilizado técnicas de selección genética para modificar la preferencia del sitio de corte de I-Crel de tipo salvaje (Sussman et al. (2004), *J. Mol. Biol.* 342: 31-41 Chames et al. (2005), *Nucleic Acids Res.* 33: e178 Seligman et al. (2002), *Nucleic Acids Res.* 30: 3870-9, Arnould et al. (2006), *J. Mol. Biol.* 355: 443-58). Se describieron procedimientos para el diseño racional de endonucleasas de anidamiento mono-LAGLIDADG que son capaces de rediseñar ampliamente I-Crel y otras endonucleasas de anidamiento para dirigirse a sitios de ADN ampliamente divergentes, incluyendo sitios en genomas de mamíferos, levaduras, plantas, bacterias y virus (WO 2007/047859).

Como se describe por primera vez en WO 2009/059195, I-Crel y sus derivados de ingeniería son normalmente dimericos pero pueden fusionarse en un solo polipéptido utilizando un enlazador peptídico corto que une el C-terminal de una primera subunidad con el N-terminal de una segunda subunidad (Li, et al. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37:1650-62 Grizot, et al. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37:5405-19 WO 2009/095742.) Así, una meganucleasa funcional de "cadena única" puede expresarse a partir de un único transcrito. Esto, unido a la bajísima frecuencia de corte fuera del objetivo observada con las meganucleasas de ingeniería, las convierte en la endonucleasa preferida para la presente invención.

El uso de nucleasas de ingeniería para la terapia génica en la hemofilia A grave ha sido limitado. Park et al. describieron el uso de un TALEN para inducir una inversión del exón 1 en el gen del Factor VIII en células HEK 293T y en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) (Park et al. (2014), PNAS 111(25): 9253-9258). Las inversiones del exón 1 también se asocian a la aparición de la hemofilia A y se producen debido a la recombinación homóloga entre una secuencia int1h-1 en el intrón 1 del gen del Factor VIII y una única región homóloga (intlh-2) situada en el telómero del gen del Factor VIII. El TALEN seleccionado para este estudio cortó dentro de la región de homología del intrón 1 para inducir una inversión de esta secuencia más corta con una eficiencia del 1,9 % y del 1,4 % en las células HEK 293T y en las iPSC, respectivamente. Los autores demostraron además la reversión del exón 1 en las iPSC con una eficacia similar del 1,3 %.

En un estudio posterior, Park et al. informaron del uso de un sistema CRISPR/Cas para inducir una reversión de los exones 1-22 del gen del Factor VIII en iPSCs obtenidas de pacientes que padecían hemofilia A grave (Park et al. (2015) Cell Stem Cell 17: 213-220). Los autores señalaron que las inversiones de los exones 1-22 son ocho veces más frecuentes que las inversiones del exón 1, pero destacaron que la inversión del exón 1-22 es técnicamente más difícil de revertir debido, en parte, al tamaño sustancialmente mayor de la inversión (600 kbp en comparación con 140 kbp) y a la presencia de tres homólogos de la secuencia int22h-1 en el cromosoma X, en comparación con sólo dos homólogos de la secuencia int1h-1. De hecho, Park et al. se dirigen específicamente a secuencias de reconocimiento fuera de las regiones de homología int22h-1, int22h-2 e int22h-3 para descartar la posibilidad de que se induzcan delecciones o inversiones no deseadas que impliquen a dos de los tres homólogos de int22, en lugar de la deseada reversión del segmento invertido de 600 kbp, al cortar dentro de una región de homología int22h. Utilizando este enfoque, los autores observaron una frecuencia de reversión de aproximadamente el 3,7 % en las células iPS.

La presente invención mejora la técnica en varios aspectos. A pesar de las sugerencias en el arte de evitar la orientación de las secuencias de reconocimiento dentro de las regiones de homología int22h, los inventores sorprendentemente encontraron que la orientación de las secuencias de reconocimiento dentro de int22h-1 puede, de hecho, producir una inversión o reversión de los exones 1-22 en el Factor VIII con alta eficiencia. Además, varias secuencias de reconocimiento dirigidas dentro de la secuencia int22h-1 se encuentran dentro de la secuencia F8A1, que los inventores encontraron como la única región del gen del Factor VIII que comparte un alto grado de homología con el gen del Factor VIII canino. Así, los procedimientos de la invención son útiles no sólo en sujetos humanos que sufren de hemofilia A, sino también en la población canina de hemofilia A clínicamente relevante que también expresa una inversión de los exones 1-22. Por consiguiente, la presente invención satisface una necesidad en el arte de otros enfoques de terapia génica para la hemofilia A grave.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación proporciona nucleasas de ingeniería útiles para el tratamiento de la hemofilia A, que se caracteriza por una inversión de los exones 1-22 del gen del Factor VIII. Las nucleasas de ingeniería de la divulgación reconocen y escinden una secuencia de reconocimiento dentro de una secuencia int22h-1 del gen del Factor VIII, promoviendo así la recombinación entre la secuencia int22h-1 y una secuencia de repetición invertida idéntica, o altamente homóloga, situada teloméricamente al gen del Factor VIII en el cromosoma X. Esta recombinación da lugar a una reversión de los exones 1-22 para generar un gen del Factor VIII de tipo salvaje. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de la hemofilia A que utilizan una nucleasa de ingeniería que tiene especificidad para una secuencia de reconocimiento situada dentro de la secuencia int22h-1 del gen del Factor VIII. Además, se divulgan células modificadas genéticamente que han sido modificadas para corregir una inversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII, así como composiciones farmacéuticas que comprenden dichas células modificadas genéticamente y procedimientos de uso de las mismas para el tratamiento de la hemofilia A.

Se divulga una meganucleasa de ingeniería que reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento dentro de una secuencia int22h-1 de un gen del Factor VIII. La meganucleasa de ingeniería comprende una primera subunidad y una segunda subunidad, en la que la primera subunidad se une a un primer semisito de reconocimiento de la secuencia de reconocimiento y comprende una primera región hipervariable (HVR1), y en la que la segunda subunidad se une a un segundo semisito de reconocimiento de la secuencia de reconocimiento y comprende una segunda región hipervariable (HVR2).

La secuencia int22h-1 tiene al menos un 95 %, o más, de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. La secuencia int22h-1 puede comprender la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

La secuencia de reconocimiento está dentro de una secuencia codificadora F8A1 del gen del Factor VIII. La secuencia codificadora F8A1 tiene al menos un 95 %, o más, de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. La secuencia codificadora de F8A1 puede comprender la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

La secuencia de reconocimiento puede comprender SEQ ID NO: 7.

- La región HVR1 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 215-270 de la SEQ ID NO: 19 o los residuos 24-79 de cualquiera de las SEQ ID NO: 20-21.
- 5 La región HVR1 puede comprender residuos correspondientes a los residuos 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 266 y 268 de la SEQ ID NO: 19 o los residuos 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 y 77 de cualquiera de las SEQ ID NO: 20-21.
- La región HVR1 puede comprender los residuos 215-270 de la SEQ ID NO: 19 o los residuos 24-79 de cualquiera de las SEQ ID NO: 20-21.
- 10 La región HVR2 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 24-79 de la SEQ ID NO: 19 o los residuos 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NO: 20-21.
- La región HVR2 puede comprender residuos correspondientes a los residuos 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 68, 70, 75 y 77 de la SEQ ID NO: 19 o los residuos 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 259, 261, 266 y 268 de cualquiera de las SEQ ID NO: 20-21.
- 15 La región HVR2 puede comprender los residuos 24-79 de la SEQ ID NO: 19 o los residuos 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NO: 20-21.
- La primera subunidad puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o más, de identidad de secuencia con los residuos 198-344 de la SEQ ID NO: 19 o los residuos 7-153 de la SEQ ID NO: 20 o 21, y la segunda subunidad puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o más, de identidad de secuencia con los residuos 7-153 de la SEQ ID NO: 19 o los residuos 198-344 de la SEQ ID NO: 20 o 21.
- 20 La primera subunidad puede comprender los residuos 198-344 de la SEQ ID NO: 19 o los residuos 7-153 de la SEQ ID NO: 20 o 21. La segunda subunidad puede comprender los residuos 7-153 de la SEQ ID NO: 19 o los residuos 198-344 de la SEQ ID NO: 20 o 21.
- 25 La meganucleasa de ingeniería puede ser una meganucleasa de cadena única que comprende un enlazador, en el que el enlazador une covalentemente la primera subunidad y la segunda subunidad.
- La meganucleasa de ingeniería puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-21.
- 30 La secuencia de reconocimiento puede comprender la SEQ ID NO: 9.
- La región HVR1 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-31.
- 35 La región HVR1 puede comprender residuos correspondientes a los residuos 215, 217, 219, 221, 223, 224, 231, 233, 235, 237, 261, 266 y 268 de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-31.
- La región HVR1 puede comprender los residuos 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-31.
- La región HVR2 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos 24-79 de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-31.
- 40 La región HVR2 puede comprender residuos correspondientes a los residuos 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 75 y 77 de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-31.
- La región HVR2 puede comprender además un residuo correspondiente al residuo 73 de la SEQ ID NO: 30.
- La región HVR2 puede comprender los residuos 24-79 de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-31.
- 45 La primera subunidad puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o más, de identidad de secuencia con los residuos 198-344 de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-31, y la segunda subunidad puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o más, de identidad de secuencia con los residuos 7-153 de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-31.
- 50 La primera subunidad puede comprender los residuos 198-344 de cualquiera de las SEQ ID NOs: 28-31. La segunda subunidad puede comprender los residuos 7-153 de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-31.

La meganucleasa de ingeniería es una meganucleasa de cadena única que comprende un enlazador, en el que el enlazador une covalentemente la primera subunidad y la segunda subunidad.

La meganucleasa de ingeniería puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 28-31.

- 5 Se divulga además un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquier meganucleasa de ingeniería de la divulgación. El polinucleótido aislado puede ser un ARNm.

Además, se divulga un constructo de ADN recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquier meganucleasa de ingeniería de la divulgación.

El constructo de ADN recombinante puede ser autoescindible.

- 10 El constructo de ADN recombinante puede codificar un vector viral. En dicha realización, el vector viral puede ser un retrovirus, un lentivirus, un adenovirus o un vector de virus adeno-asociado (AAV). El vector viral puede ser un vector AAV recombinante.

Se divulga además un vector viral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquier meganucleasa de ingeniería de la divulgación.

- 15 El vector viral puede ser un retrovirus, un lentivirus, un adenovirus o un vector de virus adeno-asociado (AAV). El vector viral puede ser un vector AAV recombinante.

La invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que tiene hemofilia A. En tal aspecto, la hemofilia A se caracteriza por una inversión de los exones 1-22 en un gen del Factor VIII. La composición farmacéutica comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un ácido nucleico que codifica una nucleasa de ingeniería, en la que la nucleasa de ingeniería se expresa en una célula diana in vivo; en la que la nucleasa de ingeniería tiene especificidad para una primera secuencia de reconocimiento situada dentro de una secuencia int22h-1 del gen del Factor VIII en la célula diana.

- 20 La secuencia int22h-1 tiene al menos un 95 %, o más, de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En una de estas realizaciones, la secuencia int22h-1 puede comprender la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

- 25 La primera secuencia de reconocimiento está dentro de una secuencia de codificación F8A1. La secuencia codificadora F8A1 tiene al menos un 95 %, o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. En una de estas realizaciones, la secuencia codificadora F8A1 puede comprender la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

- 30 En otra realización, la nucleasa diseñada puede tener especificidad para una segunda secuencia de reconocimiento que es idéntica a la primera secuencia de reconocimiento, o tiene un alto grado de homología con ella, en la que la segunda secuencia de reconocimiento se sitúa en una secuencia repetida telomérica al gen del Factor VIII en el cromosoma X. En dicha realización, la secuencia repetida es idéntica o tiene un alto grado de homología con la secuencia int22h-1, excepto que la secuencia repetida está en orientación inversa con respecto a la secuencia int22h-1.

En otra realización, el ácido nucleico que codifica la nucleasa de ingeniería puede ser un ARNm.

- 35 En otra realización, la composición farmacéutica comprende un constructo de ADN recombinante que comprende el ácido nucleico. En una de estas formas de realización, el constructo de ADN recombinante puede ser autoescindible.

En otra realización, la composición farmacéutica comprende un vector viral que comprende el ácido nucleico. En una de estas realizaciones, el vector viral puede ser un retrovirus, un lentivirus, un adenovirus o un AAV. En una realización particular, el vector viral puede ser un vector AAV recombinante.

- 40 La nucleasa de ingeniería es una meganucleasa de ingeniería, una TALEN, una nucleasa de dedos de zinc, una TALEN compacta, una CRISPR o una megaTAL. En una realización particular, la nucleasa de ingeniería puede ser una meganucleasa de ingeniería.

- 45 En otra realización, en la que la nucleasa de ingeniería es una meganucleasa de ingeniería, la primera secuencia de reconocimiento puede comprender SEQ ID NO: 7. En una de estas formas de realización, la composición farmacéutica puede comprender una meganucleasa de ingeniería de la divulgación (o un ácido nucleico que codifica la misma) que reconoce y escinde la SEQ ID NO: 7. En una realización particular, la meganucleasa de ingeniería puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 19-21.

- 50 En otra realización, en la que la nucleasa de ingeniería es una meganucleasa de ingeniería, la primera secuencia de reconocimiento puede comprender SEQ ID NO: 9. En una de estas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender una meganucleasa de ingeniería de la divulgación (o un ácido nucleico que codifica la misma) que reconoce y escinde la SEQ ID NO: 9. En una realización particular, la meganucleasa de ingeniería puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 28-31.

Además, se divulga un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene hemofilia A. En dicho procedimiento, la hemofilia A se caracteriza por una inversión de los exones 1-22 de un gen del Factor VIII. El procedimiento comprende el suministro a una célula diana en el sujeto: (a) un ácido nucleico que codifica una nucleasa de ingeniería, en la que la nucleasa de ingeniería se expresa en la célula diana in vivo; o (b) una proteína nucleasa de ingeniería; en la que la nucleasa de ingeniería es cualquier nucleasa de ingeniería de la divulgación que tiene especificidad para una primera secuencia de reconocimiento posicionada dentro de una secuencia int22h-1 del gen del Factor VIII en la célula diana.

El procedimiento puede comprender la administración al sujeto de una composición farmacéutica de la invención descrita anteriormente, que comprende (a) un ácido nucleico que codifica una nucleasa de ingeniería de la divulgación, en la que la nucleasa de ingeniería se expresa en una célula diana in vivo; o (b) una proteína de nucleasa de ingeniería de la divulgación.

La nucleasa modificada, o el ácido nucleico que codifica la nucleasa modificada, puede administrarse a una célula diana que sea capaz de expresar el Factor VIII de tipo natural, o a una célula progenitora que se diferencie en una célula que sea capaz de expresar el Factor VIII de tipo natural. La célula diana puede ser una célula hepática. La célula hepática puede ser una célula endotelial sinusoidal hepática. La célula hepática puede ser una célula progenitora, como una célula madre hepática, que se diferencia en una célula endotelial sinusoidal hepática. La célula diana puede ser una célula endotelial hematopoyética. La célula diana puede ser una célula progenitora que se diferencia en una célula endotelial hematopoyética. Se entiende que las células diana comprenden un gen del Factor VIII que tiene una inversión de los exones 1-22.

La nucleasa diseñada puede reconocer y escindir la primera secuencia de reconocimiento para promover la recombinación entre la secuencia int22h-1 y la secuencia de repetición, dando como resultado la reversión de los exones 1-22 para generar un gen de Factor VIII de tipo salvaje.

La nucleasa diseñada puede reconocer y escindir la segunda secuencia de reconocimiento en la secuencia repetida.

La nucleasa de ingeniería puede ser una meganucleasa de ingeniería, una TALEN, una nucleasa de dedos de zinc, una TALEN compacta, una CRISPR o una megaTAL. En particular, la nucleasa de ingeniería puede ser una meganucleasa de ingeniería.

Cuando la nucleasa de ingeniería es una meganucleasa de ingeniería, la primera secuencia de reconocimiento puede comprender SEQ ID NO: 7. La meganucleasa de ingeniería puede ser cualquier meganucleasa de ingeniería de la divulgación que reconoce y escinde la SEQ ID NO: 7. La meganucleasa de ingeniería puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 19-21.

Cuando la nucleasa de ingeniería es una meganucleasa de ingeniería, la primera secuencia de reconocimiento puede comprender SEQ ID NO: 9. La meganucleasa de ingeniería puede ser cualquier meganucleasa de ingeniería de la divulgación que reconoce y escinde la SEQ ID NO: 9. La meganucleasa de ingeniería puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 28-31.

El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto puede ser un humano. El sujeto puede ser un canino.

Además, se divulga un procedimiento para producir una célula modificada genéticamente que comprende un gen de Factor VIII de tipo salvaje. El procedimiento comprende: (a) obtener una célula que comprenda un gen del Factor VIII que tenga una inversión de los exones 1-22; y (b) introducir en la célula: (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa de ingeniería, en la que la nucleasa de ingeniería se expresa en la célula; o (ii) una proteína nucleasa de ingeniería; en la que la nucleasa de ingeniería tiene especificidad para una primera secuencia de reconocimiento dentro de una secuencia int22h-1 del gen del Factor VIII; y en la que la nucleasa de ingeniería reconoce y escinde la primera secuencia de reconocimiento dentro de la secuencia int22h-1 para promover la recombinación entre la secuencia int22h-1 y una secuencia repetida situada teloméricamente al gen del Factor VIII; y en el que la secuencia repetida es idéntica a la secuencia int22h-1, o tiene un alto grado de homología con ella, excepto que la secuencia repetida está en orientación inversa con respecto a la secuencia int22h-1; y en el que la recombinación causa la reversión de los exones 1-22 y la generación de la célula modificada genéticamente que comprende un gen del Factor VIII de tipo salvaje.

La célula puede ser una célula eucariota. La célula eucariota puede ser una célula pluripotente. La célula pluripotente puede ser una célula madre pluripotente inducida (iPS). La célula iPS puede ser una célula iPS humana o una célula iPS canina.

La secuencia int22h-1 tiene al menos un 95 %, o más, de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. La secuencia int22h-1 puede comprender la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

La primera secuencia de reconocimiento está dentro de una secuencia codificadora F8A1 del gen del Factor VIII. La secuencia codificadora F8A1 tiene al menos un 95 %, o más, de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. La secuencia codificadora de F8A1 puede comprender la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

- La nucleasa de ingeniería puede tener especificidad para una segunda secuencia de reconocimiento que es idéntica a la primera secuencia de reconocimiento o tiene un alto grado de homología con ella, en la que la segunda secuencia de reconocimiento se sitúa en una secuencia repetida telomérica al gen del Factor VIII en el cromosoma X. La secuencia repetida puede ser idéntica o tener un alto grado de homología con la secuencia int22h-1, excepto que la secuencia repetida está en orientación inversa con respecto a la secuencia int22h-1.
- El ácido nucleico puede ser un ARNm.
- El ácido nucleico puede introducirse en la célula utilizando un constructo de ADN recombinante. El constructo de ADN recombinante puede ser autolimitado.
- El ácido nucleico puede introducirse en la célula utilizando un vector viral. El vector viral puede ser un retrovirus, un lentivirus, un adenovirus o un AAV. El vector viral puede ser un vector AAV recombinante.
- La nucleasa de ingeniería puede ser una meganucleasa de ingeniería, una TALEN, una nucleasa de dedos de zinc, una TALEN compacta, una CRISPR o una megaTAL. En particular, la nucleasa de ingeniería puede ser una meganucleasa de ingeniería.
- La nucleasa de ingeniería puede ser cualquier meganucleasa de ingeniería de la divulgación que reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 7. La meganucleasa de ingeniería puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 19-21.
- La nucleasa de ingeniería puede ser cualquier meganucleasa de ingeniería de la divulgación que reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento que comprende la SEQ ID NO: 9. La meganucleasa de ingeniería puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 28-31.
- Además, se divulga una célula genéticamente modificada, en la que la célula genéticamente modificada comprende un gen del Factor VIII de tipo salvaje y se produce según los procedimientos de la invención descritos en el presente documento, que producen una célula genéticamente modificada a partir de una célula que comprende un gen del Factor VIII que tiene una inversión de los exones 1-22.
- Se divulga además una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto con hemofilia A. La hemofilia A se caracteriza por una inversión de los exones 1-22 en un gen del Factor VIII. La composición farmacéutica puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable y cualquier célula genéticamente modificada de la divulgación, y/o cualquier célula genéticamente modificada producida según la divulgación de la invención, que comprenda un gen de Factor VIII de tipo salvaje.
- Además, se divulga un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene hemofilia A. En dicho procedimiento, la hemofilia A se caracteriza por una inversión de los exones 1-22 del gen del Factor VIII. El procedimiento comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica de la divulgación que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y cualquier célula genéticamente modificada de la divulgación. Dicha célula modificada genéticamente comprende un gen del Factor VIII de tipo salvaje tras su modificación.
- La célula modificada genéticamente puede ser suministrada a un tejido diana. El tejido diana puede ser el hígado. El tejido diana puede ser el sistema circulatorio.
- La célula modificada genéticamente puede ser una célula iPS modificada genéticamente. La célula iPS modificada genéticamente puede diferenciarse en una célula que exprese el Factor VIII cuando se le suministra al tejido diana. La célula iPS modificada genéticamente puede diferenciarse en una célula endotelial sinusoidal hepática que expresa el Factor VIII. La célula iPS modificada genéticamente puede diferenciarse en una célula hematopoyética, como una célula endotelial hematopoyética, que exprese el Factor VIII.
- El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto puede ser un humano. El sujeto puede ser un canino.
- Además, se divulga una nucleasa de ingeniería, y particularmente una meganucleasa de ingeniería, descrita en el presente documento para su uso como medicamento.
- Además, se divulga un polinucleótido aislado para su uso como medicamento, en el que el polinucleótido aislado comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa de ingeniería, y particularmente una meganucleasa de ingeniería, de la divulgación.
- Se divulga además un vector AAV recombinante para su uso como medicamento, en el que el vector AAV recombinante comprende un polinucleótido aislado, y en el que el polinucleótido aislado comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa de ingeniería, y particularmente una meganucleasa de ingeniería, de la divulgación.
- Además, se divulga una célula modificada genéticamente para su uso como medicamento, en la que la célula modificada genéticamente ha sido modificada para comprender un gen de Factor VIII de tipo salvaje.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1A y Fig. 1B. Inversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII. Las secuencias de repetición int22h-2 e int22h-3 se sitúan teloméricamente a la secuencia int22h-1 en el cromosoma X. Además, int22h-2 e int22h-3 se encuentran en una orientación inversa entre sí como parte de un palíndromo imperfecto. La recombinación de secuencias dentro de este palíndromo permite que int22h-2 e int22h-3 intercambien lugares en el genoma y, en consecuencia, cambien su orientación respecto a int22h-1. Como resultado, la secuencia int22h-1 puede, en diferentes circunstancias, recombinarse con la repetición int22h-2 o la repetición int22h-3, dependiendo de cuál esté en la orientación opuesta a la int22h-1. La Fig. 1A muestra una configuración en la que int22h-3 está en una orientación inversa a la de int22h-1, lo que permite que se produzca una recombinación intracromosómica entre estas secuencias repetidas, dando lugar a la inversión ilustrada de los exones 1-22. La Fig. 1B muestra una configuración en la que int22h-2 está en una orientación inversa a la de int22h-1, lo que permite que se produzca una recombinación intracromosómica entre estas secuencias repetidas, dando lugar a la inversión ilustrada de los exones 1-22.

Fig. 2. Secuencias de reconocimiento F8R en el gen del Factor VIII. A) Cada secuencia de reconocimiento a la que se dirige una meganucleasa recombinante de la invención comprende dos semisitios de reconocimiento. Cada semisito de reconocimiento comprende 9 pares de bases, separados por una secuencia central de 4 pares de bases. La secuencia de reconocimiento F8R 1-2 (SEQ ID NO: 7) comprende dos semisitios de reconocimiento denominados F8R1 y F8R2. La secuencia de reconocimiento F8R 3-4 (SEQ ID NO: 9) comprende dos semisitios de reconocimiento denominados F8R3 y F8R4. La secuencia de reconocimiento F8R 9-10 (SEQ ID NO: 11) comprende dos semisitios de reconocimiento denominados F8R9 y F8R10. La secuencia de reconocimiento F8R 11-12 (SEQ ID NO: 13) comprende dos semisitios de reconocimiento denominados F8R11 y F8R12. La secuencia de reconocimiento F8R 13-14 (SEQ ID NO: 15) comprende dos semisitios de reconocimiento denominados F8R13 y F8R14. La secuencia de reconocimiento F8R 15-16 (SEQ ID NO: 17) comprende dos semisitios de reconocimiento denominados F8R15 y F8R16.

Fig. 3. Las meganucleasas recombinantes de la invención comprenden dos subunidades, en las que la primera subunidad que comprende la región HVR1 se une a un primer semisito de reconocimiento (por ejemplo, F8R1, F8R3, F8R9, F8R11, F8R13 o F8R15) y la segunda subunidad que comprende la región HVR2 se une a un segundo semisito de reconocimiento (por ejemplo, F8R2, F8R4, F8R10, F8R12, F8R14 o F8R16). En las realizaciones en las que la meganucleasa recombinante es una meganucleasa de cadena única, la primera subunidad que comprende la región HVR1 puede colocarse como subunidad N-terminal o C-terminal. Asimismo, la segunda subunidad que comprende la región HVR2 puede situarse como subunidad N-terminal o C-terminal.

Fig. 4. Esquema del ensayo reportero en células CHO para evaluar meganucleasas recombinantes dirigidas a secuencias de reconocimiento que se encuentran en el intrón 22 del gen del Factor VIII. Para las meganucleasas recombinantes aquí descritas, se produjo una línea celular CHO en la que se integró de forma estable un casete informador en el genoma de la célula. El casete informador comprendía, en orden de 5' a 3': un promotor temprano de SV40; los 5' 2/3 del gen GFP; la secuencia de reconocimiento para una meganucleasa de ingeniería de la invención (por ejemplo, la secuencia de reconocimiento F8R 1-2); la secuencia de reconocimiento para la meganucleasa CHO-23/24 (WO/2012/167192); y el 3' 2/3 del gen GFP. Las células transfectadas de forma estable con este casete no expresaron GFP en ausencia de un agente inductor de la rotura del ADN. Las meganucleasas se introdujeron por transducción de ADN plasmídico o ARNm que codifica cada meganucleasa. Cuando se indujo una rotura de ADN en cualquiera de las secuencias de reconocimiento de la meganucleasa, las regiones duplicadas del gen GFP se recombinaron entre sí para producir un gen GFP funcional. El porcentaje de células que expresan GFP podría entonces determinarse mediante citometría de flujo como una medida indirecta de la frecuencia de escisión del genoma por las meganucleasas.

Figs. 5A-5G. Eficiencia de las meganucleasas recombinantes para reconocer y escindir secuencias de reconocimiento en la secuencia int22h-1 del gen del Factor VIII en un ensayo reportero de células CHO. Las meganucleasas recombinantes expuestas en las SEQ ID NOS: 19-21, 28-31, 40-43, 52-55, 64-67 y 76-79 fueron diseñados para dirigirse a la secuencia de reconocimiento F8R 1-2 (SEQ ID NO: 7), la secuencia de reconocimiento F8R 3-4 (SEQ ID NO: 9), la secuencia de reconocimiento F8R 9-10 (SEQ ID NO: 11), la secuencia de reconocimiento F8R 11-12 (SEQ ID NO: 13), la secuencia de reconocimiento F8R 13-14 (SEQ ID NO: 15), o la secuencia de reconocimiento F8R 15-16 (SEQ ID NO: 17), y se comprobó su eficacia en el ensayo reportero de células CHO. Los resultados mostrados proporcionan el porcentaje de células que expresan GFP observadas en cada ensayo, lo que indica la eficacia de cada meganucleasa para escindir una secuencia de reconocimiento de la diana o la secuencia de reconocimiento CHO-23/24. Además, se incluyó un control negativo (bs) en cada ensayo. La Fig. 5A. muestra las meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 1-2. La Fig. 5B y la Fig. 5C muestran meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 3-4. La Fig. 5D muestra las meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 9-10. La Fig. 5E muestra las meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 11-12. La Fig. 5F muestra las meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 13-14. La Fig. 5G muestra las meganucleasas dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 15-16.

Figs. 6A-6F. Eficiencia de las meganucleasas de ingeniería para reconocer y escindir secuencias de reconocimiento en la secuencia int22h-1 del gen del Factor VIII en un ensayo de reportero de células CHO. Las meganucleasas de ingeniería abarcadas por la invención fueron de ingeniería para dirigirse al F8R 1-2 (SEQ ID NO: 7), F8R 3-4 (SEQ ID NO: 9), F8R 9-10 (SEQ ID NO: 11), F8R 11-12 (SEQ ID NO: 13), F8R 13-14 (SEQ ID NO: 15), o F8R 15-16 (SEQ ID NO: 17), y se comprobó su eficacia en el ensayo de reportero de células CHO en múltiples puntos temporales durante 12 días después de la nucleofección. Los resultados mostrados proporcionan el porcentaje de células que expresan GFP observadas en cada ensayo durante el periodo de análisis de 12 días, lo que indica la eficacia de cada meganucleasa para escindir una secuencia de reconocimiento de la diana o la secuencia de reconocimiento de CHO-23/24 en función del tiempo. La Fig. 6A muestra las meganucleasas F8R 1-2 dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 1-2. La Fig. 6B muestra las meganucleasas F8R 3-4 dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 3-4. La Fig. 6C muestra las meganucleasas F8R 9-10 dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 9-10. La Fig. 6D muestra las meganucleasas F8R 11-12 dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 11-12. La Fig. 6E muestra las meganucleasas F8R 13-14 dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 13-14. La Fig. 6F muestra las meganucleasas F8R 15-16 dirigidas a la secuencia de reconocimiento F8R 15-16.

Fig. 7. Escisión de secuencias de reconocimiento F8R en células de mamíferos. Se comprobó la capacidad de las meganucleasas F8R 1-2 y F8R 3-4 para cortar y provocar inserciones y/o deleciones (indels) en sus sitios de reconocimiento mediante el ensayo de la endonucleasa T7 en células HEK 293.

Fig. 8A y Fig. 8B. Inversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII de los mamíferos. Este experimento determinó si la escisión del ADN genómico por las meganucleasas F8R 1-2 y F8R 3-4 podía estimular una inversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII de las células HEK 293. El ADN genómico se analizó por PCR utilizando un conjunto de cebadores que podían detectar la posición normal de los exones 1-22 (H1R/H1F) o una inversión de los exones 1-22 (H1F/H2/3R).

Fig. 9. Inversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII de células de mamíferos. Este experimento determinó si la escisión del ADN genómico por las meganucleasas F8R 9-10, F8R 11-12, F8R 13-14 y F8R 15-16 podía estimular una inversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII de las células HEK 293. El ADN genómico se analizó por PCR utilizando un conjunto de cebadores que podían detectar la posición normal de los exones 1-22 (H1R/H1F) o una inversión de los exones 1-22 (H1F/H2/3R). Se proporciona el análisis de la PCR del día 2 y del día 8 para cada conjunto de cebadores.

Fig. 10. Inversión del gen del Factor VIII por nucleasas F8R en células 293 y determinación de la eficiencia por PCR digital inversa. Se transfectaron células HEK293 con ARNm que codificaba las nucleasas F8R11-12x.69 o F8R13-14x.13, respectivamente. A los 2 días post-transfección, se aisló el ADN genómico de las células y se realizó una PCR digital inversa para determinar la edición del genoma del Factor VIII.

Fig. 11. Inversión del gen del Factor VIII por nucleasas F8R en células T humanas primarias y determinación de la edición por PCR de larga distancia. Se transfectaron células T humanas normales con ARNm que codificaba la nucleasa F8R3-4x.43. A los 3 días post-transfección, se aisló el ADN genómico de las células y se realizó una PCR de larga distancia para determinar la edición del genoma del Factor VIII.

Figs. 12A-12B. Reversión del gen del Factor VIII por nucleasas F8R en células T humanas primarias de pacientes y determinación de la edición por PCR de larga distancia. Las células T de pacientes con hemofilia A se transfectaron con ARNm que codificaba las nucleasas F8R3-4x.43, F8R11-12x.69 o F8R15-16x.14, respectivamente. A los 3 días post-transfección, se aisló el ADN genómico de las células y se realizó una PCR de larga distancia para determinar la edición del genoma del Factor VIII. La Fig. 12A muestra las bandas de PCR correspondientes a una configuración del gen del Factor VIII de tipo salvaje, detectadas mediante los cebadores H1U y H1D. La Fig. 12B muestra las bandas de PCR correspondientes a la inversión del gen del Factor VIII asociado a la hemofilia A, detectadas con los cebadores H3D y H1D.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa I-Crel de tipo salvaje de *Chlamydomonas reinhardtii*.

SEQ ID NO: 2 establece la secuencia de aminoácidos del motivo LAGLIDADG.

SEQ ID NO: 3 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia humana int22h-1.

SEQ ID NO: 4 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia int22h-1 canina.

SEQ ID NO: 5 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia F8A1 humana.

SEQ ID NO: 6 establece la secuencia de ácido nucleico de una secuencia F8A1 canina.

SEQ ID NO: 7 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 1-2 (en sentido).

SEQ ID NO: 8 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 1-2 (antisentido).

SEQ ID NO: 9 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 3-4 (en sentido).

SEQ ID NO: 10 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 3-4 (antisentido).
 SEQ ID NO: 11 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 9-10 (en sentido).
 5 SEQ ID NO: 12 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 9-10 (antisentido).
 SEQ ID NO: 13 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 11-12 (en sentido).
 10 SEQ ID NO: 14 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 11-12 (antisentido).
 SEQ ID NO: 15 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 13-14 (en sentido).
 SEQ ID NO: 16 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 13-14 (antisentido).
 15 SEQ ID NO: 17 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 15-16 (en sentido).
 SEQ ID NO: 18 establece la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de reconocimiento F8R 15-16 (antisentido).
 20 SEQ ID NO: 19 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 1-2x.27.
 SEQ ID NO: 20 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 1-2x.15.
 SEQ ID NO: 21 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 1-2x.9.
 SEQ ID NO: 22 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R1 de la meganucleasa F8R 1-2x.27..
 25 SEQ ID NO: 23 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R1 de la meganucleasa F8R 1-2x.15.
 SEQ ID NO: 24 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R1 de la meganucleasa F8R 1-2x.9.
 SEQ ID NO: 25 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R2 de la meganucleasa F8R 1-2x.27.
 30 SEQ ID NO: 26 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R2 de la meganucleasa F8R 1-2x.15.
 SEQ ID NO: 27 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R2 de la meganucleasa F8R 1-2x.9.
 35 SEQ ID NO: 28 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 3-4x.43.
 SEQ ID NO: 29 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 3-4x.70.
 SEQ ID NO: 30 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 3-4x.4.
 SEQ ID NO: 31 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 3-4L.5.
 SEQ ID NO: 32 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R3 de la meganucleasa F8R 3-4x.43.
 40 SEQ ID NO: 33 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R3 de la meganucleasa F8R 3-4x.70.
 SEQ ID NO: 34 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R3 de F8R 3-4x.4 meganucleasa.
 45 SEQ ID NO: 35 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R3 de la meganucleasa F8R 3-4L.5.
 SEQ ID NO: 36 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R4 de la meganucleasa F8R 3-4x.43.
 SEQ ID NO: 37 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R4 de la meganucleasa F8R 3-4x.70.
 50 SEQ ID NO: 38 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R4 de la meganucleasa F8R 3-4x.4.
 SEQ ID NO: 39 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R4 de la meganucleasa F8R 3-4L.5.
 55 SEQ ID NO: 40 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 9-10x.70.
 SEQ ID NO: 41 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 9-10x.38.
 SEQ ID NO: 42 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 9-10x.2.
 SEQ ID NO: 43 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 9-10x.8.
 SEQ ID NO: 44 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R9 de la meganucleasa F8R 9-10x.70.
 60 SEQ ID NO: 45 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R9 de la meganucleasa F8R 9-10x.38.
 SEQ ID NO: 46 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R9 de la meganucleasa F8R 9-10x.2.
 65 SEQ ID NO: 47 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R9 de la meganucleasa F8R 9-10x.8.

	SEQ ID NO: 48 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R10 de la meganucleasa F8R 9-10x.70.
	SEQ ID NO: 49 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R10 de la meganucleasa F8R 9-10x.38.
5	SEQ ID NO: 50 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R10 de la meganucleasa F8R 9-10x.2.
	SEQ ID NO: 51 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R10 de la meganucleasa F8R 9-10x.8.
10	SEQ ID NO: 52 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 11-12x.56.
	SEQ ID NO: 53 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 11-12x.69.
	SEQ ID NO: 54 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 11-12x.66.
	SEQ ID NO: 55 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 11-12x.41.
	SEQ ID NO: 56 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R11 de la meganucleasa F8R 11-12x.56.
15	SEQ ID NO: 57 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R11 de la meganucleasa F8R 11-12x.69.
	SEQ ID NO: 58 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R11 de la meganucleasa F8R 11-12x.66.
20	SEQ ID NO: 59 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R11 de la meganucleasa F8R 11-12x.41.
	SEQ ID NO: 60 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R12 de la meganucleasa F8R 11-12x.56.
	SEQ ID NO: 61 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R12 de la meganucleasa F8R 11-12x.69.
25	SEQ ID NO: 62 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R12 de la meganucleasa F8R 11-12x.66.
	SEQ ID NO: 63 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R12 de la meganucleasa F8R 11-12x.41.
30	SEQ ID NO: 64 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 13-14x.13
	SEQ ID NO: 65 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 13-14x.3.
	SEQ ID NO: 66 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 13-14x.1.
	SEQ ID NO: 67 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 13-14x.11
	SEQ ID NO: 68 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R13 de la meganucleasa F8R 13-14x.13.
35	SEQ ID NO: 69 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R13 de la meganucleasa F8R 13-14x.3.
	SEQ ID NO: 70 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R13 de la meganucleasa F8R 13-14x.1.
40	SEQ ID NO: 71 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R13 de la meganucleasa F8R 13-14x.11.
	SEQ ID NO: 72 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R14 de la meganucleasa F8R 13-14x.13.
	SEQ ID NO: 73 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R14 de la meganucleasa F8R 13-14x.3.
45	SEQ ID NO: 74 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R14 de la meganucleasa F8R 13-14x.1.
	SEQ ID NO: 75 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R14 de la meganucleasa F8R 13-14x.11.
50	SEQ ID NO: 76 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 15-16x.14.
	SEQ ID NO: 77 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 15-16x.85.
	SEQ ID NO: 78 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 15-16x.4.
	SEQ ID NO: 79 establece la secuencia de aminoácidos de la meganucleasa F8R 15-16x.79.
	SEQ ID NO: 80 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R15 de la meganucleasa F8R 15-16x.14.
55	SEQ ID NO: 81 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R15 de la meganucleasa F8R 15-16x.85.
	SEQ ID NO: 82 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R15 de la meganucleasa F8R 15-16x.4.
60	SEQ ID NO: 83 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R15 de la meganucleasa F8R 15-16x.79.
	SEQ ID NO: 84 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R16 de la meganucleasa F8R 15-16x.14.
	SEQ ID NO: 85 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R16 de la meganucleasa F8R 15-16x.85.
65	SEQ ID NO: 86 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R16 de la meganucleasa F8R 15-16x.4.

SEQ ID NO: 87 establece la secuencia de aminoácidos del monómero de unión a F8R16 de la meganucleasa F8R 15-16x.79.

SEQ ID NO: 88 establece la secuencia de ácido nucleico del cebador U1.

SEQ ID NO: 89 establece la secuencia de ácido nucleico del cebador D1.

SEQ ID NO: 90 establece la secuencia de ácido nucleico del cebador U3.

SEQ ID NO: 91 establece la secuencia de ácido nucleico del cebador FWD1.

SEQ ID NO: 92 establece la secuencia de ácido nucleico del cebador REV1.

SEQ ID NO: 93 establece la secuencia de ácido nucleico del cebador FWD3.

SEQ ID NO: 94 establece la secuencia de ácido nucleico del cebador H1U.

SEQ ID NO: 95 establece la secuencia de ácido nucleico del cebador H1D.

SEQ ID NO: 96 establece la secuencia de ácido nucleico del cebador H3D.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1.1 Referencias y definiciones

La presente invención puede plasmarse en diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones aquí expuestas. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación sea exhaustiva y completa.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención en este documento es con el fin de describir formas de realización particulares solamente y no pretende ser limitante de la invención.

Tal y como se utiliza aquí, "un", "uno, una" o "el, la" puede significar uno o más de uno. Por ejemplo, "una" célula puede significar una sola célula o una multiplicidad de células.

Tal como se utiliza aquí, a menos que se indique específicamente lo contrario, la palabra "o" se utiliza en el sentido inclusivo de "y/o" y no en el sentido exclusivo de "o".

Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos "nucleasa" y "endonucleasa" se utilizan indistintamente para referirse a las enzimas naturales o de ingeniería que escinden un enlace fosfodiéster dentro de una cadena de polinucleótidos.

Tal y como se utiliza en este documento, el término "meganucleasa" se refiere a una endonucleasa que se une al ADN de doble cadena en una secuencia de reconocimiento que es superior a 12 pares de bases. Preferentemente, la secuencia de reconocimiento para una meganucleasa de la invención es de 22 pares de bases. Una meganucleasa puede ser una endonucleasa derivada de la I-Crel, y puede referirse a una variante de ingeniería de la I-Crel que ha sido modificada en relación con la I-Crel natural con respecto a, por ejemplo, la especificidad de unión al ADN, la actividad de escisión del ADN, la afinidad de unión al ADN o las propiedades de dimerización. Los procedimientos para producir tales variantes modificadas de I-Crel son conocidos en la técnica (por ejemplo WO 2007/047859). Una meganucleasa, tal como se utiliza aquí, se une al ADN de doble cadena como un heterodímero. Una meganucleasa también puede ser una "meganucleasa de cadena única" en la que un par de dominios de unión al ADN se unen en un solo polipéptido utilizando un enlazador peptídico. El término "endonucleasa de anidamiento" es sinónimo del término "meganucleasa". Las meganucleasas de la invención son sustancialmente no tóxicas cuando se expresan en células sin que se observen efectos deletéreos en la viabilidad celular o reducciones significativas en la actividad de escisión de las meganucleasas cuando se miden utilizando los procedimientos descritos en el presente documento.

Tal como se utiliza aquí, el término "meganucleasa de cadena única" se refiere a un polipéptido que comprende un par de subunidades de nucleasa unidas por un enlazador. Una meganucleasa de cadena única tiene la organización: Subunidad N-terminal - Enlazador - Subunidad C-terminal. Las dos subunidades de la meganucleasa serán generalmente no idénticas en la secuencia de aminoácidos y reconocerán secuencias de ADN no idénticas. Así, las meganucleasas de cadena única suelen escindir secuencias de reconocimiento pseudopalindrómicas o no palindrómicas. Una meganucleasa de cadena única puede denominarse "heterodímero de cadena única" o "meganucleasa heterodimérica de cadena única", aunque no sea, de hecho, dimérica. Para mayor claridad, a menos que se especifique lo contrario, el término "meganucleasa" puede referirse a una meganucleasa dimérica o de cadena única.

Tal como se utiliza aquí, el término "enlazador" se refiere a una secuencia peptídica exógena utilizada para unir dos subunidades de meganucleasas en un solo polipéptido. Un enlazador puede tener una secuencia que se encuentra en las proteínas naturales, o puede ser una secuencia artificial que no se encuentra en ninguna proteína natural. Un enlazador puede ser flexible y carecer de estructura secundaria o puede tener una propensión a formar una estructura tridimensional específica en condiciones fisiológicas. Un enlazador puede incluir, sin limitación, los comprendidos en la Patente de EE.UU. n.º 8.445.251. En algunas realizaciones, un enlazador puede tener una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 154-195 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-21, 28-31, 40-43, 52-55, 64-67, o 76-79.

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

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "TALEN compacto" se refiere a una endonucleasa que comprende un dominio de unión al ADN con 16-22 repeticiones del dominio TAL fusionadas en cualquier orientación a cualquier porción de la endonucleasa de anidamiento I-TevI.

- 10 Tal como se utiliza aquí, el término "nucleasa de dedos de zinc" o "ZFN" se refiere a una endonucleasa quimérica que comprende un dominio de unión al ADN de dedos de zinc fusionado con el dominio nucleasa de la enzima de restricción FokI. El dominio del dedo de zinc puede ser rediseñado por medios racionales o experimentales para producir una proteína que se una a una secuencia de ADN predeterminada ~18 pares de bases de longitud, que comprende un par de semisitos de nueve pares de bases separados por 2-10 pares de bases. La escisión por parte de una nucleasa de dedo de zinc puede crear un extremo romo o una sobrecarga 5' de longitud variable (frecuentemente cuatro pares de bases).

- 15 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "CRISPR" se refiere a una endonucleasa basada en la caspasa que comprende una caspasa, como Cas9, y un ARN guía que dirige la escisión del ADN de la caspasa al hibridarse con un sitio de reconocimiento en el ADN genómico.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "megaTAL" se refiere a una endonucleasa de cadena única que comprende un dominio de unión al ADN similar al activador de la transcripción (TALE) con una endonucleasa de anidamiento específico de la secuencia de ingeniería.

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

- 30 Tal y como se utiliza aquí, el término "tipo salvaje" se refiere al alelo más común que se produce de forma natural (es decir, la secuencia de polinucleótidos) en la población de alelos del mismo tipo de gen, en el que un polipéptido codificado por el alelo de tipo salvaje tiene sus funciones originales. El término "tipo salvaje" también se refiere a un polipéptido codificado por un alelo de tipo salvaje. Los alelos (polinucleótidos) y polipéptidos de tipo salvaje se distinguen de los alelos y polipéptidos mutantes o variantes, que comprenden una o más mutaciones y/o sustituciones en relación con la(s) secuencia(s) de tipo salvaje. Mientras que un alelo o polipéptido de tipo salvaje puede conferir un fenotipo normal en un organismo, un alelo o polipéptido mutante o variante puede, en algunos casos, conferir un fenotipo alterado. Las nucleasas de tipo salvaje se distinguen de las nucleasas recombinantes o no naturales. El término "tipo salvaje" también puede referirse a una célula, un organismo y/o un sujeto que posee un alelo de tipo salvaje de un gen particular, o una célula, un organismo y/o un sujeto utilizado con fines comparativos.

- 40 Tal y como se utiliza aquí, el término "modificado genéticamente" se refiere a una célula u organismo en el que, o en un ancestro del mismo, se ha modificado deliberadamente una secuencia de ADN genómico mediante tecnología recombinante. Tal y como se utiliza aquí, el término "modificado genéticamente" engloba el término "transgénico"

- 45 Tal como se utiliza en el presente documento con respecto a las proteínas recombinantes, el término "modificación" significa cualquier inserción, supresión o sustitución de un residuo de aminoácido en la secuencia recombinante en relación con una secuencia de referencia (*por ejemplo*, una secuencia de tipo salvaje o nativa).

- 50 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia de reconocimiento" se refiere a una secuencia de ADN que es unida y escindida por una endonucleasa. En el caso de una meganucleasa, una secuencia de reconocimiento comprende un par de "semisitos" invertidos de 9 pares de bases que están separados por cuatro pares de bases. En el caso de una meganucleasa de cadena única, el dominio N-terminal de la proteína contacta con un primer semi-sitio y el dominio C-terminal de la proteína contacta con un segundo semi-sitio. La escisión por parte de una meganucleasa produce cuatro "colgantes" 3' de pares de bases. Los "colgantes" o "extremos pegajosos" son segmentos cortos de ADN de una sola hebra que pueden producirse por la escisión de una endonucleasa de una secuencia de ADN de doble hebra. En el caso de las meganucleasas y las meganucleasas de cadena única derivadas de I-Crel, el colgante comprende las bases 10-13 de la secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases. En el caso de un TALEN compacto, la secuencia de reconocimiento comprende una primera secuencia CNNNGN que es reconocida por el dominio I-TevI, seguida de un espaciador inespecífico de 4-16 pares de bases de longitud, seguido de una segunda secuencia de 16-22 pb de longitud que es reconocida por el dominio del efector TAL (esta secuencia suele tener una base 5' T). La escisión por un TALEN compacto produce dos sobrantes de pares de bases 3'. En el

caso de un CRISPR, la secuencia de reconocimiento es la secuencia, normalmente de 16 a 24 pares de bases, a la que se une el ARN guía para dirigir la escisión de Cas9. La escisión mediante CRISPR produjo extremos romos. En el caso de un dedo de zinc, los dominios de unión al ADN suelen reconocer una secuencia de reconocimiento de 18 pb que comprende un par de "semisitos" de nueve pares de bases separados por 2-10 pares de bases, y la escisión por parte de la nucleasa crea un extremo romo o un colgante 5' de longitud variable (frecuentemente cuatro pares de bases).

Tal como se utiliza aquí, el término "sitio diana" o "secuencia diana" se refiere a una región del ADN cromosómico de una célula que comprende una secuencia de reconocimiento para una nucleasa.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "afinidad de unión al ADN" o "afinidad de unión" significa la tendencia de una meganucleasa a asociarse de forma no covalente con una molécula de ADN de referencia (*por ejemplo*, una secuencia de reconocimiento o una secuencia arbitraria). La afinidad de unión se mide por una constante de disociación, K_d . Tal como se utiliza en el presente documento, una nucleasa tiene una afinidad de unión "alterada" si la K_d de la nucleasa para una secuencia de reconocimiento de referencia aumenta o disminuye en una cantidad estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en relación con una nucleasa de referencia.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "especificidad" significa la capacidad de una meganucleasa para reconocer y escindir moléculas de ADN de doble cadena sólo en una secuencia particular de pares de bases denominada secuencia de reconocimiento, o sólo en un conjunto particular de secuencias de reconocimiento. El conjunto de secuencias de reconocimiento compartirá ciertas posiciones conservadas o motivos de secuencia, pero puede ser degenerado en una o más posiciones. Una meganucleasa altamente específica es capaz de escindir sólo una o muy pocas secuencias de reconocimiento. La especificidad puede determinarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Tal como se utiliza en el presente documento, una meganucleasa tiene una especificidad "alterada" si se une a una secuencia de reconocimiento y la escinde, que no se une a una meganucleasa de referencia (*por ejemplo*, una de tipo salvaje) ni la escinde en condiciones fisiológicas, o si la tasa de escisión de una secuencia de reconocimiento aumenta o disminuye en una cantidad biológicamente significativa (*por ejemplo*, al menos $2\times$, o $2\times-10\times$) en relación con una meganucleasa de referencia.

Tal y como se utiliza aquí, el término "recombinación homóloga" o "HR" se refiere al proceso celular natural en el que se repara una rotura de ADN de doble cadena utilizando una secuencia de ADN homóloga como plantilla de reparación (véase, *por ejemplo* Cahill et al. (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976). La secuencia de ADN homóloga puede ser una secuencia cromosómica endógena o un ácido nucleico exógeno que fue suministrado a la célula.

Tal y como se utiliza aquí, el término "unión de extremos no homólogos" o "NHEJ" se refiere al proceso celular natural en el que una rotura de ADN de doble cadena se repara mediante la unión directa de dos segmentos de ADN no homólogos (véase, *por ejemplo* Cahill et al. (2006), Front. Biosci. 11:1958-1976). La reparación del ADN mediante la unión de extremos no homólogos es propensa a los errores y con frecuencia da lugar a la adición o eliminación no prevista de secuencias de ADN en el lugar de la reparación. En algunos casos, la escisión en una secuencia de reconocimiento de la diana da lugar a NHEJ en un sitio de reconocimiento de la diana. La escisión inducida por la nucleasa de un sitio diana en la secuencia codificante de un gen, seguida de la reparación del ADN por NHEJ, puede introducir mutaciones en la secuencia codificante, como las mutaciones de desplazamiento de cuadro, que alteran la función del gen. Así, las nucleasas de ingeniería pueden utilizarse para eliminar eficazmente un gen en una población de células.

Tal como se utiliza en el presente documento con respecto a las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos, los términos "porcentaje de identidad", "identidad de secuencia", "porcentaje de similitud", "similitud de secuencia" y similares se refieren a una medida del grado de similitud de dos secuencias basada en una alineación de las secuencias que maximiza la similitud entre los residuos de aminoácidos o nucleótidos alineados, y que es una función del número de residuos o nucleótidos idénticos o similares, el número de residuos o nucleótidos totales, y la presencia y la longitud de las brechas en la alineación de la secuencia. Existen diversos algoritmos y programas informáticos para determinar la similitud de las secuencias utilizando parámetros estándar. Tal como se utiliza aquí, la similitud de la secuencia se mide utilizando el programa BLASTp para las secuencias de aminoácidos y el programa BLASTn para las secuencias de ácidos nucleicos, ambos disponibles a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/), y que se describen, *por ejemplo*, en, Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-410 Gish y States (1993), Nature Genet. 3:266-272 Madden et al. (1996), Meth. Enzymol. 266:131-141 Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:33 89-3402 Zhang et al. (2000), J. Comput. Biol. 7(1-2):203-14. Tal y como se utiliza aquí, el porcentaje de similitud de dos secuencias de aminoácidos es la puntuación basada en los siguientes parámetros del algoritmo BLASTp: tamaño de la palabra=3; penalización por apertura de brecha=-11; penalización por extensión de brecha=-1; y matriz de puntuación=BLOSUM62. Tal y como se utiliza aquí, el porcentaje de similitud de dos secuencias de ácidos nucleicos es la puntuación basada en los siguientes parámetros del algoritmo BLASTn: tamaño de la palabra=11; penalización por apertura de brechas=-5; penalización por extensión de brechas=-2; recompensa por coincidencia=1; y penalización por falta de coincidencia=-3.

Tal como se utiliza en el presente documento con respecto a las modificaciones de dos proteínas o secuencias de aminoácidos, el término "correspondiente a" se utiliza para indicar que una modificación especificada en la primera proteína es una sustitución del mismo residuo de aminoácido que en la modificación en la segunda proteína, y que la

posición de aminoácidos de la modificación en las primeras proteínas corresponde o se alinea con la posición de aminoácidos de la modificación en la segunda proteína cuando las dos proteínas se someten a alineaciones de secuencia estándar (por ejemplo, utilizando el programa BLASTp). Así, la modificación del residuo "X" en el aminoácido "A" en la primera proteína corresponderá a la modificación del residuo "Y" en el aminoácido "A" en la segunda proteína si los residuos X e Y se corresponden entre sí en un alineamiento de secuencias, y a pesar de que X e Y puedan ser números diferentes.

Tal como se utiliza aquí, el término "semisito de reconocimiento", "semisito de secuencia de reconocimiento" o simplemente "semisito" significa una secuencia de ácido nucleico en una molécula de ADN de doble cadena que es reconocida por un monómero de una meganucleasa homodimérica o heterodimérica, o por una subunidad de una meganucleasa de cadena única.

Tal como se utiliza aquí, el término "región hipervariable" se refiere a una secuencia localizada dentro de un monómero o subunidad de meganucleasa que comprende aminoácidos con una variabilidad relativamente alta. Una región hipervariable puede comprender unos 50-60 residuos contiguos, unos 53-57 residuos contiguos, o preferentemente unos 56 residuos. En algunas realizaciones, los residuos de una región hipervariable pueden corresponder a las posiciones 24-79 o a las posiciones 215-270 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-21, 28-31, 40-43, 52-55, 64-67, o 76-79. Una región hipervariable puede comprender uno o más residuos que entran en contacto con bases de ADN en una secuencia de reconocimiento y pueden ser modificados para alterar la preferencia de bases del monómero o subunidad. Una región hipervariable también puede comprender uno o más residuos que se unen a la columna vertebral del ADN cuando la meganucleasa se asocia con una secuencia de reconocimiento de ADN de doble cadena. Dichos residuos pueden modificarse para alterar la afinidad de unión de la meganucleasa con el esqueleto del ADN y la secuencia de reconocimiento de la diana. En diferentes realizaciones de la invención, una región hipervariable puede comprender entre 1-20 residuos que presentan variabilidad y pueden ser modificados para influir en la preferencia de bases y/o en la afinidad de unión al ADN. En particular, una región hipervariable comprende entre unos 15-18 residuos que presentan variabilidad y pueden ser modificados para influir en la preferencia de bases y/o en la afinidad de unión al ADN. En algunas realizaciones, los residuos variables dentro de una región hipervariable corresponden a una o más de las posiciones 24, 26, 28, 30, 32, 33, 38, 40, 42, 44, 46, 68, 70, 72, 73, 75 y 77 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-21, 28-31, 40-43, 52-55, 64-67, o 76-79. En otras realizaciones, los residuos variables dentro de una región hipervariable corresponden a una o más de las posiciones 215, 217, 219, 221, 223, 224, 229, 231, 233, 235, 237, 259, 261, 263, 264, 266 y 268 de cualquiera de las SEQ ID NO: 19-21, 28-31, 40-43, 52-55, 64-67, o 76-79.

Tal y como se utiliza aquí, los términos "gen del Factor VIII", "gen F8" y similares, se refieren a un gen localizado en el cromosoma X que codifica la proteína del Factor VIII de la coagulación. En los seres humanos, el gen del Factor VIII, identificado por el NCBI con el número de identificación del gen 2157, está situado entre el par de bases 154.835.788 y el par de bases 155.026.934 en el cromosoma X. En los caninos, el gen del Factor VIII puede ser el gen identificado por la Secuencia de Referencia del NCBI: NM_001003212.1. Se entiende que el término "gen del Factor VIII" puede incluir tanto un gen del Factor VIII de tipo salvaje como un gen del Factor VIII que comprenda polimorfismos y/o mutaciones de origen natural que permitan la producción de una proteína del Factor VIII funcional.

Tal y como se utilizan aquí, los términos "int22h-1" y "secuencia int22h-1" se refieren a una secuencia situada dentro del intrón 22 del gen del Factor VIII que tiene un tamaño de aproximadamente 9,5 kb (Bagnall et al. (2006) Journal of Thrombosis and Haemostasis 4:591-598) y puede referirse además a la secuencia humana identificada por el GenBank como número de acceso AY619999.1. La secuencia int22h-1 se caracteriza por comprender una isla CpG, una secuencia codificante para la proteína histona H2AFB1 y una secuencia codificante para la proteína asociada al factor VIII 1 (F8A1; también denominada proteína intrón 22). La secuencia int22h-1 se caracteriza además por ser idéntica a, o tener una alta homología con, al menos una secuencia repetida que se sitúa teloméricamente al gen del Factor VIII en el cromosoma X. En los seres humanos, dos secuencias repetidas, denominadas int22h-2 e int22h-3, se sitúan en posición telomérica respecto al gen del Factor VIII en el cromosoma X. En realizaciones particulares de la invención, la secuencia humana int22h-1 puede comprender la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones particulares de la invención, la secuencia int22h-1 canina puede comprender la SEQ ID NO: 4.

Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos "secuencia codificante de F8A1" y "secuencia codificante de la proteína del intrón 22" se utilizan indistintamente y se refieren a una secuencia posicionada dentro de la secuencia int22h-1 que codifica la proteína F8A1. La secuencia codificadora del F8A1 no tiene intrones y se transcribe en la dirección opuesta al gen del Factor VIII. En una realización, la secuencia codificante del F8A1 humano de tipo salvaje puede comprender la SEQ ID NO: 5. En otra realización, la secuencia codificadora del F8A1 canino de tipo salvaje puede comprender la SEQ ID NO: 6, que tiene ~75 % de homología con la secuencia codificadora del F8A1 humano. Se entiende que la referencia a una secuencia codificante de F8A1 incluye una secuencia de F8A1 de tipo salvaje y una secuencia de F8A1 que comprende polimorfismos y/o mutaciones de origen natural que permiten la producción de una proteína F8A1 funcional.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "inversión" e "inversión de los exones 1-22" se refieren a una mutación de un gen del Factor VIII en la que se produce un evento de recombinación homóloga intracromosómica entre la secuencia int22h-1 del gen del Factor VIII y una secuencia repetida idéntica o estrechamente relacionada,

orientada de forma inversa, situada teloméricamente al gen del Factor VIII en el cromosoma X, que da lugar a una inversión de los exones 1-22 con respecto a los exones 23-26.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "reversión" se refiere a un evento de recombinación homóloga intracromosómica en una célula que comprende una inversión de los exones 1-22 del gen del Factor VIII, en la que se produce una rotura de doble cadena dentro de la secuencia int22h-1 para promover la recombinación con una secuencia repetida telomérica al gen del Factor VIII en el cromosoma X. Esta recombinación da lugar a la orientación corregida de los exones 1-22 y a la producción de un gen del Factor VIII funcional de tipo salvaje.

Los términos "constructo de ADN recombinante", "constructo recombinante", "casete de expresión", "constructo de expresión", "constructo quimérico" y "fragmento de ADN recombinante" se utilizan indistintamente en el presente documento y son fragmentos de ácido nucleico. Un constructo recombinante comprende una combinación artificial de fragmentos de ácido nucleico, incluyendo, sin limitación, secuencias reguladoras y codificadoras que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por ejemplo, un constructo de ADN recombinante puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificadoras derivadas de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificadoras derivadas de la misma fuente y dispuestas de una manera diferente a la que se encuentra en la naturaleza. Este constructo puede utilizarse por sí mismo o junto con un vector.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "vector" o "vector de ADN recombinante" puede ser un constructo que incluye un sistema de replicación y secuencias que son capaces de transcribir y traducir una secuencia codificadora de polipéptidos en una célula huésped determinada. Si se utiliza un vector, la elección del mismo depende del procedimiento que se utilizará para transformar las células huésped, como es bien sabido por los expertos en la materia. Los vectores pueden incluir, sin limitación, vectores plasmídicos y vectores AAV recombinantes, o cualquier otro vector conocido en ese arte adecuado para suministrar un gen que codifica una meganucleasa de la invención a una célula diana. El artesano experto conoce bien los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector para transformar, seleccionar y propagar con éxito las células huésped que comprenden cualquiera de los nucleótidos aislados o secuencias de ácido nucleico de la invención.

Tal como se utiliza aquí, un "vector" también puede referirse a un vector viral. Los vectores virales pueden incluir, sin limitación, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales y vectores virales adenoasociados (AAV).

Tal como se utiliza aquí, un "control" o "célula de control" se refiere a una célula que proporciona un punto de referencia para medir los cambios en el genotipo o fenotipo de una célula modificada genéticamente. Una célula de control puede comprender, por ejemplo: (a) una célula de tipo salvaje, es decir, del mismo genotipo que el material de partida para la alteración genética que dio lugar a la célula genéticamente modificada; (b) una célula del mismo genotipo que la célula genéticamente modificada pero que ha sido transformada con un constructo nulo (es decir, c) una célula genéticamente idéntica a la célula modificada genéticamente pero que no ha sido expuesta a condiciones o estímulos o a modificaciones genéticas adicionales que podrían inducir la expresión de un genotipo o fenotipo alterado.

Tal como se utiliza en el presente documento, un constructo de ADN recombinante "autoescindido" se refiere a un constructo de ADN que comprende al menos una secuencia de codificación para una endonucleasa y al menos una secuencia de reconocimiento para la misma endonucleasa. Cuando se expresa en una célula (es decir, in vivo), la endonucleasa reconoce y escinde la secuencia de reconocimiento, dando lugar a la linealización del constructo de ADN.

Tal como se utiliza en el presente documento con respecto a las modificaciones de dos proteínas o secuencias de aminoácidos, el término "correspondiente a" se utiliza para indicar que una modificación especificada en la primera proteína es una sustitución del mismo residuo de aminoácido que en la modificación en la segunda proteína, y que la posición de aminoácidos de la modificación en las primeras proteínas corresponde o se alinea con la posición de aminoácidos de la modificación en la segunda proteína cuando las dos proteínas se someten a alineaciones de secuencia estándar (por ejemplo, utilizando el programa BLASTp). Así, la modificación del residuo "X" en el aminoácido "A" en la primera proteína corresponderá a la modificación del residuo "Y" en el aminoácido "A" en la segunda proteína si los residuos X e Y se corresponden entre sí en un alineamiento de secuencias, y a pesar de que X e Y puedan ser números diferentes.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "tratamiento" o "tratar a un sujeto" se refieren a la administración de una nucleasa de ingeniería de la invención, o un ácido nucleico que codifica una nucleasa de ingeniería de la invención, a un sujeto que tiene hemofilia A con el fin de corregir una inversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII en células que normalmente expresan el Factor VIII en sujetos de tipo salvaje. Dicho tratamiento tiene como resultado la corrección del gen del Factor VIII en un número de células suficiente para aumentar los niveles circulantes de Factor VIII en el sujeto, y el alivio parcial o completo de uno o más síntomas de la hemofilia A en el sujeto. Los términos "tratamiento" o "tratar a un sujeto" pueden referirse además a la administración de una célula modificada genéticamente que comprende un gen de Factor VIII de tipo salvaje a un sujeto según el procedimiento de la invención, en el que la célula modificada genéticamente se administra a un tejido diana y produce Factor VIII, o se diferencia en una célula que produce Factor VIII, en una cantidad suficiente para aumentar los niveles circulantes de Factor VIII en el sujeto, dando como resultado el alivio parcial o completo de uno o más síntomas de la hemofilia A. En algunos aspectos, una nucleasa de ingeniería de la invención, un ácido nucleico que codifica la misma, o una célula

genéticamente modificada de la invención se administra durante el tratamiento en forma de una composición farmacéutica de la invención.

Tal como se utiliza en el presente documento, la recitación de un intervalo numérico para una variable pretende transmitir que la invención puede practicarse con la variable igual a cualquiera de los valores dentro de ese intervalo. Así, para una variable que es intrínsecamente discreta, la variable puede ser igual a cualquier valor entero dentro del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. Del mismo modo, para una variable que es intrínsecamente continua, la variable puede ser igual a cualquier valor real dentro del intervalo numérico, incluyendo los puntos finales del intervalo. A modo de ejemplo, y sin limitación, una variable que se describe con valores entre 0 y 2 puede tomar los valores 0, 1 o 2 si la variable es intrínsecamente discreta, y puede tomar los valores 0,0, 0,1, 0,01, 0,001, o cualquier otro valor real $\square 0$ y $\square 2$ si la variable es intrínsecamente continua.

2.1 Principio de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se basa, en parte, en la hipótesis de que las nucleasas de ingeniería pueden utilizarse para tratar la hemofilia A mediante la corrección de una inversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII. Más específicamente, las nucleasas pueden ser de ingeniería para reconocer y escindir una secuencia de reconocimiento presente dentro de una secuencia int22h-1 del gen del Factor VIII para producir una ruptura de doble cadena. La recombinación homóloga intracromosómica puede producirse entonces entre la secuencia int22h-1 y una secuencia repetida que es telomérica al gen del Factor VIII en el cromosoma X, lo que resulta en una reversión de los exones 1-22 y la producción de un gen del Factor VIII funcional y de tipo salvaje en las células diana del sujeto.

La invención también se basa, en parte, en la hipótesis de que las células pluripotentes (*por ejemplo*, células madre pluripotentes inducidas (iPS)) que comprenden una inversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII pueden obtenerse y ponerse en contacto con una nucleasa de ingeniería de la invención (o un ácido nucleico que codifica la misma) para corregir el gen del Factor VIII por el mismo mecanismo descrito anteriormente. Dichas células pluripotentes pueden ser administradas a un sujeto con hemofilia A, donde las células son suministradas a un tejido diana (*por ejemplo*, el hígado o el sistema circulatorio) y se diferencian en células que expresan el Factor VIII de tipo salvaje en el sujeto.

Así, la presente divulgación abarca nucleasas de ingeniería, y particularmente meganucleasas recombinantes de ingeniería, que reconocen y escinden una secuencia de reconocimiento dentro de la secuencia int22h-1 de un gen del Factor VIII. La presente divulgación también abarca procedimientos de uso de tales nucleasas de ingeniería para hacer células modificadas genéticamente, y el uso de tales células en una composición farmacéutica y en procedimientos para tratar la hemofilia A. Además, la divulgación abarca composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas nucleasas de ingeniería, ácidos nucleicos que codifican nucleasas de ingeniería, o células modificadas genéticamente y el uso de tales composiciones para el tratamiento de la hemofilia A.

2.2 Nucleasas para reconocer y escindir secuencias de reconocimiento dentro de una secuencia int22h-1 del gen del factor VIII

Es conocido en la técnica que es posible utilizar una nucleasa específica de sitio para hacer una ruptura de ADN en el genoma de una célula viva, y que tal ruptura de ADN puede resultar en una modificación permanente del genoma a través de la recombinación homóloga del sitio diana escindido con una secuencia de ADN idéntica o altamente homóloga dentro del genoma.

Así, en diferentes realizaciones, una variedad de diferentes tipos de endonucleasas son útiles para practicar la invención. En una realización, la invención puede practicarse utilizando meganucleasas recombinantes de ingeniería. En otra realización, la invención puede practicarse utilizando una nucleasa CRISPR o una nicasa CRISPR. Los procedimientos para fabricar CRISPRs y nicasas CRISPR que reconocen sitios de ADN predeterminados son conocidos en la técnica, por ejemplo Ran, et al. (2013) Nat Protoc. 8:2281-308. En otra realización, la invención puede practicarse utilizando TALENs o TALENs compactos. Los procedimientos para fabricar dominios TALE que se unen a sitios predeterminados del ADN son conocidos en la técnica, por ejemplo Reyon et al. (2012) Nat Biotechnol. 30:460-5. En otra realización, la invención puede practicarse utilizando nucleasas de dedos de zinc (ZFNs). En otra realización, la invención puede practicarse utilizando megaTALs.

En realizaciones preferidas, las nucleasas utilizadas para practicar la invención son meganucleasas de cadena simple. Una meganucleasa de cadena única comprende una subunidad N-terminal y una subunidad C-terminal unidas por un péptido enlazador. Cada uno de los dos dominios reconoce la mitad de la secuencia de reconocimiento (es decir, un semi-sitio de reconocimiento) y el sitio de escisión del ADN se encuentra en el centro de la secuencia de reconocimiento, cerca de la interfaz de las dos subunidades. Las roturas de la cadena de ADN están desplazadas por cuatro pares de bases, de modo que la escisión del ADN por una meganucleasa genera un par de colgantes de una sola cadena de cuatro pares de bases.

En algunos ejemplos, las meganucleasas recombinantes de la invención han sido diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 1-2 (SEQ ID NO: 7). La secuencia de reconocimiento F8R 1-2 se sitúa dentro de

la secuencia int22h-1 y de la secuencia F8A1. Estas meganucleasas recombinantes se denominan colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 1-2" Las meganucleasas F8R 1-2 ejemplares se proporcionan en las SEQ ID NOs: 19-22.

En ejemplos adicionales, las meganucleasas recombinantes de la invención han sido diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 3-4 (SEQ ID NO: 9). La secuencia de reconocimiento F8R 3-4 se sitúa dentro de la secuencia int22h-1 y de la secuencia F8A1. Estas meganucleasas recombinantes se denominan colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 3-4" Las meganucleasas F8R 3-4 ejemplares se proporcionan en las SEQ ID NOs: 28-31.

En ejemplos adicionales, las meganucleasas recombinantes han sido diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 9-10 (SEQ ID NO: 11). Dichas meganucleasas recombinantes se denominan colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 9-10" Las meganucleasas F8R 9-10 ejemplares se proporcionan en las SEQ ID NOs: 40-43.

En ejemplos adicionales, las meganucleasas recombinantes han sido diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 11-12 (SEQ ID NO: 13). Dichas meganucleasas recombinantes se denominan colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 11-12" Las meganucleasas F8R 11-12 ejemplares se proporcionan en las SEQ ID NOs: 52-55.

En otros ejemplos, las meganucleasas recombinantes han sido diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 13-14 (SEQ ID NO: 15). Dichas meganucleasas recombinantes se denominan colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 13-14" Las meganucleasas F8R 13-14 ejemplares se proporcionan en las SEQ ID NOs: 64-67.

En ejemplos adicionales, las meganucleasas recombinantes han sido diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 15-16 (SEQ ID NO: 17). Dichas meganucleasas recombinantes se denominan colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 15-16" Las meganucleasas F8R 15-16 ejemplares se proporcionan en las SEQ ID NOs: 76-79.

Las meganucleasas recombinantes de la divulgación comprenden una primera subunidad, que comprende una primera región hipervariable (HVR1), y una segunda subunidad, que comprende una segunda región hipervariable (HVR2). Además, la primera subunidad se une a un primer semisito de reconocimiento en la secuencia de reconocimiento (por ejemplo, el semisito F8R1, F8R3, F8R9, F8R11, F8R13 o F8R15), y la segunda subunidad se une a un segundo semisito de reconocimiento en la secuencia de reconocimiento (por ejemplo, el semisito F8R2, F8R4, F8R10, F8R12, F8R14 o F8R16). Cuando la meganucleasa recombinante es una meganucleasa de cadena única, las subunidades primera y segunda pueden orientarse de manera que la primera subunidad, que comprende la región HVR1 y se une al primer semisito, se sitúe como subunidad N-terminal, y la segunda subunidad, que comprende la región HVR2 y se une al segundo semisito, se sitúe como subunidad C-terminal. Alternativamente, las subunidades primera y segunda pueden orientarse de manera que la primera subunidad, que comprende la región HVR1 y se une al primer semisito, se posiciona como la subunidad C-terminal, y la segunda subunidad, que comprende la región HVR2 y se une al segundo semisito, se posiciona como la subunidad N-terminal. En la Tabla 1 se proporcionan ejemplos de meganucleasas F8R 1-2 de la invención. En la Tabla 2 se proporcionan ejemplos de meganucleasas F8R 3-4 de la invención. En la Tabla 3 se presentan ejemplos de meganucleasas de referencia F8R 9-10. En la Tabla 4 se presentan ejemplos de meganucleasas de referencia F8R 11-12. En la Tabla 5 se presentan ejemplos de meganucleasas de referencia F8R 13-14. En la Tabla 6 se presentan ejemplos de meganucleasas de referencia F8R 15-16.

Tabla 1. Meganucleasas recombinantes ejemplares diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 1-2 (SEQ ID NO: 7)

Meganucleasa	AA SEQ ID	Residuos de la subunidad F8R1	Subunidad F8R1 SEQ ID	*Subunidad F8R1 %	Residuos de la subunidad F8R2	Subunidad F8R2 SEQ ID	*Subunidad F8R2 %
F8R 1-2x.27	19	198-344	22	100	7-153	25	100
F8R 1-2x.15	20	7-153	23	95,24	198-344	26	95,24
F8R 1-2x.9	21	7-153	24	95,24	198-344	27	95,24
**Subunidad F8R1 %" y "Subunidad F8R2 %" representan la identidad de la secuencia de aminoácidos entre las regiones de la subunidad de unión a F8R1 y F8R2 de cada meganucleasa y las regiones de la subunidad de unión a F8R1 y F8R2, respectivamente, de la meganucleasa F8R 1-2x.27.							

Tabla 2. Meganucleasas recombinantes ejemplares diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 3-4 (SEQ ID NO: 9)

Meganucleasa	AA SEQ ID	Residuos de la subunidad F8R3	Subunidad F8R3 SEQ ID	*Subunidad F8R3 %	Residuos de la subunidad F8R4	Subunidad F8R4 SEQ ID	*F8R4 Subunidad %
F8R 3-4x.43	28	198-344	32	100	7-153	36	100
F8R 3-4x.70	29	198-344	33	98,64	7-153	37	91,16
F8R 3-4x.4	30	198-344	34	100	7-153	38	98,64
F8R 3-4L.5	31	198-344	35	98,64	7-153	39	97,28
**Subunidad F8R3 %" y "Subunidad F8R4 %" representan la identidad de la secuencia de aminoácidos entre las regiones de la subunidad de unión a F8R3 y F8R4 de cada meganucleasa y las regiones de la subunidad de unión a F8R3 y F8R4, respectivamente, de la meganucleasa F8R 3-4x.43.							

Tabla 3. Meganucleasas recombinantes ejemplares de referencia diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 9-10 (SEQ ID NO: 11)

Meganucleasa	AA SEQ ID	Residuos de la subunidad F8R9	Subunidad F8R9 SEQ ID	*Subunidad F8R9 %	Residuos de la subunidad F8R10	Subunidad F8R10 SEQ ID	*F8R10 Subunidad %
F8R 9-10x.70	40	7-153	44	100	198-344	48	100
F8R 9-10x.38	41	198-344	45	97,96	7-153	49	100
F8R 9-10x.2	42	198-344	46	94,56	7-153	50	91,84
F8R 9-10x.8	43	198-344	47	95,24	7-153	51	98,64
**Subunidad F8R9 %" y "Subunidad F8R10 %" representan la identidad de secuencia de aminoácidos entre las regiones de subunidad de unión a F8R9 y F8R10 de cada meganucleasa y las regiones de subunidad de unión a F8R9 y F8R10, respectivamente, de la meganucleasa F8R 9-10x.70.							

Tabla 4. Meganucleasas recombinantes ejemplares de referencia diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 11-12 (SEQ ID NO: 13)

Meganucleasa	AA SEQ ID	Residuos de la subunidad F8R11	Subunidad F8R11 SEQ ID	*F8R11 Subunidad %	Residuos de la subunidad F8R12	Subunidad F8R12 SEQ ID	*F8R12 Subunidad %
F8R 11-12x.56	52	7-153	56	100	198-344	60	100
F8R 11-12x.69	53	7-153	57	91,84	198-344	61	95,24
F8R 11-12x.66	54	7-153	58	92,52	198-344	62	90,48
F8R 11-12x.41	55	7-153	59	91,84	198-344	63	92,52
**Subunidad F8R11 %" y "Subunidad F8R12 %" representan la identidad de secuencia de aminoácidos entre las regiones de subunidad de unión a F8R11 y de unión a F8R12 de cada meganucleasa y las regiones de subunidad de unión a F8R11 y de unión a F8R12, respectivamente, de la meganucleasa F8R 11-12x.56.							

Tabla 5. Meganucleasas recombinantes ejemplares de referencia diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 13-14 (SEQ ID NO: 15)

Meganucleasa	AA SEQ ID	Residuos de subunidad F8R13	Subunidad F8R13 SEQ ID	*F8R13 Subunidad %	Residuos de subunidad F8R14	Subunidad F8R14 SEQ ID	*F8R14 Subunidad %
F8R 13-14x.13	64	7-153	68	100	198-344	72	100
F8R 13-14x.3	65	198-344	69	94,56	7-153	73	92,52
F8R 13-14x.1	66	198-344	70	93,88	7-153	74	93,2
F8R 13-14x.11	67	198-344	71	93,2	7-153	75	93,2

**Subunidad F8R13 %" y "Subunidad F8R14 %" representan la identidad de secuencia de aminoácidos entre las regiones de subunidad de unión a F8R13 y de unión a F8R14 de cada meganucleasa y las regiones de subunidad de unión a F8R13 y de unión a F8R14, respectivamente, de la meganucleasa F8R 13-14x.13.

Tabla 6. Meganucleasas recombinantes ejemplares de referencia diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 15-16 (SEQ ID NO: 17)

Meganucleasa	AA SEQ ID	Residuos de subunidad F8R15	F8R15 Subunidad SEQ ID	*F8R15 Subunidad %	Residuos de subunidad F8R16	Subunidad F8R16 SEQ ID	*F8R16 Subunidad %
F8R 15-16x.14	76	198-344	80	100	7-153	84	100
F8R 15-16x.85	77	198-344	81	99,32	7-153	85	93,88
F8R 15-16x.4	78	198-344	82	95,24	7-153	86	91,84
F8R 15-16x.79	79	198-344	83	94,56	7-153	87	92,52

**Subunidad F8R15 %" y "Subunidad F8R16 %" representan la identidad de secuencia de aminoácidos entre las regiones de subunidad de unión a F8R15 y de unión a F8R16 de cada meganucleasa y las regiones de subunidad de unión a F8R15 y de unión a F8R16, respectivamente, de la meganucleasa F8R 15-16x.14.

2.3 Procedimientos de administración y expresión de endonucleasas

Se divulgan procedimientos para producir células modificadas genéticamente utilizando nucleasas de ingeniería que reconocen y escinden secuencias de reconocimiento que se encuentran dentro de una secuencia del intrón 22 de un gen del Factor VIII. Además, se divulgan procedimientos para tratar la hemofilia A en un sujeto administrando una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una nucleasa de ingeniería de la invención (o un ácido nucleico que codifica la nucleasa de ingeniería). En cada caso, se requiere que una nucleasa de ingeniería de la divulgación pueda suministrarse a y/o expresarse a partir de ADN/ARN en células apropiadas que comprendan una inversión de los exones 1-22 en un gen del Factor VIII y que típicamente expresarían el Factor VIII en un sujeto sano (por ejemplo, células endoteliales sinusoidales hepáticas o células endoteliales hematopoyéticas, o células progenitoras que se diferencian en las mismas).

Las nucleasas de ingeniería de la divulgación pueden introducirse en una célula en forma de proteína o, preferentemente, como un ácido nucleico que codifica la nucleasa de ingeniería. Dicho ácido nucleico puede ser ADN (por ejemplo, ADN plasmídico circular o linealizado o productos de PCR) o ARN (por ejemplo, ARNm). En el caso de las realizaciones en las que la secuencia codificante de la nucleasa modificada se suministra en forma de ADN, debe estar vinculada de forma operativa a un promotor para facilitar la transcripción del gen de la nucleasa. Los promotores de mamíferos adecuados incluyen promotores constitutivos como el promotor del citomegalovirus temprano (CMV) (Thomsen et al. (1984), Proc Natl Acad Sci USA. 81(3):659-63) o el promotor temprano del SV40 (Benoist y Chambon (1981), Nature. 290(5804):304-10) así como promotores inducibles como el promotor inducible por tetraciclina (Dingermann et al. (1992), Mol Cell Biol. 12(9):4038-45). Una nucleasa de ingeniería de la divulgación también puede estar vinculada operativamente a un promotor sintético. Los promotores sintéticos pueden incluir, sin limitación, el promotor JeT (WO 2002/012514).

El ARNm que codifica una endonucleasa puede suministrarse a una célula porque esto reduce la probabilidad de que el gen que codifica la nucleasa diseñada se integre en el genoma de la célula. Dicho ARNm que codifica una nucleasa de ingeniería puede producirse mediante procedimientos conocidos en la técnica, como la transcripción in vitro. El ARNm puede ser tapado con 7-metil-guanosina. El ARNm puede estar poliadenilado.

Un ácido nucleico que codifica una endonucleasa también puede introducirse en la célula utilizando una plantilla de ADN monocatenario. El ADN monocatenario puede comprender además una repetición terminal invertida (ITR) 5' y/o 3' de AAV corriente arriba y/o corriente abajo de la secuencia que codifica la nucleasa de ingeniería. El ADN monocatenario puede comprender además un brazo de homología 5' y/o 3' corriente arriba y/o corriente abajo de la secuencia que codifica la nucleasa de ingeniería.

Los genes que codifican una endonucleasa pueden introducirse en una célula utilizando una plantilla de ADN linealizada. En algunos ejemplos, un ADN plasmídico que codifica una endonucleasa puede ser digerido por una o más enzimas de restricción de manera que el ADN plasmídico circular se linealiza antes de ser introducido en una célula.

Los genes que codifican una endonucleasa pueden ser introducidos en una célula en un constructo de ADN recombinante que se autoescinde. Tal constructo puede comprender al menos una secuencia codificadora para una endonucleasa y al menos una secuencia de reconocimiento para la misma endonucleasa. Cuando se expresa en una célula (es decir, in vivo), la endonucleasa reconoce y escinde la secuencia de reconocimiento, dando lugar a la linealización del constructo de ADN.

Las proteínas nucleasas purificadas pueden introducirse en las células para escindir el ADN genómico mediante una variedad de mecanismos diferentes conocidos en la técnica, incluidos los que se detallan más adelante.

El tejido(s) diana para la administración de meganucleasas recombinantes de la divulgación incluye, sin limitación, células del hígado, preferentemente células endoteliales sinusoidales hepáticas o, alternativamente, células progenitoras que se diferencian en células endoteliales sinusoidales hepáticas. Los tejidos diana también pueden incluir, sin limitación, células del sistema circulatorio, preferentemente células endoteliales hematopoyéticas o, alternativamente, células progenitoras que se diferencian en células endoteliales hematopoyéticas. Como se ha discutido, las endonucleasas de la divulgación pueden suministrarse como proteína purificada o como ARN o ADN que codifica las endonucleasas. En una realización, las proteínas endonucleasas, o el ARNm, o los vectores de ADN que codifican las endonucleasas, se suministran a las células diana (por ejemplo, células del hígado o células del sistema circulatorio) mediante una inyección directamente en el tejido diana. Como alternativa, la proteína endonucleasa, el ARNm o el ADN pueden administrarse sistémicamente a través del sistema circulatorio.

Las proteínas endonucleasas, o el ADN/ARN que codifica las endonucleasas, pueden formularse para la administración sistémica, o la administración a los tejidos diana, en un portador farmacéuticamente aceptable de acuerdo con las técnicas conocidas. Véase, por ejemplo Remington, *The Science And Practice of Pharmacy* (21st ed. 2005). En la fabricación de una formulación farmacéutica según la invención, las proteínas/ARN/ARNm se suelen mezclar con un portador farmacéuticamente aceptable. Por supuesto, el portador debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente de la formulación y no debe ser perjudicial para el paciente. El portador puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y puede ser formulado con el compuesto como una formulación de dosis unitaria.

Las proteínas endonucleasas, o el ADN/ARN que codifica la endonucleasa, se acoplan a un péptido penetrante en la célula o a un ligando de orientación para facilitar la captación celular. Entre los ejemplos de péptidos penetrantes de células conocidos en la técnica se encuentran la poli-arginina (Jearawiriyapaisarn, et al. (2008) *Mol Ther.* 16:1624-9), el péptido TAT del virus del VIH (Hudecz et al. (2005), *Med. Res. Rev.* 25: 679-736), MPG (Simeoni, et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2717-2724), Pep-1 (Deshayes et al. (2004) *Biochemistry* 43: 7698-7706y HSV-1 VP-22 (Deshayes et al. (2005) *Cell Mol Life Sci.* 62:1839-49. Alternativamente, las proteínas endonucleasas, o el ADN/ARN que codifica las endonucleasas, se acoplan de forma covalente o no covalente a un anticuerpo que reconoce un receptor específico de la superficie celular expresado en las células diana, de forma que la proteína endonucleasa/ADN/ARN se une a las células diana y es internalizada por ellas. Alternativamente, la proteína endonucleasa/ADN/ARNm puede acoplarse de forma covalente o no covalente al ligando natural (o a una porción del ligando natural) para dicho receptor de superficie celular. (McCall, et al. (2014) *Barreras tisulares.* 2(4):e944449 Dinda, et al. (2013) *Curr Pharm Biotechnol.* 14:1264-74 Kang, et al. (2014) *Curr Pharm Biotechnol.* 15(3):220-30 Qian et al. (2014) *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 10(11): 1491-508).

Las proteínas endonucleasas, o el ADN/ARN que codifica las endonucleasas, pueden encapsularse dentro de hidrogeles biodegradables para su inyección o implantación dentro de la región deseada del hígado (por ejemplo, en proximidad a las células endoteliales sinusoidales hepáticas o a las células endoteliales hematopoyéticas, o a las células progenitoras que se diferencian en las mismas). Los hidrogeles pueden proporcionar una liberación sostenida y ajustable de la carga útil terapéutica en la región deseada del tejido diana sin necesidad de inyecciones frecuentes, y los materiales que responden a estímulos (por ejemplo, hidrogeles que responden a la temperatura y al pH) pueden diseñarse para liberar la carga útil en respuesta a señales ambientales o aplicadas externamente (Kang Derwent et al. (2008) *Trans Am Ophthalmol Soc.* 106:206-214).

Las proteínas endonucleasas, o el ADN/ARN que codifica las endonucleasas, pueden acoplarse de forma covalente o, preferentemente, no covalente a una nanopartícula o encapsularse dentro de dicha nanopartícula utilizando procedimientos conocidos en la técnica (Sharma, et al. (2014) *Biomed Res Int.* 2014). Una nanopartícula es un sistema de suministro a nanoescala cuya escala de longitud es

<1 µm, preferentemente

<100 nm. Dichas nanopartículas pueden diseñarse utilizando un núcleo compuesto de metal, lípido, polímero o macromolécula biológica, y múltiples copias de las proteínas endonucleasas, ARNm o ADN pueden unirse o encapsularse con el núcleo de la nanopartícula. Esto aumenta el número de copias de la proteína/ARN/ADN que se suministra a cada célula y, por tanto, aumenta la expresión intracelular de cada endonucleasa para maximizar la probabilidad de que se corten las secuencias de reconocimiento de la diana. La superficie de estas nanopartículas puede modificarse además con polímeros o lípidos (por ejemplo, quitosano, polímeros catiónicos o lípidos catiónicos) para formar una nanopartícula con núcleo cuya superficie confiere funcionalidades adicionales para mejorar el suministro celular y la captación de la carga útil (Jian et al. (2012) *Biomateriales*. 33(30): 7621-30). Además, las nanopartículas pueden acoplarse ventajosamente a moléculas de orientación para dirigir la nanopartícula al tipo de célula apropiado y/o aumentar la probabilidad de captación celular. Ejemplos de tales moléculas de direccionamiento incluyen los anticuerpos específicos para los receptores de la superficie celular y los ligandos naturales (o porciones de los ligandos naturales) para los receptores de la superficie celular.

Las proteínas endonucleasas o el ADN/ARN que codifica las endonucleasas pueden encapsularse dentro de liposomas o acomplejarse utilizando lípidos catiónicos (véase, por ejemplo, Lipofectamine™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA Zuris et al. (2015) *Nat Biotechnol*. 33: 73-80 Mishra et al. (2011) *J Drug Deliv*. 2011:863734). Las formulaciones de liposomas y lipoplex pueden proteger la carga útil de la degradación, mejorar la acumulación y la retención en el lugar de destino, y facilitar la captación celular y la eficiencia del suministro a través de la fusión con y/o la interrupción de las membranas celulares de las células diana.

Las proteínas endonucleasas, o el ADN/ARN que codifica las endonucleasas, pueden encapsularse dentro de andamios poliméricos (por ejemplo, PLGA) o acomplejarse utilizando polímeros catiónicos (por ejemplo, PEI, PLL) (Tamboli et al. (2011) *Ther Deliv*. 2(4): 523-536). Los portadores poliméricos pueden diseñarse para proporcionar tasas de liberación de fármacos sintonizables a través del control de la erosión del polímero y la difusión del fármaco, y las altas eficiencias de encapsulación del fármaco pueden ofrecer protección de la carga útil terapéutica hasta el suministro intracelular a la población celular deseada.

Las proteínas endonucleasas, o el ADN/ARN que codifica meganucleasas recombinantes, pueden combinarse con moléculas anfifílicas que se autoensamblan en micelas (Tong et al. (2007) *J Gene Med*. 9(11): 956-66). Las micelas poliméricas pueden incluir una cubierta micelar formada con un polímero hidrofílico (por ejemplo, polietilenglicol) que puede evitar la agregación, enmascarar las interacciones de carga y reducir las interacciones no específicas.

Las proteínas endonucleasas, o el ADN/ARN que codifica las endonucleasas, pueden formularse en una emulsión o nanoemulsión (es decir, con un diámetro promedio de partícula de

< 1 nm) para su administración y/o suministro a la célula diana. El término "emulsión" se refiere, sin limitación, a cualquier dispersión o gota de aceite en agua, de agua en aceite, de agua en aceite o de aceite en agua en aceite, incluidas las estructuras lipídicas que pueden formarse como resultado de las fuerzas hidrófobas que alejan los residuos apolares (por ejemplo, las cadenas largas de hidrocarburos) del agua y los grupos de cabeza polar hacia el agua, cuando una fase inmiscible de agua se mezcla con una fase acuosa. Estas otras estructuras lipídicas incluyen, entre otras, vesículas lipídicas unilamelares, paucilamelares y multilamelares, micelas y fases laminares. Las emulsiones están compuestas por una fase acuosa y una fase lipofílica (que suele contener un aceite y un disolvente orgánico). Las emulsiones también suelen contener uno o más tensioactivos. Las formulaciones en nanoemulsión son bien conocidas, por ejemplo, las descritas en Solicitud de patente estadounidense nº 2002/0045667 y 2004/0043041 y Pat. Números 6.015.832, 6.506.803, 6.635.676 y 6.559.189.

Las proteínas endonucleasas, o el ADN/ARN que codifica las endonucleasas, pueden estar unidas covalentemente, o asociadas no covalentemente, a conjugados poliméricos multifuncionales, dendrímeros de ADN y dendrímeros poliméricos (Mastorakos et al. (2015) *Nanoescala*. 7(9): 3845-56 Cheng et al. (2008) *J Pharm Sci*. 97(1): 123-43). La generación de dendrímeros puede controlar la capacidad y el tamaño de la carga útil, y puede proporcionar una alta capacidad de carga útil de fármacos. Además, el despliegue de múltiples grupos de superficie puede aprovecharse para mejorar la estabilidad, reducir las interacciones inespecíficas y mejorar el direccionamiento y la liberación de fármacos específico en células.

Los genes que codifican una endonucleasa pueden suministrarse utilizando un vector viral. Tales vectores son conocidos en la técnica e incluyen vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales y vectores de virus adeno-asociados (AAV) (revisados en Vannucci, et al. (2013) *New Microbiol*. 36:1-22). Los vectores virales pueden inyectarse directamente en los tejidos objetivo. Los vectores virales también pueden administrarse por vía sistémica a través del sistema circulatorio. Es conocido en la técnica que diferentes vectores AAV tienden a localizarse en diferentes tejidos. En los tejidos diana del hígado, se ha demostrado una transducción eficaz de los hepatocitos, por ejemplo, con los serotipos 2, 8 y 9 del AAV (Sands (2011) *Methods Mol. Biol*. 807:141-157). Los vectores AAV también pueden ser autocomplementarios, de modo que no requieren la síntesis de ADN de segunda cadena en la célula huésped (McCarty, et al. (2001) *Gene Ther*. 8:1248-54).

Un vector viral utilizado para el suministro del gen de la endonucleasa puede ser un vector viral autolimitado. Un vector viral autolimitado puede tener un tiempo de persistencia limitado en una célula u organismo debido a la presencia de una secuencia de reconocimiento para una meganucleasa recombinante dentro del vector. Así, un vector viral autolimitado puede ser diseñado para proporcionar la codificación de un promotor, una endonucleasa descrita en el presente documento y un sitio de reconocimiento de la endonucleasa dentro de las ITR. El vector viral autolimitante suministra el gen de la endonucleasa a una célula, tejido u organismo, de manera que la endonucleasa se expresa y es capaz de cortar el genoma de la célula en una secuencia de reconocimiento endógena dentro del genoma. La endonucleasa suministrada también encontrará su sitio diana dentro del propio vector viral autolimitado y cortará el vector en este sitio diana. Una vez cortados, los extremos 5' y 3' del genoma viral quedarán expuestos y serán degradados por las exonucleasas, matando así al virus y cesando la producción de la endonucleasa.

Si los genes de la endonucleasa se suministra en forma de ADN (por ejemplo, plásmido) y/o a través de un vector viral (por ejemplo, AAV), deben estar vinculados de forma operativa a un promotor. Puede tratarse de un promotor viral, como los promotores endógenos del vector viral (por ejemplo, el LTR de un vector lentiviral) o los conocidos promotores tempranos del citomegalovirus o del virus SV40. Preferentemente, los genes de la meganucleasa están vinculados de forma operativa a un promotor que impulsa la expresión del gen preferentemente en las células diana. Ejemplos de promotores específicos del hígado incluyen, sin limitación, el promotor de la alfa-1 antitripsina humana y el promotor de la apolipoproteína A-II.

Se prevé que un solo tratamiento causará permanentemente una reversión de los exones 1-22 en el gen del Factor VIII, resultando en un gen funcional de tipo salvaje en un porcentaje de las células diana del paciente. Sin embargo, si la frecuencia de reversión es baja, o si es necesario corregir un gran porcentaje de células diana, puede ser necesario realizar múltiples tratamientos en cada paciente.

2.4 Composiciones farmacéuticas

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que codifica una nucleasa de ingeniería de la divulgación. También se divulga una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una célula genéticamente modificada de la divulgación que puede administrarse a un tejido diana donde la célula puede diferenciarse en una célula que exprese el Factor VIII de tipo salvaje. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser útiles para tratar a un sujeto que tenga hemofilia A, donde la enfermedad se caracteriza por una inversión de los exones 1-22 en un gen del Factor VIII.

Dichas composiciones farmacéuticas pueden prepararse de acuerdo con técnicas conocidas. Véase, por ejemplo Remington, The Science and Practice of Pharmacy (21st ed. 2005). En la fabricación de una formulación farmacéutica según la invención, los polipéptidos de endonucleasas (o el ADN/ARN que los codifica) se suelen mezclar con un portador farmacéuticamente aceptable y la composición resultante se administra a un sujeto. Por supuesto, el portador debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente de la formulación y no debe ser perjudicial para el sujeto. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además uno o más agentes adicionales o moléculas biológicas útiles en el tratamiento de una enfermedad en el sujeto. Asimismo, el/los agente/s adicional/es y/o la/s molécula/s biológica/s puede/n ser coadministrada/s como una composición separada.

2.5 Procedimientos para producir vectores AAV recombinantes

En algunas realizaciones, la invención proporciona vectores AAV recombinantes para su uso en los procedimientos divulgados. Los vectores AAV recombinantes suelen producirse en líneas celulares de mamíferos como HEK-293. Dado que los genes virales cap y rep se eliminan del vector para evitar su autorreplicación y dejar espacio al gen o genes terapéuticos que se van a suministrar (por ejemplo, el gen de la endonucleasa), es necesario proporcionar los componentes "ayudantes" (por ejemplo, adenovirales) necesarios para apoyar la replicación (Cots D, Bosch A, Chillon M (2013) Curr. Gene Ther. 13(5): 370-81). Con frecuencia, los vectores AAV recombinantes se producen utilizando una triple transfección en la que una línea celular se transfecta con un primer plásmido que codifica los componentes "ayudantes", un segundo plásmido que comprende los genes cap y rep, y un tercer plásmido que comprende los ITR virales que contienen la secuencia de ADN intermedia que se empaquetará en el virus. Las partículas virales que comprenden un genoma (ITRs y gen(es) de interés) encerrado en una cápside se aíslan entonces de las células mediante ciclos de congelación-descongelación, sonicación, detergente u otros medios conocidos en la técnica. A continuación, las partículas se purifican mediante centrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio o cromatografía de afinidad y, posteriormente, se suministran al gen o genes de interés en células, tejidos u organismo, como un paciente humano.

Dado que las partículas recombinantes de AAV se producen (fabrican) típicamente en células, deben tomarse precauciones al practicar la presente invención para asegurar que la endonucleasa específica del sitio no se exprese en las células de empaquetamiento. Dado que los genomas virales comprenden una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa, cualquier endonucleasa expresada en la línea celular de empaquetado será capaz de escindir el genoma viral antes de que pueda ser empaquetado en partículas virales. Esto dará lugar a una menor eficacia del empaquetado y/o al empaquetado de genomas fragmentados. Se pueden utilizar varios enfoques para evitar la expresión de endonucleasas en las células de empaquetado, incluyendo:

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

2. Alternativamente, el vector puede empaquetarse en células de una especie diferente en la que no es probable que se exprese la endonucleasa. Por ejemplo, las partículas virales pueden producirse en células microbianas, de insectos o de plantas utilizando promotores de mamíferos, como los conocidos promotores tempranos del citomegalovirus o del virus SV40, que no son activos en las células de envasado no mamíferas. En una realización preferida, las partículas virales se producen en células de insectos utilizando el sistema de baculovirus descrito por Gao, et al. (Gao, H., et al. (2007) *J. Biotechnol.* 131(2): 138-43). Es poco probable que una endonucleasa bajo el control de un promotor de mamífero se exprese en estas células (Airenne, KJ, et al. (2013) *Mol. Ther.* 21(4):739-49). Además, las células de los insectos utilizan motivos de empalme de ARNm diferentes a los de las células de los mamíferos. Así, es posible incorporar un intrón de mamífero, como el intrón de la hormona del crecimiento humano (HGH) o el intrón del antígeno T grande del SV40, en la secuencia de codificación de una endonucleasa. Dado que estos intrones no se empalman eficazmente a partir de los transcritos de pre-ARNm en las células de los insectos, éstas no expresarán una endonucleasa funcional y empaquetarán el genoma completo. Por el contrario, las células de mamífero a las que se suministran las partículas recombinantes AAV resultantes empalmarán correctamente el pre-ARNm y expresarán la proteína endonucleasa funcional. Haifeng Chen ha informado del uso de los intrones del antígeno HGH y del antígeno T grande del SV40 para atenuar la expresión de las proteínas tóxicas barnasa y fragmento A de la toxina de la difteria en células de empaquetamiento de insectos, lo que permite la producción de vectores AAV recombinantes que portan estos genes de toxinas (Chen, H (2012) *Mol Ther Nucleic Acids.* 1(11): e57).

3. El gen de la endonucleasa puede estar vinculado de forma operativa a un promotor inducible de manera que se requiera un inductor de molécula pequeña para la expresión de la endonucleasa. Algunos ejemplos de promotores inducibles son el sistema Tet-On (Clontech Chen H., et al., (2015) *BMC Biotechnol.* 15(1):4) y el sistema RheoSwitch (Intrexon Sowa G., et al., (2011) *Spine*, 36(10): E623-8). Ambos sistemas, al igual que otros similares conocidos en la técnica, se basan en factores de transcripción inducibles por ligando (variantes del represor Tet y del receptor Ecdysone, respectivamente) que activan la transcripción en respuesta a un activador de molécula pequeña (Doxiciclina o Ecdysone, respectivamente). La práctica de la presente invención utilizando dichos activadores de transcripción inducibles por ligando incluye: 1) colocar el gen de la endonucleasa bajo el control de un promotor que responda al factor de transcripción correspondiente, teniendo el gen de la endonucleasa (un) sitio(s) de unión para el factor de transcripción; y 2) incluir el gen que codifica el factor de transcripción en el genoma viral empaquetado. El último paso es necesario porque la endonucleasa no se expresará en las células o tejidos diana tras el suministro recombinante de AAV si el activador de la transcripción no se proporciona también a las mismas células. El activador de la transcripción induce entonces la expresión del gen de la endonucleasa sólo en las células o tejidos que son tratados con el activador de molécula pequeña afín. Este enfoque es ventajoso porque permite regular la expresión del gen de la endonucleasa de forma espacio-temporal, seleccionando cuándo y a qué tejidos se administra el inductor de moléculas pequeñas. Sin embargo, el requisito de incluir el inductor en el genoma viral, que tiene una capacidad de carga significativamente limitada, crea un inconveniente para este enfoque.

4. En otro procedimiento, las partículas AAV recombinantes se producen en una línea celular de mamífero que expresa un represor de la transcripción que impide la expresión de la endonucleasa. Los represores de la transcripción son conocidos en la técnica e incluyen el represor Tet, el represor Lac, el represor Cro y el represor Lambda. Muchos receptores hormonales nucleares, como el receptor de la ecdisona, también actúan como represores de la transcripción en ausencia de su ligando hormonal correspondiente. Para poner en práctica la presente invención, las células de empaquetamiento se transfectan/transducen con un vector que codifica un

represor de la transcripción y el gen de la endonucleasa en el genoma viral (vector de empaquetamiento) se vincula de forma operativa a un promotor que se modifica para que comprenda sitios de unión para el represor, de forma que el represor silencie el promotor. El gen que codifica el represor de la transcripción puede colocarse en diversas posiciones. Puede codificarse en un vector separado; puede incorporarse en el vector de empaquetado fuera de las secuencias ITR; puede incorporarse en el vector cap/rep o en el vector auxiliar adenoviral; o, lo que es más preferible, puede integrarse de forma estable en el genoma de la célula de empaquetado de forma que se exprese constitutivamente. Los procedimientos para modificar promotores comunes de mamíferos para incorporar sitios represores de la transcripción son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Chang y Roninson modificaron los promotores fuertes y constitutivos del CMV y del RSV para que incluyeran operadores para el represor Lac y demostraron que la expresión génica de los promotores modificados estaba muy atenuada en las células que expresaban el represor (Chang BD, y Roninson IB (1996) Gene 183:137-42). El uso de un represor de la transcripción no humano garantiza que la transcripción del gen de la endonucleasa se reprimirá sólo en las células de empaquetamiento que expresan el represor y no en las células o tejidos diana transducidos con el vector AAV recombinante resultante.

2.6 Variantes de nucleasas de ingeniería

Se divulgan las nucleasas de ingeniería descritas en el presente documento y sus variantes. Además, se divulgan polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica las endonucleasas descritas en el presente documento, y variantes de dichos polinucleótidos.

Tal y como se utiliza en este documento, "variantes" significa secuencias sustancialmente similares. Por polipéptido "variante" se entiende un polipéptido derivado del polipéptido "nativo" por delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos de la proteína nativa y/o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios del polipéptido nativo. Tal y como se utiliza aquí, un polinucleótido o polipéptido "nativo" comprende una secuencia parental de la que se derivan variantes. Las variantes de los polipéptidos comprendidas en las realizaciones son biológicamente activas. Es decir, siguen poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa; es decir, la capacidad de reconocer y escindir secuencias de reconocimiento que se encuentran en una secuencia int22h-1 en un gen del Factor VIII, incluyendo, por ejemplo, la secuencia de reconocimiento F8R 1-2 (SEQ ID NO: 7), la secuencia de reconocimiento F8R 3-4 (SEQ ID NO: 9), la secuencia de reconocimiento F8R 9-10 (SEQ ID NO: 11), la secuencia de reconocimiento F8R 11-12 (SEQ ID NO: 13), la secuencia de reconocimiento F8R 13-14 (SEQ ID NO: 15), o la secuencia de reconocimiento F8R 15-16 (SEQ ID NO: 17). Estas variantes pueden ser el resultado, por ejemplo, de la manipulación humana. Variantes biológicamente activas de un polipéptido nativo de las realizaciones (por ejemplo, SEQ ID NOs: 19-21, 28-31, 40-43, 52-55, 64-67, o 76-79), o variantes biológicamente activas de las subunidades de unión a semisito de reconocimiento descritas en el presente documento, tendrán al menos alrededor del 40 %, alrededor del 45 %, alrededor del 50 %, alrededor del 55 %, alrededor del 60 %, alrededor del 65 %, alrededor del 70 %, alrededor del 75 %, alrededor del 80 %, alrededor del 85 %, alrededor del 90 %, alrededor del 91 %, alrededor del 92 %, alrededor del 93 %, alrededor del 94 %, alrededor del 95 %, alrededor del 96 %, alrededor del 97 %, alrededor del 98 %, o alrededor del 99 %, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del polipéptido nativo o de la subunidad nativa, tal como se determina mediante los programas de alineación de secuencias y los parámetros descritos en el presente documento. Una variante biológicamente activa de un polipéptido o subunidad de las realizaciones puede diferir de ese polipéptido o subunidad en tan pocos como unos 1-40 residuos de aminoácidos, tan pocos como aproximadamente 1-20, tan pocos como aproximadamente 1-10, tan pocos como aproximadamente 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

Los polipéptidos pueden ser alterados de varias maneras, incluyendo sustituciones de aminoácidos, delecciones, truncamientos e inserciones. Los procedimientos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en el arte. Por ejemplo, se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos mediante mutaciones en el ADN. Los procedimientos de mutagénesis y alteración de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382 Pat. de EE.UU. N° 4.873.192 Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York) y las referencias citadas en él. En el modelo de Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Las sustituciones conservadoras, como el cambio de un aminoácido por otro con propiedades similares, pueden ser óptimas.

Se ha identificado previamente un número sustancial de modificaciones de aminoácidos en el dominio de reconocimiento de ADN de la meganucleasa I-Crel de tipo salvaje (por ejemplo, U.S. 8,021,867) que, por separado o en combinación, dan lugar a meganucleasas recombinantes con especificidades alteradas en bases individuales dentro de la secuencia de reconocimiento de ADN de semisito, de manera que las meganucleasas resultantes diseñadas racionalmente tienen especificidades de semisito diferentes de la enzima de tipo salvaje. La Tabla 7 proporciona las posibles sustituciones que pueden realizarse en un monómero o subunidad de meganucleasa recombinante para mejorar la especificidad en función de la base presente en cada posición de semisito (-1 a -9) de un semisito de reconocimiento.

Tabla 7.

	Base de cadena en sentido favorecida										
Posn.	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
-1	Y75	R70*	K70	Q70*				T46*			G70
	L75*	H75*	E70*	C70							A70
	C75*	R75*	E75*	L70							S70
	Y139*	H46*	E46*	Y75*							G46*
	C46*	K46*	D46*	Q75*							
	A46*	R46*		H75*							
				H139							
				Q46*							
				H46*							
-2	Q70	E70	H70	Q44*	C44*						
	T44*	D70	D44*								
	A44*	K44*	E44*								
	V44*	R44*									
	144*										
	L44*										
	N44*										
-3	Q68	E68	R68	M68		H68		Y68	K68		
	C24*	F68		C68							
	I24*	K24*		L68							
		R24*		F68							
-4	A26*	E77	R77					S77			S26*
	Q77	K26*	E26*					Q26*			
-5		E42	R42			K28*	C28*				M66
							Q42				K66
-6	Q40	E40	R40	C40	A40						S40
	C28*	R28*		140	A79						S28*
				V40	A28*						
				C79	H28*						
				179							
				V79							
				Q28*							
-7	N30*	E38	K38	138			C38				H38
	Q38	K30*	R38	L38							N38
		R30*	E30*								Q30*
-8	F33	E33	F33	L33		R32*	R33				
	Y33	D33	H33	V33							
				133							
				F33							

	Base de cadena en sentido favorecida										
Posn.	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
				C33							
-9		E32	R32	L32				D32			S32
			K32	V32				132			N32
				A32							H32
				C32							Q32
											T32

Las entradas en negrita son residuos de contacto de tipo salvaje y no constituyen "modificaciones" tal y como se utilizan aquí. Un asterisco indica que el residuo entra en contacto con la base de la cadena antisentido.

En el caso de los polinucleótidos, una "variante" comprende una supresión y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios dentro del polinucleótido nativo. Un experto en la materia reconocerá que las variantes de los ácidos nucleicos de las realizaciones se construirán de manera que se mantenga el marco de lectura abierto. Para los polinucleótidos, las variantes conservativas incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos de las realizaciones. Los polinucleótidos variantes incluyen polinucleótidos derivados sintéticamente, como los generados, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio, pero que siguen codificando una meganucleasa recombinante de las realizaciones. Generalmente, las variantes de un polinucleótido particular de las realizaciones tendrán al menos el 95 %, alrededor del 96 %, alrededor del 97 %, alrededor del 98 %, alrededor del 99 % o más de identidad de secuencia con ese polinucleótido particular como se determina por los programas de alineación de secuencia y los parámetros descritos en otra parte del presente documento. Las variantes de un polinucleótido particular de las realizaciones (es decir, el polinucleótido de referencia) también pueden evaluarse por comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por un polinucleótido variante y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia.

No se espera que las supresiones, inserciones y sustituciones de las secuencias proteicas aquí englobadas produzcan cambios radicales en las características del polipéptido. Sin embargo, cuando es difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, la supresión o la inserción antes de hacerlo, un experto en la materia apreciará que el efecto se evaluará mediante el cribado del polipéptido para su capacidad de reconocer y escindir preferentemente secuencias de reconocimiento que se encuentran dentro de una secuencia int22h-1 de un gen del Factor VIII.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra además con los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos. Los ejemplos que no están comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones son sólo a título ilustrativo

EJEMPLO 1

Caracterización de meganucleasas que reconocen y escinden secuencias de reconocimiento F8R

1. Meganucleasas que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento F8R 1-2

Meganucleasas recombinantes (SEQ ID NOs: 19-21), denominadas colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 1-2", fueron diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 1-2 (SEQ ID NO: 7), que está presente en el gen del Factor VIII humano y canino, concretamente en la secuencia int22h-1, y más específicamente en la secuencia F8A1. Cada meganucleasa recombinante F8R 1-2 comprende una señal N-terminal de anidamiento de la nucleasa derivada del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad de cada meganucleasa F8R 1-2 se une al semi-sitio de reconocimiento F8R1 de la SEQ ID NO: 7, mientras que una segunda subunidad se une al semi-sitio de reconocimiento F8R2 (ver, Fig. 2).

Las subunidades de unión a F8R1 y las subunidades de unión a F8R2 comprenden cada una una región hipervariable de 56 pares de bases, denominada HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a F8R1 están muy conservadas fuera de la región HVR1. Del mismo modo, las subunidades de unión a F8R2 también están muy conservadas fuera de la región HVR2. Las regiones de unión a F8R1 de las SEQ ID NOs: 19-21 se proporcionan como SEQ ID NOs: 22-24, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 22-24 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22, que es la región de unión a F8R1 de la meganucleasa F8R 1-2x.27 (SEQ ID NO: 19). Regiones de unión a F8R2 de las SEQ ID NOs: 19-21 se proporcionan como SEQ ID NOs: 25-27,

respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 25-27 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 25, que es la región de unión a F8R2 de la meganucleasa F8R 1-2x.27 (SEQ ID NO: 19).

2. Meganucleasas que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento F8R 3-4

Meganucleasas recombinantes (SEQ ID NOs: 28-31), denominadas colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 3-4", fueron diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 3-4 (SEQ ID NO: 9), que está presente en el gen del Factor VIII humano y canino, concretamente en la secuencia int22h-1, y más específicamente en la secuencia F8A1. Cada meganucleasa recombinante F8R 3-4 comprende una señal N-terminal de anidamiento de la nucleasa derivada del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad de cada meganucleasa F8R 3-4 se une al semi-sitio de reconocimiento F8R3 de la SEQ ID NO: 9, mientras que una segunda subunidad se une al semi-sitio de reconocimiento de F8R4 (ver, Fig. 2).

Las subunidades de unión a F8R3 y las subunidades de unión a F8R4 comprenden cada una una región hipervariable de 56 pares de bases, denominada HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a F8R3 están muy conservadas fuera de la región HVR1. Del mismo modo, las subunidades de unión a F8R4 también están muy conservadas fuera de la región HVR2. Las regiones de unión a F8R3 de las SEQ ID NOs: 28-31 se proporcionan como SEQ ID NOs: 32-35, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 32-35 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 32, que es la región de unión a F8R3 de la meganucleasa F8R 3-4x.43 (SEQ ID NO: 28). Regiones de unión a F8R4 de las SEQ ID NOs: 28-31 se proporcionan como SEQ ID NOs: 36-39, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 36-39 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 36, que es la región de unión a F8R4 de la meganucleasa F8R 3-4x.43 (SEQ ID NO: 28).

3. Meganucleasas de referencia que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento F8R 9-10

Meganucleasas recombinantes (SEQ ID NOs: 40-43), denominadas colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 9-10", fueron diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 9-10 (SEQ ID NO: 11), que está presente en el gen del Factor VIII humano y canino, concretamente en la secuencia int22h-1. Cada meganucleasa recombinante F8R 9-10 comprende una señal de anidamiento de la nucleasa N-terminal derivada del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad de cada meganucleasa F8R 9-10 se une al semi-sitio de reconocimiento F8R9 de la SEQ ID NO: 11, mientras que una segunda subunidad se une al semi-sitio de reconocimiento F8R10 (ver, Fig. 2).

Las subunidades de unión a F8R9 y las subunidades de unión a F8R10 comprenden cada una una región hipervariable de 56 pares de bases, denominada HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a F8R9 están muy conservadas fuera de la región HVR1. Del mismo modo, las subunidades de unión a F8R10 también están muy conservadas fuera de la región HVR2. Las regiones de unión a F8R9 de las SEQ ID NOs: 40-43 se proporcionan como SEQ ID NOs: 44-47, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 44-47 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 44, que es la región de unión a F8R9 de la meganucleasa F8R 9-10x.70 (SEQ ID NO: 40). Regiones de unión a F8R10 de las SEQ ID NOs: 40-43 se proporcionan como SEQ ID NOs: 48-51, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 48-51 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 48, que es la región de unión a F8R10 de la meganucleasa F8R 9-10x.70 (SEQ ID NO: 40).

4. Meganucleasas de referencia que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento F8R 11-12

Meganucleasas recombinantes (SEQ ID NOs: 52-55), denominadas colectivamente en este documento "meganucleasas F8R 11-12", fueron diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 11-12 (SEQ ID NO: 13), que está presente en el gen del Factor VIII humano y canino, concretamente en la secuencia int22h-1. Cada meganucleasa recombinante F8R 11-12 comprende una señal de anidamiento de la nucleasa N-terminal derivada del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad de cada meganucleasa F8R 11-12 se une al semi-sitio de reconocimiento F8R11 de la SEQ ID NO: 13, mientras que una segunda subunidad se une al semi-sitio de reconocimiento F8R12 (ver, Fig. 2).

Las subunidades de unión a F8R11 y las subunidades de unión a F8R12 comprenden cada una una región hipervariable de 56 pares de bases, denominada HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a F8R11 están muy conservadas fuera de la región HVR1. Del mismo modo, las subunidades de unión a F8R12 también están muy conservadas fuera de la región HVR2. Las regiones de unión a F8R11 de las SEQ ID NOs: 52-55 se proporcionan como SEQ ID NOs: 56-59, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 56-59 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 56, que es la región de unión a F8R11 de la meganucleasa F8R 11-12x.56 (SEQ ID NO: 52). Regiones de unión a F8R12 de las SEQ ID NOs: 52-55 se proporcionan como SEQ ID NOs: 60-63, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 60-63 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 60, que es la región de unión a F8R12 de la meganucleasa F8R 11-12x.56 (SEQ ID NO: 52).

5. Meganucleasas de referencia que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento F8R 13-14

Meganucleasas recombinantes (SEQ ID NOs: 64-67), denominadas colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 13-14", fueron diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 13-14 (SEQ ID NO: 15), que está presente en el gen del Factor VIII humano y canino, concretamente en la secuencia int22h-1. Cada meganucleasa recombinante F8R 13-14 comprende una señal de anidamiento de la nucleasa N-terminal derivada del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad de cada meganucleasa F8R 13-14 se une al semisitio de reconocimiento F8R13 de la SEQ ID NO: 15, mientras que una segunda subunidad se une al semi-sitio de reconocimiento F8R14 (ver, Fig. 2).

Las subunidades de unión a F8R13 y las subunidades de unión a F8R14 comprenden cada una una región hipervariable de 56 pares de bases, denominada HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a F8R13 están muy conservadas fuera de la región HVR1. Del mismo modo, las subunidades de unión a F8R14 también están muy conservadas fuera de la región HVR2. Las regiones de unión a F8R13 de las SEQ ID NOs: 64-67 se proporcionan como SEQ ID NOs: 68-71, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 68-71 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 68, que es la región de unión a F8R13 de la meganucleasa F8R 13-14x.13 (SEQ ID NO: 64). Regiones de unión a F8R14 de las SEQ ID NOs: 64-67 se proporcionan como SEQ ID NOs: 72-75, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 72-75 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 72, que es la región de unión a F8R14 de la meganucleasa F8R 13-14x.13 (SEQ ID NO: 64).

6. Meganucleasas de referencia que reconocen y escinden la secuencia de reconocimiento F8R 15-16

Meganucleasas recombinantes (SEQ ID NOs: 76-79), denominadas colectivamente en el presente documento "meganucleasas F8R 15-16", fueron diseñadas para reconocer y escindir la secuencia de reconocimiento F8R 15-16 (SEQ ID NO: 17), que está presente en el gen del Factor VIII humano y canino, concretamente en la secuencia int22h-1. Cada meganucleasa recombinante F8R 15-16 comprende una señal de anidamiento de la nucleasa N-terminal derivada del SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa. Una primera subunidad de cada meganucleasa F8R 15-16 se une al semi-sitio de reconocimiento F8R15 de la SEQ ID NO: 17, mientras que una segunda subunidad se une al semi-sitio de reconocimiento F8R16 (ver, Fig. 2).

Las subunidades de unión a F8R15 y las subunidades de unión a F8R16 comprenden cada una una región hipervariable de 56 pares de bases, denominada HVR1 y HVR2, respectivamente. Las subunidades de unión a F8R15 están muy conservadas fuera de la región HVR1. Del mismo modo, las subunidades de unión a F8R16 también están muy conservadas fuera de la región HVR2. Las regiones de unión al F8R15 de las SEQ ID NOs: 76-79 se proporcionan como SEQ ID NOs: 80-83, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 80-83 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 80, que es la región de unión a F8R15 de la meganucleasa F8R 15-16x.14 (SEQ ID NO: 76). Regiones de unión a F8R16 de las SEQ ID NOs: 76-79 se proporcionan como SEQ ID NOs: 84-87, respectivamente. Cada una de las SEQ ID NOs: 84-87 comparten al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 84, que es la región de unión a F8R16 de la meganucleasa F8R 15-16x.14 (SEQ ID NO: 76).

7. Escisión de las secuencias de reconocimiento de F8R en un ensayo de reportero de células CHO

Para determinar si las meganucleasas F8R 1-2, F8R 3-4, F8R 9-10, F8R 11-12, F8R 13-14 y F8R 15-16 podían reconocer y escindir sus respectivas secuencias de reconocimiento (SEQ ID NOs: 7, 9, 11, 13, 15 y 17, respectivamente), cada meganucleasa recombinante se evaluó mediante el ensayo reportero de células CHO descrito anteriormente (véase, WO/2012/167192 y la Fig. 4). Para realizar los ensayos, se produjeron líneas de células CHO reporteras que llevaban un casete de expresión del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) no funcional integrado en el genoma de las células. El gen de la GFP en cada línea celular fue interrumpido por un par de secuencias de reconocimiento de tal manera que la escisión intracelular de cualquiera de las secuencias de reconocimiento por una meganucleasa estimularía un evento de recombinación homóloga que daría lugar a un gen funcional de la GFP.

En las líneas de células reporteras CHO desarrolladas para este estudio, una secuencia de reconocimiento insertada en el gen GFP fue la secuencia de reconocimiento F8R 1-2 (SEQ ID NO: 7), la secuencia de reconocimiento F8R 3-4 (SEQ ID NO: 9), la secuencia de reconocimiento F8R 9-10 (SEQ ID NO: 11), la secuencia de reconocimiento F8R 11-12 (SEQ ID NO: 13), la secuencia de reconocimiento F8R 13-14 (SEQ ID NO: 15), o la secuencia de reconocimiento F8R 15-16 (SEQ ID NO: 17). La segunda secuencia de reconocimiento insertada en el gen GFP fue una secuencia de reconocimiento CHO-23/24, que es reconocida y escindida por una meganucleasa de control llamada "CHO-23/24". Las células reporteras CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento F8R 1-2 y la secuencia de reconocimiento CHO-23/24 se denominan "células F8R 1-2" Las células reporteras CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento F8R 3-4 y la secuencia de reconocimiento CHO-23/24 se denominan "células F8R 3-4" Las células reporteras CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento F8R 9-10 y la secuencia de reconocimiento CHO-23/24 se denominan "células F8R 9-10" Las células reporteras CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento F8R 11-12 y la secuencia de reconocimiento CHO-23/24 se denominan "células F8R 11-12" Las células reporteras CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento F8R 13-14 y la secuencia de reconocimiento CHO-23/24 se denominan "células F8R 13-14" Las células informadoras CHO que comprenden la secuencia de reconocimiento F8R 15-16 y la secuencia de reconocimiento CHO-23/24 se denominan "células F8R 15-16"

Las células reporteras CHO se transfectaron con ADN plasmídico que codifica sus correspondientes meganucleasas recombinantes (por ejemplo, las células F8R 1-2 se transfectaron con ADN plasmídico que codifica las meganucleasas F8R 1-2) o que codifica la meganucleasa CHO-23/34. En cada ensayo, se transfectaron 4e5 células reporteras CHO con 50 ng de ADN plasmídico en una placa de 96 pocillos utilizando Lipofectamine® 2000 (ThermoFisher) según las instrucciones del fabricante. A las 48 horas después de la transfección, las células se evaluaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas a la GFP en comparación con un control negativo no transfectado (F8R bs). Como se muestra en las Figs. 5A-5G, se comprobó que todas las meganucleasas F8R producen células positivas a la GFP en las líneas celulares que comprenden su correspondiente secuencia de reconocimiento en frecuencias significativamente superiores al control negativo.

La eficacia de las meganucleasas PCS 7-8 también se determinó de manera dependiente del tiempo 2, 5, 7, 9 y 12 días después de la introducción de las meganucleasas en células reporteras CHO. En este estudio, las células F8R 1-2, F8R 3-4, F8R 9-10, F8R 11-12, F8R 13-14 o F8R 15-16 ($1,0 \times 10^6$) se electroporaron con 1×10^6 copias de su correspondiente ARNm de meganucleasas por célula utilizando un BioRad Gene Pulser Xcell™ según las instrucciones del fabricante. En los puntos de tiempo designados después de la transfección, las células se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas a la GFP. También se incluyó una meganucleasa CHO-23/24 en cada punto de tiempo como control positivo.

Como se muestra en las Figs. 6A-6F, el % de GFP producido por una serie de meganucleasas F8R diferentes fue relativamente consistente a lo largo del curso temporal de cada estudio, lo que indica una actividad de escisión persistente y la ausencia de cualquier toxicidad sustancial en las células. Otras meganucleasas F8R mostraron cierta variabilidad en el % de expresión de la GFP a lo largo del estudio.

8. Conclusiones

Estos estudios demostraron que las meganucleasas F8R englobadas en las composiciones de la invención pueden dirigirse y escindir eficazmente sus respectivas secuencias de reconocimiento en las células.

EJEMPLO 2

Inversión de los exones 1-22 en el gen del factor VIII humano

1. Producción de indels en secuencias de reconocimiento en células de mamíferos

Se comprobó la capacidad de las meganucleasas F8R 1-2 y F8R 3-4 para cortar y causar inserciones y/o deleciones (indels) en sus sitios de reconocimiento mediante el ensayo de la endonucleasa T7. Se transfectaron células HEK 293 con 200ng de ARNm que codificaba cada nucleasa. Las células se recolectaron a los 7 días después de la transfección y se extrajo el ADN. Este ADN se utilizó como plantilla en las reacciones de PCR utilizando los cebadores F8R3-4f.357 y F8R1-2r.467. El producto resultante de la PCR se analizó con la endonucleasa T7 para revelar la presencia de indels (Fig. 7). La Fig. 7 ilustra un gel de agarosa cargado con reacciones de PCR/T7 endonucleasa de células HEK 293 que fueron tratadas de forma simulada (carril 1) o tratadas con F8R 1-2x.15 (carril 2), F8R 1-2x.27 (carril 3), F8R 3-4x.43 (carril 4), o F8R 3-4x.70 (carril 5). Las bandas de menor peso molecular en los carriles 4 y 5 son indicativas de un resultado positivo de la endonucleasa T7 y de la presencia de indels en las secuencias de reconocimiento objetivo.

2. Inversión de los exones 1-22 en células de mamíferos

Para determinar si la escisión del ADN genómico por las meganucleasas F8R 1-2 y F8R 3-4 podría estimular una inversión de los exones 1-22, primero se transfectaron células HEK 293 con 200ng de ARNm que codificaba las meganucleasas F8R 1-2 o F8R 3-4 y se recolectó el ADN 7 días después. El ADN se analizó por PCR utilizando el conjunto de cebadores H1R/H1F para detectar el posicionamiento normal del exón 1-22 y con el conjunto de cebadores H1F/H2/3R para detectar el posicionamiento invertido del exón 1-22 (Fig. 8). La Fig. 8A ilustra un gel de agarosa cargado con reacciones de PCR cebadas con H1R/H1F de células HEK 293 que fueron tratadas de forma simulada (carril 1), o tratadas con F8R 1-2x.15 (carril 2), F8R 1-2x.27 (carril 3), F8R 3-4x.43 (carril 4), F8R 3-4x.70 (carril 5). El carril 6 contiene una PCR de control utilizando una plantilla de ADN de células humanas sin tratar. El carril 7 contiene un control negativo de PCR sin plantilla. La Fig. 8B ilustra un gel de agarosa cargado con reacciones de PCR cebadas H1F/H2/3R de células HEK 293 que fueron tratadas de forma simulada (carril 1), o tratadas con F8R 1-2x.15 (carril 2), F8R 1-2x.27 (carril 3), F8R 3-4x.43 (carril 4), F8R 3-4x.70 (carril 5). El carril 6 contiene una PCR de control utilizando una plantilla de ADN de células humanas sin tratar. El carril 7 contiene un control negativo de PCR sin plantilla. La presencia de fragmentos de PCR en la Fig. 8B es indicativa de una inversión exitosa del exón 1-22 utilizando las meganucleasas F8R comprendidas en las composiciones de la invención.

Para determinar si la escisión del ADN genómico por las meganucleasas F8R 9-10, F8R 11-12, F8R 13-14 y F8R 15-16 podría estimular una inversión de los exones 1-22, primero se transfectaron células HEK 293 con 200ng de ARNm que codificaba cada nucleasa individual y se recolectó el ADN al día 2 y al día 8 después de la transfección. El ADN se analizó por PCR utilizando el conjunto de cebadores H1R/H1F, que detecta el posicionamiento normal del exón 1-22, y con el conjunto de cebadores H1F/H2/3R, que detecta el posicionamiento invertido del exón 1-22 (Fig. 9). La Fig. 9 ilustra un gel de agarosa cargado con reacciones de PCR cebadas H1R/H1F (arriba) y reacciones de PCR cebadas

H1F/H2/3R (abajo) de células HEK 293 que fueron tratadas de forma simulada (carril 1), o tratadas con F8R 9-10x.38 (carril 2), F8R 9-10x.70 (carril 3), F8R 11-12x.56 (carril 4), F8R 11-12x.69 (carril 5), F8R 13-14x.3 (carril 6), F8R 13-14x.13 (carril 7), F8R 15-16x.14 (carril 8), o F8R 15-16x.85 (carril 9). El carril 10 contiene una PCR de control utilizando una plantilla de ADNg de células humanas sin tratar. El carril 11 contiene un control negativo de PCR sin plantilla. La presencia de fragmentos de PCR en las reacciones de PCR cebadas con H1F/H2/3R (mitad inferior de la Fig. 9) es indicativa de una inversión exitosa del exón 1-22 utilizando las meganucleasas F8R comprendidas en las composiciones de la invención.

EJEMPLO 3

Inversión del gen del Factor VIII por nucleasas F8R en células 293 y determinación de la eficiencia por PCR digital inversa

1. Materiales y procedimientos

Este estudio demostró que las nucleasas F8R englobadas en las composiciones de esta invención pueden conducir a la inversión del gen del Factor VIII específico de la hemofilia A en células HEK293. Además, el procedimiento descrito puede utilizarse para determinar la eficacia de la inversión del gen del Factor VIII mediada por la nucleasa F8R.

Se transfectaron células HEK293 (2×10^6) con ARNm (5 μ g) que codificaba nucleasas F8R11-12x.69 o F8R13-14x.13, respectivamente, utilizando un Bio-Rad GenePulser XCell de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A los 2 días post-transfección, se aisló el ADN genómico de las células y se realizó una PCR digital inversa para determinar la edición del genoma del Factor VIII. El ADN genómico aislado de células no transfectadas sirvió de control.

El ADN genómico se digirió hasta el final con la endonucleasa de restricción BclI. El ADN digerido se circularizó utilizando la ADN ligasa T4 y se analizó mediante PCR digital inversa utilizando el sistema de PCR digital QX200 de Bio-Rad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el ADN genómico humano normal, la digestión con BclI genera un fragmento de aproximadamente 21 kb que abarca la repetición int22h-1 en el intrón 22 del gen del Factor VIII, así como un fragmento de aproximadamente 16 kb que abarca una copia casi idéntica e inversamente orientada de la repetición int22h-1 situada aproximadamente 0,5 Mb corriente arriba de int22h-1.

En la PCR digital inversa, los dos fragmentos BclI circularizados descritos anteriormente se amplifican con cebadores que flanquean los sitios BclI respectivos. Los cebadores U1 y D1 se unen corriente arriba y corriente abajo, respectivamente, de la repetición int22h-1 en el intrón 22 del gen del Factor VIII; el cebador U3 se une corriente arriba de una copia casi idéntica e inversamente orientada de la repetición int22h-1 situada a unos 0,5 Mb corriente arriba de int22h-1. Todos los cebadores se unen al ADN genómico en orientación opuesta a la PCR convencional y generan amplicones sólo cuando los fragmentos BclI están circularizados.

U1: [5'-CCTTTCAACTCCATCTCCAT-3'] (SEQ ID NO: 88)

D1: [5'-ACATACGGTTTAGTCACAAGT-3'] (SEQ ID NO: 89)

U3: [5'-TCCAGTCACTTAGGCTCAG-3'] (SEQ ID NO: 90)

La PCR digital inversa del ADN genómico de HEK293 con los cebadores U1/D1 produce un amplicón de aproximadamente 0,5 kb que puede detectarse utilizando una sonda TaqMan, mientras que la PCR con los cebadores U3/U1 no genera un producto de amplificación.

Tras la inversión exitosa del fragmento genómico entre int22h-1 y su copia distal, el sitio de unión del cebador U1, que se encuentra en el fragmento invertido, se reorienta en relación con los sitios de unión del cebador D1 y U3. Ahora, la PCR U1/D1 no genera un producto de PCR, mientras que la PCR U3/U1 produce un amplicón de aproximadamente 0,5 kb que puede detectarse con la misma sonda TaqMan.

2. Resultados

El ADN genómico de las células HEK293 y de las células HEK293 tratadas con nucleasas F8R11-12x.69 o F8R13-14x.13, respectivamente, se analizó mediante PCR digital inversa. Sólo se amplificó el fragmento U1/D1 a partir de ADN genómico aislado de células HEK293 no tratadas, mientras que la PCR de U3/U1 no generó ninguna señal (Fig. 10, simulacro). Utilizando ADN genómico de células HEK293 tratadas con nucleasas F8R, se detectaron amplicones tanto de U1/D1 como de U3/U1 (Fig. 10, F8R11-12x.69 y F8R13-14x.13). El fragmento U1/D1 todavía se amplificó a partir del ADN genómico de las células HEK293 tratadas con nucleasas F8R porque el tratamiento con nucleasas generó una población mixta de células con genomas editados y no editados. Dado que la PCR digital permite el análisis paralelo de cientos a miles de equivalentes cromosómicos, se podría calcular la eficiencia de la inversión del gen del Factor VIII. Del total de genes del Factor VIII detectados por este ensayo, el 4 % y el 30 % mostraron una inversión como resultado de la actividad de las nucleasas F8R13-14x.13 y F8R11-12x.69, respectivamente.

3. Conclusiones

La PCR digital inversa detectó la inversión del gen del Factor VIII en células HEK293 tratadas con nucleasas F8R11-12x.69 y F8R13-14x.13. Además, utilizando la PCR digital inversa, se pudo calcular la eficacia de la edición. Dependiendo de la nucleasa (F8R11-12x.69), se editaron hasta el 30 % de los genes del Factor VIII detectados en las células HEK293. Es importante destacar que este estudio demuestra que las inversiones del gen del Factor VIII pueden ser inducidas por roturas de doble cadena de ADN dentro de las repeticiones int22h. Ambas nucleasas se dirigen a secuencias de reconocimiento dentro de las repeticiones int22h y pueden introducir hasta tres roturas de doble cadena por cromosoma.

EJEMPLO 4

Inversión del gen del Factor VIII por nucleasas F8R en células T humanas primarias y determinación de la edición por PCR de larga distancia

1. Materiales y procedimientos

Este estudio demostró que las nucleasas F8R abarcadas por las composiciones de esta invención pueden conducir a la inversión del gen del Factor VIII específico de la hemofilia A en células T humanas normales de tipo salvaje. Se transfectaron células T humanas normales (1×10^6) con ARNm (1 µg) que codificaba la nucleasa F8R3-4x.43 utilizando un nucleofector Lonza 4D según las instrucciones del fabricante. A los 3 días post-transfección, se aisló el ADN genómico de las células y se realizó una PCR de larga distancia para determinar la edición del genoma del Factor VIII. El ADN genómico aislado de células T humanas normales no transfectadas sirvió de control.

En esta PCR de larga distancia, el ADN genómico se amplificó entre los cebadores FWD1/REV1 y FWD3/FWD1, respectivamente.

FWD1: [5'-CCCTTACAGTTATTAAGTACTCATGAGGTTTCATTCC-3'] (SEQ ID NO: 91)

REV1: [5'-CCCCGGCACTTGAAAGTAGCAGATGCAAGAAGGGCACA-3'] (SEQ ID NO: 92)

FWD3: [5'-ACTATAACCAGCACCTTGAACCTCCCTCAT-3'] (SEQ ID NO: 93)

Los cebadores FWD1 y REV1 se unen corriente arriba y corriente abajo, respectivamente, de la repetición int22h-1 en el intrón 22 del gen del Factor VIII; el cebador FWD3 se une corriente arriba de una copia casi idéntica e inversamente orientada de la repetición int22h-1 situada aproximadamente 0,5 Mb corriente arriba de int22h-1.

La PCR de larga distancia del ADN genómico humano normal con los cebadores FWD1/REV1 produce un amplicón de aproximadamente 10 kb, mientras que la PCR con los cebadores FWD3/FWD1 no genera un producto de amplificación.

Tras la inversión exitosa del fragmento genómico entre int22h-1 y su copia distal, el sitio de unión del cebador FWD1, que se encuentra en el fragmento invertido, se reorienta en relación con los sitios de unión del cebador REV1 y FWD3. Ahora, la PCR FWD1/REV1 no genera un producto de PCR mientras que la PCR FWD3/FWD1 produce un amplicón de aproximadamente 9,7 kb. Los fragmentos de la PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizan con bromuro de etidio.

2. Resultados

El ADN genómico de células T humanas normales y de células T humanas normales tratadas con la nucleasa F8R3-4x.43 se analizó mediante PCR de larga distancia (Fig. 11). Sólo se amplificó el fragmento FWD1/REV1 a partir de ADN genómico aislado de células T humanas normales no tratadas (carriles 2 y 5). Utilizando ADN genómico de células T humanas normales tratadas con nucleasas F8R3-4x.43 como plantilla de PCR, las combinaciones de cebadores FWD1/REV1 y FWD3/FWD1 producen sus amplicones característicos de ~10 kb y ~9,7 kb, respectivamente (carriles 3 y 6). El fragmento FWD1/REV1 puede seguir amplificándose a partir de ADN genómico de células T humanas normales tratadas con F8R3-4x.43 porque el tratamiento con nucleasas generó una población mixta de células con genomas editados y no editados.

3. Conclusiones

La meganucleasa F8R3-4x.43 fue capaz de generar una inversión del gen del Factor VIII en células T humanas produciendo una rotura de doble cadena dentro de las regiones int22h, y esta inversión pudo ser detectada por PCR de larga distancia.

EJEMPLO 5**Reversión del gen del Factor VIII por nucleasas F8R en células T primarias de pacientes humanos y determinación de la edición por PCR de larga distancia****1. Materiales y procedimientos**

Este estudio demostró que las nucleasas F8R englobadas en las composiciones de esta invención pueden conducir a la reversión de la inversión del gen del Factor VIII específico de la hemofilia A en las células T de pacientes con hemofilia A.

- 5 Las células T de pacientes con hemofilia A (1×10^6) se transfectaron con ARNm (1 μ g) que codificaba las nucleasas F8R3-4x.43, F8R11-12x.69 o F8R15-16x.14, respectivamente, utilizando un nucleofector Lonza 4D según las instrucciones del fabricante. A los 3 días post-transfección, se aisló el ADN genómico de las células y se realizó una PCR de larga distancia para determinar la edición del genoma del Factor VIII. El ADN genómico aislado de células T de pacientes transfectadas con ARNm que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) sirvió de control.

- 10 En esta PCR de larga distancia, el ADN genómico se amplificó entre los cebadores H1U/H1D y H3D/H1D, respectivamente.

H1U: [5'-GCCCTGCCTGTCCATTACACTGATGACATTATGCTGAC-3'] (SEQ ID NO: 94)

HID: [5'-GGCCCTACAACCATTCTGCCTTTCACTTTTCAGTGCAATA-3'] (SEQ ID NO: 95)

H3D: [5'-CACAAGGGGGAAGTGTGAGGGTGATAAGAA-3'] (SEQ ID NO: 96)

- 15 Los cebadores H1U y HID se unen corriente arriba y corriente abajo, respectivamente, de la repetición int22h-1 en el intrón 22 del gen del Factor VIII; el cebador H3D se une corriente abajo de una copia casi idéntica e inversamente orientada de la repetición int22h-1, situada aproximadamente 0,5 Mb corriente arriba de int22h-1.

- La PCR de larga distancia del ADN genómico humano normal con los cebadores H1U/H1D produce un amplicón de aproximadamente 12 kb, mientras que la PCR con los cebadores H3D/H1D no genera un producto de amplificación. Por el contrario, la PCR de larga distancia del ADN genómico de células de pacientes con la inversión del gen de la hemofilia A con los cebadores H1U/H1D no genera un producto de PCR, mientras que la PCR H3D/H1D produce un amplicón de aproximadamente 11 kb.

- Tras la reversión exitosa del fragmento genómico en las células T del paciente entre dos repeticiones int22h orientadas inversamente, el sitio de unión del cebador H1U, que se encuentra en el fragmento invertido, se reorienta en relación con los sitios de unión del cebador H3D y HID. Ahora, la PCR H1U/H1D produce el amplicón de 12 kb, lo que indica una reversión a la configuración de tipo salvaje del gen del Factor VIII. Los fragmentos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron con bromuro de etidio.

2. Resultados

- El ADN genómico de las células T de pacientes con hemofilia A tratados con ARNm que codifica las nucleasas F8R3-4x.43, F8R11-12x.69 o F8R15-16x.14 (o GFP como control) se analizó mediante PCR de larga distancia (Fig. 12). Sólo se pudo amplificar el fragmento H3D/H1D a partir del ADN genómico aislado de células T de pacientes tratados con ARNm de GFP (carriles 1a y 1b). Utilizando ADN genómico de células T de pacientes tratados con nucleasas F8R3-4x.43, F8R11-12x.69 o F8R15-16x.14 como plantilla de PCR, las combinaciones de cebadores H1U/H1D y H3D/H1D produjeron sus amplicones característicos de tipo salvaje (~12 kb) y de inversión (~11 kb), respectivamente (carriles 3a y 3b): F8R3-4x.43; carriles 4a y 4b: F8R11-12x.69; carriles 5a y 5b: F8R15-16x.14). El fragmento H3D/H1D seguía amplificándose a partir del ADN genómico de las células T de pacientes tratados con nucleasas F8R porque el tratamiento con nucleasas generaba una población mixta de células con genomas editados y no editados.

3. Conclusiones

- Las meganucleasas F8R englobadas en las composiciones de la invención fueron capaces de inducir una reversión del gen invertido del Factor VIII a una configuración de tipo salvaje en células T de pacientes con hemofilia A in vitro, y esta reversión pudo detectarse mediante PCR de larga distancia.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Jantz, Derek Smith, James J. Bartsevich, Victor Beard, Clayton Nicholson, Michael G.

<120> NUCLEASAS DE INGENIERÍA ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA A

<130> 2000706.00182WO1

<150> 62/331335

<151> 2016-05-03

<160> 96

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 163

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

5

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Trp Arg Leu
100 105 110

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

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

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

Ser Ser Pro

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Chlamydomonas reinhardtii

<400> 2

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly
1 5

<210> 3

15

<211> 9512

<212> ADN

ES 2 905 791 T3

<213> Homo sapiens

<400> 3

ttgaacagtc	actgagcaac	tactatgtcc	tgggttctaa	ttcaggggtg	ggcaaactat	60
agccccagaa	tttggcccat	agcctgcttt	tgtacggact	gtgagttaag	aatagttttt	120
acacgttgaa	aggattgcaa	agacaaacat	acaagaaac	aaagaagact	gtgcaacaga	180
gaccacctgt	ggtctgtaaa	gactaacaca	tttctatccc	gcccttgaca	gaaagagtct	240
gtgggctgct	ggtctcctct	aacggtggtg	gagatgcctg	cacggttaac	attaatcctt	300
ggcaccagaa	tcctcagcac	ctaggaacca	gatcttgcc	aacacgctaa	tttcagtctt	360
gaccaccttc	ctccggcgta	gcggttctca	aacgtctttg	tctttgtact	attcacgtat	420
aaaatattct	ttcataagca	acatttatcc	ttttgggaat	acctcacaat	ggggagaagg	480
ggaaccccaa	cagcctttaa	gggttcactg	cttcgctgcc	accatttccg	acgggtttaca	540
ctgttttaag	tgtgaatttg	gaattgtttt	caagttaaaa	agcaaaactaa	tcatgtcctc	600
tgaaagtatt	tgcttttggc	atgctagaaa	tcagtgttga	cttttgatac	tgatgtgata	660
cattacgagg	gaattctcaa	aactgctgaa	atctggcctc	ggcccagtta	tcactgctct	720
taagcttctg	agggagatac	atgaatgagc	ccacggcaaa	tggaaaacga	ggagttttag	780
tgtttcctag	aattatgctc	agatacccac	tacctgaccg	tctggttatc	cttcccctca	840
cctccctgac	gcaaggagtt	tggaccagag	gcctaaggag	gcttctcctg	aagcccaa	900
cccaaactgg	tcaccagtca	tgctccgtaa	ctcctgaacc	tgacaagaag	ccagccggcc	960
aggtctgcag	cccgggttaa	gaggagcata	ccaggaaaga	gccaagagc	aaaggagcat	1020
gagcccttca	accgctttta	caataatttg	ggctaggcgt	tcagggctcc	gtaggaccct	1080
tcctggcagc	caagtgagag	aaagaggaat	gatggtggaa	tgggcctctc	ctgtgcttcc	1140
cattacttcc	acactgtcga	aatagaaata	gaagcagaaa	agaacaccct	acaagtccca	1200

ES 2 905 791 T3

cccatttga	ggcactcaac	tcacagtga	aaccctccac	acctctcccc	tgcaaaaaga	1260
cgcaaaaaca	aaacacctac	tccaaactgt	gtccttacat	ctcagccccg	aagatcagga	1320
ttgtgtgcaa	cttcggccca	aaggatgcat	ttccccagg	ttgaaagttt	gagaaagagg	1380
ctatatctg	aagagttctt	gttgcacca	tcaaaaggat	taaaaagacg	caataaataa	1440
gaaaacagcg	tagttggggg	gcatgctcca	tttgagccag	aaagccttgg	aaacttaagt	1500
gttctcaaac	ggaacgccat	cctgcttttg	gggaacacgg	aggctgcctt	gcagtcacgt	1560
gatcgacaa	caccaaagg	ccacgcactc	tgatttcacc	tacttaacta	aaagttgcag	1620
caaaatccct	attacaggcc	aggcgtggtg	gctcatgcct	gtaatcccag	cactttggga	1680
ggccgaggag	ggtggatcat	ttgaggtcag	gagttggaga	ccagcttggc	caacatggtg	1740
agaccccatc	tctattaaaa	atacaaaat	tagcccagcg	tggtggtgca	cgcctgtaat	1800
cccaggcacc	ctggagggtg	aggtaggaga	atcgcttgaa	cccaggaggc	ggagggtgca	1860
gtgagccgag	atcacgccac	tgcgctcctg	cctgggcgac	agagtgagac	tccatctcgg	1920
ggaaaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaaatcc	ctattacaaa	taaaagctgt	tgtgatccag	1980
actgcatata	cctctgcgaa	tggaaccaga	accgtgaatt	ccaatgcaa	tcgatgcac	2040
ggcaccagac	ccgctgcact	ggatgtatct	gcattgcagt	caccgagta	cggagcacat	2100
catagatgat	ctctgcaggt	tcgttgccca	cataggaggc	atagcgcaa	tttcaaagga	2160
acgaatacat	cctggagccc	aaacagctat	ctggttctgc	tgctggcctc	ctgacaagta	2220
ggtaagagag	tcacatttta	tagacgacgg	acaccaaacc	cacacatgag	gagtacaaga	2280
gtagctttat	catggattta	gggctgtggt	tacaaggaa	ctgtaaggaa	taaaatgact	2340
cccatgaaga	cgtaccgtgc	ggacgagtgg	aaggagaaat	ttggccatta	caaagacaca	2400
ggaatatggt	aagaagtga	gggcaggatg	aatcatcta	gggtaggat	ttagagggag	2460
ggcgccgtgc	aaaataaaat	cctcactatg	aaacaaaggc	ggaggcagga	ggctgcgtta	2520
ggtggaagca	gcggaggaa	gagacgaaag	ggattgtcat	tttcatgtcg	tggtttttta	2580
gaagacagcc	atgtcctcta	ctctgattct	atcaaaatgt	gttctcgggg	tgctggtaac	2640
gttcagccaa	cgaaataatt	cctatggcgg	cagtaggaat	aacaaaacgc	agaagcggga	2700
acgatgtctt	tttattcctc	cccagacgca	aacgtggatg	catgaggttt	ggtaacaggc	2760
aaagtcatct	ggtaacgtg	actgatgcaa	aaagtccagg	cctgggcaaa	aagaagtcac	2820
tgggtgaatg	ggatggatca	gactccctgt	cctgaggggg	agatggtttc	ttgcagaacg	2880
aggtgaagga	ggtggttctg	ctcagcagtc	aacagtggcc	acatctccac	ctgcagcgac	2940
ttgatggctt	ccgtgtcctt	ttcgtgggta	gccatgacca	aagactggag	cagcagaaag	3000
agctcctcgg	gaagctggcc	gctgctctcc	tgcccgtggc	tgtcaaaagc	ctcccaggag	3060

ES 2 905 791 T3

tactttctcca	gggtctgggc	gtgctccggc	agcagcttgg	cgggcggtgg	ttgcaggagg	3120
agcagcagca	gcacgcggga	cacctcgag	cggaccagca	cgtccgagaa	ggcgcccagg	3180
gcggcgggag	agggcgccgc	cgagccggag	ttcggaggaa	gcagcgccgc	cggtagggcg	3240
ggcgtcgccc	cgggcccggg	ctggggtgcc	ggcgccgggg	gcggcgccag	tgactgcacc	3300
gggtggctgc	cgtgctcccg	cgccaggcgc	tgcatgcgcg	tgaagaccgc	cagggcgccg	3360
gtgtagtcgc	gcgccagcag	ctggcaggag	gcggcctcgc	caagcgctg	cagcgcgccc	3420
aggggcagct	ggggcagctg	gagctggggc	gcgcgctgga	agtgaaccgc	ggcgccggcc	3480
ggctggccca	ggtcgccgag	ggcgccggcc	agctcgaggc	agagggcgcc	ggcgccggcc	3540
ggctggccca	gctcgagggt	cagacgcacc	gcggcgccca	ggcgctggc	ggcgccctgc	3600
agcggtcccc	cgtaggcgcc	ggggcagacc	agcgctggc	gcgcgtcgcg	ctcctgccgc	3660
aggaagaggc	gggcggcctc	ggtgagggcc	agcgccctcc	cgggcccgtg	gaagagcgcc	3720
tgctggcagc	gcgccaccgc	cagctggcac	caggcccggt	agggcagaca	ctcctgggcg	3780
cgcagctccc	ggcccagctg	tccgaactgc	tcgccggcct	ccgccacgtt	cggcttcgcg	3840
aggaaccgct	tcttcagctt	gttcgatacc	agccggtagc	gggccaggaa	gtccccggcc	3900
tcgggtcccc	ggccggcgcc	gccgcggccc	aggcctgcag	ccgctgccgc	catgctcgcc	3960
gccccaaagca	cttcccagag	cgccgcgcga	gctggcgggc	gggcgggggc	ggggcgacgt	4020
gccctgcgtc	cccctcggcg	ggctgcgcgc	gtgcccgccg	cggctcccca	gcccgagcct	4080
gcccccttgcc	ctgatgaggt	gcaaagagcg	ggatcgaggg	cggggcctgg	ccgggctgtg	4140
agcggcgtat	gcaaatacgag	ggtctcgggg	atgcggatcc	aagaccctgg	gaaggtagcg	4200
ggggcctggc	ggggcaccag	ctgctgctag	ctcggctgca	atgcaagtgg	tctaggttgc	4260
taaaggcatc	ccacagcctc	tccatctgaa	catgacccaa	acgaaactcg	tgaccctaata	4320
tccatgtctg	cgcattttcta	gactgttgtc	cccccccccc	cccgccccga	ctactcagtc	4380
ctcgtctctc	cgggtccaggg	ccccttgcca	agcaccgggt	ccacctctcc	gtccccaccc	4440
cggttgcctt	agaagtccgt	cctgtcgcaa	cactgcagtc	atggtcttga	ggcccaccgc	4500
ccccaacgaa	caccatcatg	ctgaggactt	tcccgggcag	gccctgactt	gctcagaacc	4560
agcgggggtg	tccccttccc	accaggggcc	actcccctgc	actgtcacc	ggagagactg	4620
ctcctctgtg	ccatccctgg	ctcccaccca	acccagacc	cccaccacct	ctccatccct	4680
ccagctgtgg	aggtctcaca	accccccaac	ccatctcacc	gccccccac	ccccaccca	4740
aggcaaaagt	actgaagcgg	gcagatggct	tccttgaaac	atctttattga	cagaattaata	4800
gaaggcccaa	gactttgggg	cctgggttgt	ggggggaggg	tgtttaaggc	cgggggttca	4860
ggccggggga	tttgggggcg	ggtgggtgga	cgagtggacc	tgtcagggtcc	cagggggccg	4920
gtgtcagaag	ctagtcctcg	ccaggggcca	cttgagagat	ggtgggtcgtg	ttgaaaagg	4980

ES 2 905 791 T3

tgctcagtag cctgtcgttg tgaaccacca tgtccagcag caggggagtg atgttccgct	5040
ctccgctggt ctgggcctcg ttgcccgcca gctccgggac cttggccgtc aggtactcaa	5100
taaccgcagc gaggtagacc ggcgccgtgc gactcaggcg ctgagcgtag tggccctccc	5160
gtagactgcg ctccacctgg ctactgaaa acgaaagctc cgctcggacg gtgcgagagc	5220
aggtccgccc ccggccgcca gcaccggagg accctcggcg tctcctctc ctccggcatgc	5280
tgggcgttga gtgtgctatc tcggcttggc ccagctaggc aagatggctc tcaagaggac	5340
agttaccgcg tccagtactg tgtatcctag cgaccagggc ccagcccctc attggctagg	5400
gagccgagac caatgggcac gcacatccgg cgacgggcac gcatgtggtg acggcccctc	5460
acaagggaca cacgtccgtc aggtgacctc atcactttcc cattggcctc gagggagcag	5520
gcctgggcct agaagtggct ggagggccgt ggggggtggg tggggcgggg cagggggaat	5580
cgcgctggtg accctctctt tgccagtggg aactttccct ttctactgga tgggaacacc	5640
gtgggaaaga caaagggtg ggcgagggga ggacgggtac cacgccttca caatgttgca	5700
catccatcac gaccacctag ttccaaaacg ttttcaacac cccgaaaaga aaccgaaacc	5760
cctgtaccta taagcagtca cttgccgcac gcctccttcc acaccaccac taccagcccc	5820
cacaccctcc cacacacacc ccctgcccc gcccatacac acgttcccg tagtccctga	5880
caaccctag tccatctgct ttctgtccat agaggtagc ctgttctgga gatttcctat	5940
agatggaatt atacgaccaa atgtgaggcc gtgtgtgtct ggctgcttc acttagcgta	6000
atggtttcat caggtgcat ccatgtagag gcatgaatca ctacttcctt cctttgaatg	6060
actgagtacg attctgttgt atgaatagga ggccacattt tgtttaccca ctcgctagtt	6120
gatggacagg ttatttcccc cttctggcta ttgtgagtgg cactgccatg accatctctc	6180
tacaggtttt tctttgaata tctcttttca gttcttttgg gtctatttct agcagtcaaa	6240
ctgctggctc gtgtggtaat tctgtttaac ttattgagga accaccaaac tgatttccac	6300
agcagctgta atctttcgca ttcccaacag tagtgcatga gagtcccaat ttcttcacag	6360
cctcatcaaa acctgttttc tgtttgcctc attttgtttt gtttacagta gccatcctac	6420
tgggtgtcaa gtgctatctc atggtgggtt tcattcgtat ttcccaaag gctaataatg	6480
ttgctgtggt ttgagtgcac ccccaaatt gtgtgtcttg gaaacttaat ccccaaattc	6540
acatgttgat tggaggcgca gcctctgaga cggttaattag gattagataa ggtcatcggg	6600
gtgagacccc caggatgcga ctggtggctt tataagaata ggaagagagg cctgaaacga	6660
catacacgct cttgccctct cgccgtgtga taccctctgc cgtccccaga tgccgggtca	6720
cttcccagtc ccagaaacg taagaaataa atttcttttc ttataaatt gttcagtgtc	6780
gggtattcaa ttatggcaac agaaaacaga ctaagacatc ttttcatgtg cttcttggcc	6840

ES 2 905 791 T3

ctctgtacct ctgcttttga ggaatgtcta ttcaagccct ttgcccattht tttaattcgg	6900
ttgattgtat tttggctgtg ggcttctaaa acttattcat atattctgga aaatagactc	6960
ttatcagata tgtgacttgc aaatgtttct cccattcact ttctggatag agccctttgt	7020
tgcccaaaag atttacattht ggatgtagtc caacttgcca aatgaaaaga tatctgtggc	7080
tttgcccttg gtgtcatact gaaggagctg ttgcctaata caaggctgtg caaagttaca	7140
tctccgtttt cttcttagag ttttatagtt tcagccctta catthtagatc tgtgatccat	7200
tttgaattaa ttctttacat gatgtgaggt aggggtccag gggccttctt ttgcatgtgg	7260
ctatccagtt gtcccagcgc agtttgttga ggggattatt cttccctccc acccattgag	7320
gggtgccgga actcttactg aaaataaact ttacataaat atatgggttt attcctgact	7380
ctgagttctg taacattgac ctaatgtatc gatcacgatg gcagtaccac ctttttcgga	7440
ttactgcggt tttgtagtac gttttgaaat tgggaagtgt gagtccctca actttttct	7500
tttctgagat tgttttggct atctgagccc cttacattht cttatgaatt ttaggatcag	7560
cttgtcagtt tttacaaaga aggcaggttg gattctgaca ggcatcacga tgaatctgta	7620
tattgccttg gagattatgg gcactctaac aatattaagt gtcccaatcc gttaacacaa	7680
aatgcctttc gatttattht ggtcttcttt aatttattht agcaacgtct tgaatttttc	7740
agagtataca tcttgtacac ctttagthta atthattcct cgacatthta ttgtttcgat	7800
gctactgtaa aatgaatcat ttccttaata ttatthtcat gttattcatt gctagggtgt	7860
agaaatacaa ccgactgttg cagattgatc ttggatactg caactttgct gagccgaata	7920
tgctttgctg agcatactca gacagggttg gcatattagt ccgttcctac actgctataa	7980
agaactgcct gagaatgggt aattcctaaa gaaaagaggt ttaattgcct catgggtctg	8040
caggctgtac aaggcttctg cttctgggca ggcctcagga aacgtgcaat catggcggaa	8100
ggcgaagggg aagcaagcac cttcttcaca tgttggagca ggaggaagag agagagaacg	8160
cacgcaaagg gggaagcgct gcacattht aaacaatcat cagatcttgt gagcgctcta	8220
tcagaagaat agcaaggggg aagtccgccc ccatgattca atcacctccc actaggccct	8280
tccttcaaca ggtggggatt acaattcgac atgagatttg ggtggggaca cagagccaaa	8340
ccgtctcagt tttttttttt ttcttttgtt ggactcttht gtgtcctcta tataagaaca	8400
tgccatctat gcacttatga atagagatgg ttttacttgt tcctttccga tctggatgcc	8460
ttttattht ttttcttgac taattgccct gactagaact ttgagtacga tgttgagtha	8520
caagtggcat tcctgatctt agggggaaat caaccagtct ttcaccatta agtatgat	8580
tatctctggg tttttcatgg atgccctcta tcagggtgaa gaagtttctt tctgttctg	8640
gtttgttgaa tttatthtca tgaaggggta ctgcgttttg tcaaataatc ctttttgtac	8700
atgattaaga tgaccatgag cccctcccc cgcccccgct ccgcatgca ttctgtta	8760

ES 2 905 791 T3

atggtgtatt atataaattg attttcacat gttgaaccaa ccttacattt gtgggataaa	8820
tcctatatttg tcatagtgt taaagagtgg tcaataaaca tttcgttgaa agaataggag	8880
tggatctggc aagcttcttg gaggacaatg tgtgtgttaa agaactgtga gcatgatgag	8940
aagccaaggc accggtggga ggaggggagt tgcaaccaat tcattaaggc tggagagtac	9000
gatgccagtg gagcagtagt ggttgatgtg gctgggaaag aggtaggcag gagccaagac	9060
atggaggttc tattatgcc tgcctcaggtt ttagaatacc ctgtaggcta cactgaaccc	9120
actgtggtct ttcagcttg gagtgacgtg gtctgatttg cctctagaaa tatcaccctg	9180
gaagctgtgt ggagaataga acagagagga ttgtgtgtgg agaatagaac agagaggact	9240
gagattggaa ttgaaagct gctgtattat accagtcaag aaatgacaga tatctcaact	9300
aagacaatgg cattggtaga taagactagg ggacagagtc cataaaaagt ttaggtagta	9360
aaatggcaca cagtagacac tcaactacata ttactcatac tggcgaacct agctggagac	9420
atgataattc atgtgctcat tcttcaaaaa atattgaagg gtagtgccag gtatactgtg	9480
ttaagcattg agacaacacc aacgagaaat at	9512

<210> 4

<211> 13008

<212> ADN

<213> Canis lupus familiaris

<400> 4

aagattttat ttttatattt ttgaaagaga gcatgagggg atccctgggt ggctcagcgg	60
tttagcgcct gcctttggcc cagggcgtga tcctggagac ccgggatcga gtcccacatc	120
aggctccttg catggagctt gcttctccct ctgcctgtgt ctccacctct ctctgtgtgt	180
ttctcatgaa taaataaata aattttcaaa agagagagag agcatgagta agaggagag	240
ggagagatag agaactctaa gcagactctg tgctgagcag gaacccaaca cagggctcaa	300
tcccacgacc ctgagatcgt gacctgagcc aaaaacaaga gtcagatgct taaccaactg	360
agccacccag gcgcccctgg agttgttttc taactcatta atttctgttc aaaactttta	420
aattttcttt tactttcttt cggttttgtc tttcctaaaa catggagttg aatgactagt	480
tcatttatatt tcagtctttc tcattcagta tgataaaaga gttaactact ctcatgaagg	540
tcattcattt aataaacagt tactgagtaa ctgctatgtt ctagattcta gtacagagat	600
ggggaagcta gagcccatcc ttgaatttg actaccactt gcttttgtac ggactgtgac	660
ttaagaatgg tttttacagg tttaaagttg caaaaacaaa cattatgcaa cgaagatcat	720
ttgtggcctg aaaagactaa aatattgcc tctggtcctt tacagaaagt ttgcagactg	780
ctggtctggc ctaaaggcag tagagatgcc taggcagtgc catgaagcag gactcttcat	840
ccccacagct tgcctaattg gcagatttca atcttagtca tcgtcccca gtgtagtgat	900

ES 2 905 791 T3

tctcagatgt ttttatatct ttgttttgct cacagacaaa atcttgttca tcagagatat	960
ttcttatcat ggatgtccca cataaagagg gagaggggaa cctttaagga ccacagctac	1020
actgccaccg ttctcaatag tgtagaataa tgtaaattgtt aactttttta tttttttaag	1080
atttatttat tcacgaaaga cacagagaga gaggcacaga cagaggcaga gggagaagca	1140
ggctccatgc agggagcccg acatgggact ccatcctggg gccccagcat cacgccctgg	1200
actaaaggcg gcgctaaacc gctgagccac ctgggctgcc ctaacttttt tattttttaa	1260
aagattttac ttatttatcc atgagagaca cagagaggca gagacacagg cagagggagg	1320
agcaggcttc atgcagttag cccgatgcgg gactcgatcc caggacccca ggatcatgac	1380
ctgagccaaa ggcagatgct cagccactga gccaccaggg tgcccctgta tatgttaact	1440
ttgatataat aatgaacatt tcagtgtgtg ggctttttct ctctggtttt caagttaaaa	1500
agaagagtat ttttaattgc ctttaaaaat atttattttt ggttgtgtta gaaatcagt	1560
ttattttgac ataaagttga taattaccaa gggatttgtc aaagcctatg aaaattgcag	1620
aaatctagcc ttagcccgac tatctatgct ttgaagtctc tgagggagag ctataaagga	1680
gccaatgaca aatggaaaac aactttcatg ttttctaaaa ttatacttgt ataccaaca	1740
ccaggctctc tggcaaacc tccctctac atcctcaatg caaggagtta gaccagaggt	1800
ccaagggtgc ttttccttaa gcccaaacc aaatactgcc accagtcaca tatcaaaact	1860
cctatacatt gttgtttag tgatgtgatt tgaagttagg tttgggagcc aatggcgaag	1920
aattcttgag actttttcag tgcaaaaaat gctgttttaa ttacagcaca gggacaggac	1980
ccatgggagc aaagacctgc actgggggtg cgaggagtgg ctgattatgt aagattttcc	2040
atcctatgga ggggaggggt atgttaagggt ccaggaaaat tgagtatagg gttcgggagg	2100
tctggctatt gatgattgct tttttcctt gtaaatacatt aagacagttg caaactgatg	2160
gaagattcat gtcgtgcatg actgtgatct ctgtcagtta agcatttggt tttccccttc	2220
ctttgctctt gggcagccag gagtgcctgc acaacatcac acctttccca cctggtgggt	2280
ggggtgggag gggggcagtt gttgcggagt attagcgtgt gctttaccct cagcttgctc	2340
tttgctccct catcaataag actactggcc agactgaggg gggcacttga cgggatgagc	2400
actgggtggt actctagatg ttggcaaatt gaacaccaat aaaaaataaa tgtataaaaa	2460
aaaaaaagac tactggccag gcctgtagcc cgggttgaga gtataccaag aaaagtaaaa	2520
ctgcaaagga ccatgcaccc taaccacttt ttttaaaaaat gtttttcaaa aattccagta	2580
taattaatgt agtgttacat tagtttcagg tgtacaacat ggtgactcaa cacctctata	2640
catttcccag ggctcatgat gattacgtgc actcttaatc cccatcatgt atttcaccca	2700
tccccacacc tacaccccat ctggtgacca tcagtttctg gtctatattt aggagtctgg	2760

ES 2 905 791 T3

tttttttattc	tctttttttt	ctttcatctt	ttgtttctta	aattccacag	gagtgaatc	2820
atacagtatt	tgtctttctc	tgacttattt	cacataacat	tatacattct	agatccatcc	2880
atgttgcaaa	tggcaagatt	gaattctttt	tcagggtcca	aaaatactcc	attttgatc	2940
tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tcttgatcct	ttcatctatg	3000
gacacttgga	ttgcttccat	atattgactg	ttgtaaataa	tgctgctgta	aacatagggg	3060
tgtgtatctt	tcttcgaatt	agtgttctca	ttttcgttgg	gtaaataccc	agttggggaa	3120
ttacatgggc	atatggtggg	tctattttta	atttttaaag	gaacctccat	actattttcc	3180
acagtggccg	caacagctgg	cattcacacc	aatagtgcct	gaaggctcct	ttttctccac	3240
atcctcacca	acacctgtgc	tttcctgtgg	ttttgatttt	agccattctg	acagatgtga	3300
tatctcattg	tggttttcac	ttgcatttcc	ctgatgatta	gtgatgttga	gcattctttc	3360
atgtgtctga	taccctaaca	cttttgcaat	aagttagact	aggcttttag	ggctccgaaa	3420
gacctttcca	ggcagccacg	tgagtgcgca	ggactggtgg	cggagtctgt	gtcagatggg	3480
cctcttttgt	attttcttac	ctactgactg	cttccccgtt	gctgaaatgg	cggcatgagg	3540
actacctaac	cgtcccaccc	atttacaggc	gcttaactca	cggtgaccac	cgcctacaca	3600
tcccccaaca	cacacacaca	ctaaaggcaa	aacagaactg	cccaaccgca	tccttaaacc	3660
tcaccccacc	agatcagttc	cgtacacagc	ctcaggctaa	agggtgcatt	ttccgaaaagc	3720
agaaggactg	agaggagat	tacattctgg	agagttctca	ctggccctcc	caaaccctta	3780
aaggcaagtg	gaatgtaaaa	acacgcggct	agtaacgttt	gcacgcgaca	tttggaacaa	3840
aaagccttga	aaatgtagga	ttctgaaaca	ggatgctgtc	ctcttgggca	agaaaggcgc	3900
ggtctcgtag	accgaggacc	acgcaatagg	tcggaagcac	gctgattcaa	cacatctgag	3960
ttacctacca	gtggcgggaa	ggcgcccagg	acaagtaagt	cccagcgtgg	cccaggccca	4020
cgtctgagaa	tggaaacctag	gcccacaacc	ctgagttcca	aggcacgcca	gacacctcga	4080
cagtccaacg	tgggcccctg	ctttgcgcag	gacacattcg	ccttggcgcc	gaggaaggcc	4140
cacgcggcca	aggttgtctg	tggattgact	gtgcggcaca	gcccagagcag	caggcgcacg	4200
gaccgctgcg	agtgaacgac	cacactgcgg	ccogaagcac	agccaccgcg	tcttcccctt	4260
gctgcctccc	gacagtgga	gcagctattc	cgcgttacgg	aggaaggcga	accgcaggcg	4320
agaggcatca	gaacggcttt	attgtggatt	tagggcagca	gccccgaggg	cccgtgccat	4380
ctagtgtctc	ccaggggtac	gcgtggggcg	tgggcaacaa	aggagaacct	gggtgagcac	4440
ctggagagac	accggcctgc	gctaaagcag	atccccgacg	aacaaaaaac	ggaaccgaga	4500
ggcgtgtgca	acatccaacc	gtccgacttg	caacagaggt	gtacgggagg	gtgggggtgg	4560
gggtgggggt	gggggcccgc	aggggagttg	ggtgcaagaa	gaggccaggg	gtaaaggggc	4620
cgtcgggtgt	cccgtggccc	gtcttgggga	agagagccaa	gtcctccagg	ctgaccccg	4680

ES 2 905 791 T3

gatgctgggg	tggttgccgc	gccagggacg	gcacgaagcc	tgtgggatgc	gggaggtgc	4740
agtcccgcag	cgtccggtgg	aggcgggcgg	gcgaagagca	agacaggtgc	gagtgccggg	4800
cccctgcccg	tcggtccgtg	ggcaccgcgg	cccgcgggcc	ggccggccgg	ccggccggcc	4860
ggccccgcgt	ccaacggcgg	ggcagcagca	ggccacgggg	ccagagggcg	aaagcgctt	4920
cggggctggc	gcgcgcgagt	ggtcagacgc	cctgccccga	cggggacacg	gcttcctgca	4980
gaacgaggtg	cagcaggtgg	ttctgctccg	cactgagcag	cggccacatg	tccacctgca	5040
gcgacttgac	ggcctccgtg	tccttctcgt	gggtggccat	gaccagggac	tggagcagca	5100
ggaacagctc	gtcgggaagc	tggccggcgc	cgtcgggccc	gtggccgtcg	aaggcctccc	5160
aggagtactt	ctccagcgtg	tgggcgtgct	cgggcagcag	cttggcgggc	ggcggctgca	5220
gcaggagcag	cagcagcagc	cgggacacct	cgcagcggac	cagcacgtcc	gagaaggcgc	5280
ccagcgtggc	gggcgcgggc	gtgggcgtgg	gcgcgggcgc	ggcaggcagc	agggcggcgg	5340
gcaggggccgg	ggcggcggcg	gcggggccca	gcggggcgga	ggccgacgag	gacgaggccg	5400
aggccgacga	ggtcgaggcc	gaggccgacg	aggtcgacgc	cgccgcgggc	ggggccaggg	5460
gcagcggcgg	ggcgggcggc	ggcggggccg	ggggcggtcg	ccgcagcggg	tggctgccgt	5520
gctcccgcgc	caggcgctgc	atgcgcgtga	agacggccag	ggcggcgctg	tagtcgcgcg	5580
ccagcagctg	gcaggaggcg	gcgtcgccca	gcgcctgcag	cgcggccagg	ggcagctgcg	5640
gcaggtgcag	ctgcgcggcg	cgcaggaagt	ggccggcggc	ggcggccggc	tggcccaggt	5700
cgcgcagggc	ggcggccagc	tcgaggcaca	ggccggcggc	ggcggccggc	tggcccagct	5760
ccaggtgcag	gcgcacggcg	gcgcccagcg	cgtggcggc	ggcctgcagc	ggctccccgt	5820
aggccgcggg	gcaggcgagg	cgtggcggg	cgtcgcgctc	ctgccgcagg	aagaggcgcg	5880
cggcctcggt	cagcgccagc	gcctccccgg	gcccgtggaa	cagcgccctg	tggcagcgcg	5940
ccacggccag	ctggcaccac	gcggcgtagc	gcaggcactc	ctgcgcgcgc	agctcccggc	6000
ccagctgcgc	gaactgctcg	cccgcctccg	ccacgttcgg	cttcgcgagg	aaccgcttac	6060
gcagcttgct	gcacacctgc	cggtagcggg	ccaggaagtc	cccggcctcg	ggccccgggc	6120
ccgcgcgcgc	gccgcgcggc	ccgcgcgcgc	cgcgcgggcc	gccgcgcggc	ccgcgcgcgc	6180
ggccgcgcgc	gcgcgcgcgc	gccatcttgc	ccgcacgcgc	gcacgcgcga	cgtgccgcgc	6240
tcccccggcc	ccgccccctg	cgggccccgc	ccccccgcgg	accccgcgca	tgcgtgcgcc	6300
gccccccgcc	gtcccgcggg	acggaaccga	gcgcgcgggc	cggcgcgggg	cctgggcggc	6360
cgcggccctt	ccgaggcgac	cccggccccc	gggtcgggcc	gcgccccccg	gcccctcccg	6420
gcccctgcgc	gcccccgagc	taacgtcgcg	gcgcgcggcc	gcctggcccc	gaggccgctt	6480
ggccggagtc	aggatggtcc	ccgccccccc	agccttccgt	caaagccctg	tcccctcgag	6540

ES 2 905 791 T3

tccgcgccgg	cacctgtgtc	ccccaacagt	ccgcgccggc	agctgtgtcc	ccccattcac	6600
tccgcgccgg	cagggtgtgtc	cccctccatc	ccgcagccag	gttggttactg	caccggcggtt	6660
caccccatca	ccacgccgca	ggcatggtcc	tgaacctcag	ccccacacac	accatcgtcc	6720
acgggactgg	cccgtgcggg	gggggggggt	cttctatgcc	ccagcgtcac	tcccagccca	6780
gccaccccct	gtcctgaccc	cgagcagtcc	ccgtccccgc	acccagccg	gacccacca	6840
ccaccccctg	acccagccg	gaccccgcca	cagccccctg	ccctgcaccc	caacaatgct	6900
ccggaccgca	tgaccgaacc	ccgcaccaca	cccacgaacc	cgcgccccac	gccacacccc	6960
aaatcctcca	tcacccccat	cgtgcaccgc	cgagggcacc	ccaaccccc	gtcatccccg	7020
agccccgcac	ccccaccca	acctcgccca	caacccccaa	ccccaacctc	ccccccgcc	7080
ccccccgcc	tccccccgag	gcgcgtcccc	caccagtgca	gccaggcgca	cacgtctggt	7140
tgtctctgcg	ccttttattg	cggggacgcg	ggggtcaccg	agcccccccg	gcggctcccc	7200
gggcggcgcc	gggcatcagg	ggccgggggc	ggctagtacc	gggcgggggc	cacctgggac	7260
acggtggtca	tcgtgaacaa	gccgctgagc	agctcgtggt	tgtgcagcgc	ccggtccacg	7320
agctccgggg	tgatgtacgc	ggtgcgcctg	tgccgggcct	cgtcgccccg	cagccccagc	7380
acggtgggcg	tcaggaaactg	gatgacggcc	gccagggaaga	tggggggcga	cgcgcccagg	7440
cgcttggcgt	agcggccggc	ccgcaggagg	cgtccatct	ggcacacgga	gaaggccagc	7500
cccgcgccgg	cgctgcgcga	gcggcacgac	ctcgggcggc	cgccccgcc	tccacggctc	7560
cccctgagcc	gcgcgcgggg	cctcggcggc	gctcggcgcg	gggcctcggg	ctgcggcccc	7620
gctgcggccc	ggctggggac	gctcgggcgt	cgggcccgcg	agccacgggc	ctcgggctgc	7680
ggagaccccc	ggctgcggac	gctcgggcgt	cgggcccgcg	agccacgggc	ctcgggctgc	7740
ggagaccccc	ggctgcggac	ggtcgggcgt	cgggcccgcg	ggacatgggg	cttgggctgc	7800
agagacatcg	ggctgcggac	agagagacac	cggcctcggg	ctgcggagag	acggggcaag	7860
ggctgcagac	agacgggcct	caggctgcag	agagaccgac	ctcgggctgc	agagagaccg	7920
aactcgggct	gcagagtgtc	tgacctcggg	ctgcagagac	cgacctcggg	ctgcggagag	7980
acgggcctcg	ggctgcagaa	agtccgacct	cgggctgcag	agaccgacct	caggctgcgg	8040
agagacgggc	ctcgcgctgc	agagagaccg	acctcgggct	gtagagagac	tgacctcggg	8100
ctgcagagac	cgacctcggg	ctgcagagag	tccgacctcg	ggctgcagag	agtccgacct	8160
cgggctgcag	agagacgggc	ctcgggctgc	gctgccgaaa	cagcgtcggg	gcgcagagag	8220
gagcgccggg	gtgcaccgcc	gtgcggcgcg	ctgggcccgc	tgaccccag	ccctcagcag	8280
cgggcgagga	ggccccgctc	cgtatccgag	ggacacaccc	cctccccgcc	ccgctgcgca	8340
cgcggtgaca	cgcaggcctg	atgaggtcac	cgcgtcccca	ttggcccggc	ccggccctcg	8400
cccgccagaa	aagccgctgg	cgggaagtgc	ctggctctgc	gcgcgcgga	cggcatgggg	8460

ES 2 905 791 T3

cgccaccgac	gagcgtgcag	gagctcgcgc	gccccacgt	gcacccccga	catgtcggcc	8520
ctctcggctg	cacacgcggc	accgccccgc	acagacggcc	cgcccgccgc	gcgctcactg	8580
ccccctgcac	cccgctctgc	ccccggggac	cgaccgctcc	tcggcctcct	gtccctgccg	8640
cttgccgtcc	gctggacacc	tgctgcaggg	gccaccctgg	gaccagtagg	tggccgtgtg	8700
cgccggccgc	gttcctctcg	caccgtgttc	tcaggagggc	tgttctctga	gggagcggga	8760
accggggctc	ctccccccga	gagagcagga	atcggggccc	tccccctgag	ggagcaggaa	8820
tcggggcacc	cccccccagg	gagcaggaat	aacggcctct	tcccccccc	caggagcag	8880
gaatcggggc	ccctccctc	aaggagcag	gagtcgggg	ccctccccc	cgagagagca	8940
ggaatcgggc	ccctccccc	gaggagcag	gaatcgggg	ccctcctcc	gaggagcag	9000
gaatcggggc	ccccccccc	ccaggagca	ggaataacg	cctcttccc	ccccccccc	9060
cgggagcagg	aatcggggcc	cctccctcg	agggagcagg	aatccgggac	cccccaaggga	9120
gcgggaattg	gggtccctcc	gcccagggga	gcaaaagacg	gacctcgggc	tgcagaaaga	9180
cggacctcgg	gctgcggaga	gaccgacctc	gggctgcgga	gagaccaacc	tcgggctgcg	9240
cttcgaaag	acggcgtcgg	ggcgagaga	ggagcgccgg	ggtgcaccgc	cgtgcggcgc	9300
gctgggcccg	ctgctcccga	gctctgagca	gcgggagagg	aggccccgct	ccgtataaaa	9360
gcgacacccc	ctccctccc	cgctgcgcac	gcggtgacac	gcagatctga	tgaggtcacc	9420
gcgtcctcat	tggcccggcc	ctcgcccgcc	agaaaaggcg	ggaagtgcgt	ggctctgcgc	9480
cgcgcggacg	gcatggggcg	ccaccacga	gcgtgcagga	gctcgcgcgc	ccccacgtgc	9540
acccccgaca	tgctggccct	ctcggtgca	cacgcggcag	cgccccgcac	agacggcccc	9600
gccgcgcgc	gctcactgcc	ccctgcaccc	cgtcctgccc	ccggggaccg	accgctcctc	9660
ggcctcctgt	ccctgccgct	tggcgtccgc	tggacacctg	ctgcaggggc	caccctggga	9720
ccagtaggtg	gccgtgtgcg	ccggccgcgt	tccctcggca	ccgtgttctc	aggagggtg	9780
ttctccgagg	gagcgggaac	ccgggtcccc	ccccccaagg	gagcaggaat	tggggtccct	9840
ccccccgagc	gatcaggaag	cggggtccct	ccaccaaggg	acaggagtgc	gggtccctcc	9900
ccccgagggga	tcaggaatcg	gggtccctcc	accaagggat	caggagttag	gggtccctccc	9960
ccaagggaca	ggagtgcagg	tccctcccc	aagggacagg	agtccggggtc	cctccgcaa	10020
gggacaggag	tcgggggtccg	tccccccgag	ggagcaggaa	taggcccccc	gaggcagcgg	10080
ggatcgccct	gcacgtccat	cgaggggcac	tcgccccac	tcgcgcgcgc	ccctggcggc	10140
gaggggcacc	tgccggcgga	cgtgcgcggc	ggcggcggcg	gcgaagggtcg	cgccggggccc	10200
ctccgggcgc	gggatggggg	gcccgcgggc	agggcgacac	ccgctgtctg	ggcagcgcgc	10260
tgaccgggcc	ccctgctccc	gccgcgcgc	cccactggcc	ctggcccgcg	cctgctcctc	10320

ES 2 905 791 T3

ccggtgcggc	ctcgcgagcc	cccgcgccgg	ctgtgccggc	gcacctggca	cctgggggtc	10380
actgtcccc	gtgtgtagg	aggggcagg	cggggcccca	gggacaggga	gctcgggcag	10440
ctgcagcccc	ctgacccggg	cccccggtga	gcctgcgggc	tcccccccg	cccccagggc	10500
tgccgacccg	agccccgggt	gcaggcgggc	gccagctga	tcccccccg	ccccccccc	10560
cccggtcgtg	gcctgtcgcg	cccccggtc	ccgagcgccg	cccccggtg	ccagcagcgg	10620
cgggtcggcg	cggcgggagc	gctgcaggtg	cgccgggacc	ggcgggggcc	ctccctctgg	10680
gtgccctcc	aggcgggccc	tgcaactcgg	ctgcgcagg	cggggcgggg	gagcttcccc	10740
gagggggtgc	ggcctgtctg	tgcctgggc	gcgactcggc	gatgggacac	gttcaggtcc	10800
tgacaccggg	gggggggggg	ggagcggggg	ggcttcccgc	gtattcgggg	cctcccaggt	10860
gactttcagc	aatgttccgt	gactttccgt	gcacacgcc	tgacgtcct	ccgtacgtg	10920
tattcctagg	gatgtaattg	cacgtgatcc	cgatttgaat	aaaattattc	aatcagttag	10980
ttaactgac	aattaatcag	tttcgtttga	ggttcgtcgc	cgctgcccg	tggaaaacc	11040
cctaatttct	gcacgttgg	ctcatatcct	gaagtttgtt	gaattcacta	actctgccgg	11100
tgtttcgtga	attcttttag	actttttctg	tgtaaagtta	tgtcatctga	gaacacagat	11160
ggttttccct	cttcctttcc	aatttaaata	ccctttat	ctttctcttg	catcattgct	11220
ctagccagga	tttccattac	aatgtcgggt	agaggcagg	aaagcgcgga	ttcttggtcc	11280
tgattagggg	aaaagcttcc	agtcctccac	cagttagtat	gaccttagct	atgggtat	11340
cataaatgcc	ctttattatg	tttggtgatt	ccccttctat	tcctagtgtg	ctgagtgttt	11400
tttgtcagga	aaaggtggat	tttagtcaat	gctttttctg	catgaatcaa	gacagtcatg	11460
tgggtttttc	cccctttatt	ttattaacgt	agagttat	tcttaagttg	aagcatcttt	11520
gtattcctcg	gacagttcct	ttttggacat	gaaatgtcac	ttttataatg	tactgctgga	11580
ttcgtctgc	taaaatcatt	tgaggatttc	tgacacctata	ttctttttta	aagatttttt	11640
aggtactatt	tgagagacca	tgaatgatca	ggggcgggag	ggagaggatg	aagcagactc	11700
cccactgagc	agggagcctg	acgcgggcct	cgatctcccg	acccgggatc	atgacctgag	11760
ctgaaagcgg	atgcttcacc	gactgagcca	ccaggcacc	gggcaaaaaca	atttcttaca	11820
acattctgca	cgatactgta	atgctgatgt	gtcatcatat	aacacacact	gattcctatt	11880
ctagtgtatt	caagcataca	caaagcctag	gagatcat	taaactttcc	gtagcctgta	11940
cgccatgggt	taaaccgagg	ccttctgagt	aggtgttcct	tttttattta	aagattttat	12000
ttattttatt	atgagagaca	cagagagaga	gagagaggca	gagaccagg	cagagggaga	12060
agcaggctcc	atgcagggag	cccagcgcg	ggctcgatcc	caggtctcca	ggttcatgcc	12120
ctgggcccga	ggcaggtgcc	aagccactga	gccccccagg	gatccctga	ctaggtgttc	12180
ctatcacatt	tctcaaaactg	tgttcccttt	cctttgaaga	tgccgtgtac	tttctctgca	12240

ES 2 905 791 T3

ccctagactg	ctcaagggtcc	gaacccccac	atgttggatg	ttaacacgtg	tottacaaat	12300
ccatacacaa	ggaatcatta	attaaagcct	cacagttcat	gcacatgtgc	acacacacac	12360
acacacagag	agagaccaca	gtcttggaag	attatcctga	ggccagggtg	gtagggtggt	12420
gcctgccagc	accctctcag	atgtggaaca	ggggccgaca	tacaggactt	ctagctacga	12480
cggttgtatg	tgagcgctgc	gtgctgtcga	gagaagcaca	aagcaaaatt	agagggaaga	12540
tgcaatgggg	agcaattgct	ttgtaccctg	tctgcacctg	gcatgtacct	gtgctaatacc	12600
ctccccacag	gtcttctttg	gcaacgtgga	ttcatctggg	atcaaacaca	atatttttaa	12660
ccctccgatt	attgctcagt	acatccgttt	gcacccaacc	cattacagca	tccgcagcac	12720
tcttcgcatg	gagctcttgg	gctgtgactt	caacagtaag	tgcccagtca	tcacgtgcc	12780
ttccgtgtcc	cagccccggg	tgggatgaat	gactgtccta	gtcttctcga	gggcagggcg	12840
atgtcccagg	acacagaacc	acgaatgcta	agagcagcgc	agtcccagc	aaacgcaggc	12900
cttggtcatt	gtaaccatgg	gattccctag	gggcagccac	ctcctccggc	actcttaagg	12960
tcaaagtgcc	cccgaactga	gaagagctga	ccagaaggcg	cggggcag		13008

<210> 5

<211> 1116

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

atggcggcag	cggctgcagg	cctgggcggc	ggcggcgcgc	gcccgggacc	cgaggccggg	60
gacttcctgg	cccgtaccg	gctggatcgc	aacaagctga	agaagcggtt	cctgcggaag	120
ccgaacgtgg	cggaggccgg	cgagcagttc	ggacagctgg	gccgggagct	gcgcgccag	180
gagtgtctgc	cctacgcggc	ctgggtgccag	ctggcggtgg	cgcgctgcca	gcaggcgctc	240
ttccacgggc	ccggggaggc	gctggccctc	accgaggccg	cccgcctctt	cctgcggcag	300
gagcgcgacg	cgcgccagcg	cctggtctgc	cccgcgcct	acggggagcc	gctgcaggcc	360
gccgccagcg	ccctgggcgc	cgcggtgcgt	ctgcacctcg	agctgggcca	gccggccgcc	420
gccgccgcc	tctgcctcga	gctggccgcc	gccctgcgcg	acctgggcca	gccggccgcc	480
gccgccggtc	acttccagcg	cgccgccag	ctccagctgc	cccagctgcc	cctggccgcg	540
ctgcaggcgc	ttggcgaggc	cgcctcctgc	cagctgctgg	cgcgcgacta	caccggcgcc	600
ctggcggtct	tcacgcgcat	gcagcgctg	gcgcgggagc	acggcagcca	cccgggtcag	660
tactgcgcgc	cgcgccgcgc	gccggcaccc	cagcccgggc	ccggggcgac	gccgcacctc	720
ccggccgcgc	tgcttctctc	gaactccggc	tcggcggggc	cctctccgcg	cgcctggggc	780
gccttctcgg	acgtgctggt	ccgctgcgag	gtgtcccgcg	tgctgctgct	gctcctcctg	840
caaccaccgc	ccgccaagct	gctgccggag	cacgcccaga	ccctggagaa	gtactcctgg	900

ES 2 905 791 T3

gaggcttttg acagccacgg gcaggagagc agcgccagc ttcccgagga gctctttctg 960
 ctgctccagt ctttggtcat ggctaccac gaaaaggaca cggaagccat caagtcgctg 1020
 cagggtggaga tgtggccact gttgactgct gagcagaacc acctccttca cctcgttctg 1080
 caagaaacca tctccccctc aggacagga gtctga 1116

<210> 6

<211> 1349

<212> ADN

5

<213> Canis lupus familiaris

<400> 6

atgcgcgggg tccgcggggg ggccggggccc gcagggggagc ggccgggggg acgcggggcac 60
 gtcgggagctg cgcgcgtgag ggcaagatgg cggcgccggc ggccgggggg ccggggggggc 120
 gcggcgccgg cgcccgccgg ggccggcgagc gcggcgccgg cgccggcgagc ggcccgccggc 180
 ccgagggcgg ggacttcctg gcccgctacc ggcaggtgtc gagcaagctg cgtaagcggt 240
 tcctgcggaa gccgaacgtg gcggaggcgg gcgagcagtt cgcgcagctg ggccggggagc 300
 tgccgcgcga ggagtgccctg ccgtacgccg cgtggtgcca gctggccctg gcgcgctgcc 360
 agcaggcgct gttccacggg cccggggagg cgtgagcgtg gaccgaggcc gcgcgcctct 420
 tcctgcggca ggagcgcgac gcccgccagc gcctcgccctg ccccgccggc tacggggagc 480
 cgctgcaggc cgcgcgccag gcgctgggag ccgcgcgtg cctgcacctg gagctgggac 540
 agccggccgc cgcgcgccgg ctgtgcctcg agctggccgc cgcctgcgc gacctgggac 600
 agccggccgc cgcgcgccgg cacttcctgc gcgcgcgcga gctgcacctg ccgcagctgc 660
 ccctggccgc gctgcaggcg ctggggcagc ccgcctcctg ccagctgctg gcgcgcgact 720
 acagcgccgc cctggccgtc ttcacgcgca tgacgcgcct ggccggggag cacggcagcc 780
 acccgctgag gcagccggcc ccggcccgcc cgcgcgccgc ccccgccgtg ccctggcc 840
 cgcgcggggc ggctgcgacc tcgtcgccct cggcctcgac ctgctcgcc tcggcctcgt 900
 cctcgtcgcc ctccgccccg ctggggcccc cgcgcgccgc cccggccctg ccgcgcgcc 960
 tgctgcctgc cgcgcgccgc cccacgcca cgcgcgccgc cccacgctg ggccgcttct 1020
 cggacgtgct ggtccgctgc gaggtgtccc gcgtgctgct gctgctcctg ctgcagccgc 1080
 cggccgcca gctgctgccc gagcacgccc acacgtgga gaagtactcc tgggaggcct 1140
 tcgacggcca cgggcccagc ggcccgccgc agcttcccga cgagctgttc ctgctgctcc 1200
 agtccctggt catggccacc cagcagaagg acacggaggc cgtcaagtcg ctgcaggtgg 1260
 acatgtggcc gctgctcagt gcggagcaga accacctgct gcacctcgtt ctgcaggaag 1320
 ccgtgtcccc gtcggggcag ggctgtctga 1349

<210> 7

<211> 22

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 7
 ccaggcgctg catgcgg aa 22
 <210> 8
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 ggtccgcgac gtacgcgac tt 22
 <210> 9
 10 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 gcagcagcag cacgcgggac ac 22
 15 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 20 cgtcgtcgtc gtgcccctg tg 22
 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 11
 caggattgg tgcaactcg gc 22
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 gtctaacac acgttgaagc cg 22
 <210> 13
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

ctgcaggctg tacaaggctt ct 22
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 gacgtccgac atgttccgaa ga 22
 <210> 15
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 ggaggacggg taccacgcct tc 22
 <210> 16
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 cctcctgccc atggtgcgga ag 22
 20 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 25 ggccgtcagg tactcaataa cc 22
 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 18
 ccggcagtc atgagttatt gg 22
 <210> 19
 <211> 354
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado

ES 2 905 791 T3

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Gly Asp Gly Ser Ile His Ala Cys Ile Ser Pro Asp Gln Ala Cys
210 215 220

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

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

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

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 20

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 20

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

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

Met Lys Phe Lys His Gln Leu Arg Leu Arg Phe Tyr Val Ile Gln Lys
35 40 45

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

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

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

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

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Val Asn Asp Trp Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile
260 265 270

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 21

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 21

ES 2 905 791 T3

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 22

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 22

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile His Ala Cys Ile Ser Pro Asp Gln Ala Cys Lys Phe Lys His Tyr
20 25 30

Leu Arg Leu Arg Phe Tyr Val Ile Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Glu Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Arg Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn

5

ES 2 905 791 T3

65				70				75				80				
Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	
				85					90					95		
Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	
				100					105					110		
Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	
				115					120					125		
Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala	
				130					135					140		

Val Leu Asp
145

<210> 23

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 23

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Thr Pro Ser Gln Val Met Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Arg Phe Tyr Val Ile Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Glu Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Arg Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

ES 2 905 791 T3

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

Val Leu Asp
145

<210> 24

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 24

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile His Ala Cys Ile Ser Pro Asp Gln Ala Cys Lys Phe Lys His Tyr
20 25 30

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

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val His Asp Gln
50 55 60

Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Gln Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

10 <210> 25

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintetizado

ES 2 905 791 T3

<400> 25

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Cys Ile Gln Pro Arg Gln Gln Ser Lys Phe Lys His Ser
20 25 30

Leu Gln Leu Trp Phe Tyr Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Thr Asp Tyr
50 55 60

Gly Ser Val Ser Asn Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Gly Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
100 105 110

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 26

<211> 147

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 26

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Cys Ile Gln Pro Arg Gln Gln Ser Lys Phe Lys His Ser
20 25 30

10

ES 2 905 791 T3

Leu Gln Leu Trp Phe Tyr Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Asn Asp Trp
50 55 60

Gly Gly Ala Ser Thr Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 27

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 27

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Cys Ile Gln Pro Arg Gln Gln Ser Lys Phe Lys His Ser
20 25 30

Leu Gln Leu Trp Phe Tyr Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Ala Gly Tyr Val Asn Asp Trp
50 55 60

Gly Gly Ala Ser Gln Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

ES 2 905 791 T3

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 28

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 29

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 29

ES 2 905 791 T3

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 30

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 30

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

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

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

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

Gly Tyr Val Tyr Asp His Gly Ser Ala Ser His Tyr Gln Leu Ser Gln

5

ES 2 905 791 T3

65					70											75						80
Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys							
				85					90					95								
Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu							
			100					105					110									
Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp							
		115					120					125										
Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr							
	130					135					140											
Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	Val	Gly							
145					150				155						160							
Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser							
				165					170						175							
Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser							
			180					185					190									
Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe	Val							
		195					200					205										
Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Arg	Pro	Ser	Gln	Thr	Met							
	210					215					220											
Lys	Phe	Lys	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Phe	Glu	Val	Gly	Gln	Lys	Thr							
225					230					235					240							
Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val	Gly							
				245					250					255								
Tyr	Val	Arg	Asp	Asn	Gly	Ser	Val	Ser	Val	Tyr	Thr	Leu	Ser	Glu	Ile							
			260					265					270									
Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu							
		275					280					285										
Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro							
		290				295					300											
Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val							
305					310					315					320							
Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	Ser							
				325					330					335								
Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Lys	Ser							
			340					345					350									
Ser	Pro																					

<210> 31

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> Sintetizado

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser

ES 2 905 791 T3

165						170						175					
Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser		
			180				185						190				
Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe	Val		
			195				200				205						
Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Arg	Pro	Ser	Gln	Thr	Met		
		210				215				220							
Lys	Phe	Lys	His	Gln	Leu	Arg	Leu	Gly	Phe	Glu	Val	Gly	Gln	Lys	Thr		
225					230				235						240		
Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val	Gly		
			245					250					255				
Tyr	Val	Arg	Asp	Asn	Gly	Ser	Val	Ser	Val	Tyr	Asp	Leu	Ser	Gln	Ile		
			260				265					270					
Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu		
			275				280					285					
Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro		
290					295					300							
Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val		
305					310					315					320		
Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	Ser		
			325					330						335			
Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Lys	Ser		
			340					345					350				

Ser Pro

<210> 32

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Sintetizado

<400> 32

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

ES 2 905 791 T3

Ile Phe Ala Ser Ile Arg Pro Ser Gln Thr Met Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Gly Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Asn
50 55 60

Gly Ser Val Ser Val Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 33

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 33

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Arg Pro Ser Gln Thr Met Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Gly Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Asn
50 55 60

ES 2 905 791 T3

Gly Ser Val Ser Val Tyr Asp Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 34

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 34

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Arg Pro Ser Gln Thr Met Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Gly Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Asn
50 55 60

Gly Ser Val Ser Val Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

ES 2 905 791 T3

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 35

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 35

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Arg Pro Ser Gln Thr Met Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Gly Phe Glu Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Asn
50 55 60

Gly Ser Val Ser Val Tyr Asp Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 36

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 905 791 T3

<220>

<223> Sintetizado

<400> 36

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Lys Ile Asp Pro Asn Gln Lys Ser Lys Phe Lys His Val
20 25 30

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

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp His
50 55 60

Gly Ser Val Ser His Tyr Thr Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

5

<210> 37

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Sintetizado

<400> 37

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

ES 2 905 791 T3

Ile Tyr Ala Arg Ile Arg Pro Asn Gln Arg Cys Lys Phe Lys His Ala
20 25 30

Leu Cys Leu Thr Phe Ser Val Arg Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 38

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 38

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Lys Ile Asp Pro Asn Gln Lys Ser Lys Phe Lys His Val
20 25 30

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

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp His
50 55 60

Gly Ser Ala Ser His Tyr Gln Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn

ES 2 905 791 T3

65		70		75		80									
Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala
			85						90					95	
Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser
			100					105					110		
Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala
		115					120					125			
Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala
		130				135					140				
Val	Leu	Asp													
145															
<210>	39														
<211>	147														
<212>	PRT														
<213>	Secuencia artificial														
<220>															
<223>	Sintetizado														
<400>	39														
Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe	Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ile	Tyr	Ala	Lys	Ile	Ser	Pro	Val	Gln	Lys	Ala	Lys	Phe	Lys	His	Val
			20					25					30		
Leu	Arg	Leu	Arg	Phe	Asp	Val	Ala	Gln	Lys	Thr	Gln	Arg	Arg	Trp	Phe
		35					40					45			
Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val	Gly	Tyr	Val	Tyr	Asp	His
	50					55					60				
Gly	Ser	Val	Ser	His	Tyr	Thr	Leu	Ser	Glu	Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn
65					70					75					80
Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala
			85						90					95	
Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser
			100					105					110		
Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala
		115					120					125			

ES 2 905 791 T3

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

Val Leu Asp
145

<210> 40

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 41

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 41

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

ES 2 905 791 T3

Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Tyr	Ala	Ser	Ile	Glu	Pro	Arg	Gln	Lys	20	25	30	
Tyr	Lys	Phe	Lys	His	Arg	Leu	Ala	Leu	Ile	Phe	Gln	Val	Thr	Gln	Lys	35	40	45	
Thr	Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val	50	55	60	
Gly	Tyr	Val	Arg	Asp	Thr	Gly	Ser	Val	Ser	His	Tyr	Ala	Leu	Ser	Glu	65	70	75	80
Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	85	90	95	
Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	100	105	110	
Pro	Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	115	120	125	
Val	Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	130	135	140	
Ser	Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	Val	Gly	145	150	155	160
Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	165	170	175	
Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	180	185	190	
Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe	Val	195	200	205	
Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Glu	Pro	Glu	Gln	Arg	Tyr	210	215	220	
Lys	Phe	Lys	His	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Ile	Val	Ser	Gln	Lys	Thr	225	230	235	240
Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val	Gly	245	250	255	
Tyr	Val	Ser	Asp	Cys	Gly	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	Arg	Leu	Ser	Glu	Ile	260	265	270	

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 42

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 42

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

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

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

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

Gly Tyr Val Cys Asp Lys Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu
65 70 75 80

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

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 43

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

ES 2 905 791 T3

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 44

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 44

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Glu Pro Glu Gln Arg Tyr Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Arg Leu Tyr Phe Ile Val Ser Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ala Asp Leu

ES 2 905 791 T3

50		55		60
Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn				
65		70		75
				80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala				
	85		90	95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser				
	100		105	110
Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala				
	115		120	125
Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala				
	130		135	140
Val Leu Asp				
145				
<210> 45				
<211> 147				
<212> PRT				
<213> Secuencia artificial				
<220>				
<223> Sintetizado				
<400> 45				
Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser				
1	5		10	15
Ile Phe Ala Ser Ile Glu Pro Glu Gln Arg Tyr Lys Phe Lys His Arg				
	20		25	30
Leu Arg Leu Tyr Phe Ile Val Ser Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe				
	35		40	45
Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp Cys				
	50		55	60
Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn				
65		70		75
				80
Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala				
	85		90	95
Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser				
	100		105	110

ES 2 905 791 T3

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 46

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 46

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

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

Leu Arg Leu Trp Phe Val Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ala Asp Leu
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 47

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 905 791 T3

<220>

<223> Sintetizado

<400> 47

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Glu Pro Glu Gln Arg Tyr Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Lys Leu Gln Phe Glu Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Asn
50 55 60

Gly Ser Val Ser Phe Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

5

<210> 48

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Sintetizado

<400> 48

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

ES 2 905 791 T3

Ile Tyr Ala Ser Ile Glu Pro Arg Gln Lys Tyr Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Ala Leu Ile Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Thr
50 55 60

Gly Ser Val Ser His Tyr Ala Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 49

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 49

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ser Ile Glu Pro Arg Gln Lys Tyr Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Ala Leu Ile Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Thr
50 55 60

ES 2 905 791 T3

Gly Ser Val Ser His Tyr Ala Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 50

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 50

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ser Ile Cys Pro Ala Gln Lys Leu Lys Phe Lys His Glu
20 25 30

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

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Cys Asp Lys
50 55 60

Gly Ser Val Ser Tyr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

ES 2 905 791 T3

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 51

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 51

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ser Ile Glu Pro Arg Gln Lys Tyr Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Ala Leu Ile Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Ala
50 55 60

Gly Ser Val Ser His Tyr Val Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 52

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 905 791 T3

<220>

<223> Sintetizado

<400> 52

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 53

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 53

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

Val Asp Gly Asp Gly Ser Ile Trp Ala Ser Ile Ser Pro Leu Gln Cys
20 25 30

Leu Lys Phe Lys His Arg Leu Tyr Leu Glu Phe Asn Val Thr Gln Lys
35 40 45

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

ES 2 905 791 T3

Gly Tyr Val Arg Asp Thr Gly Ser Val Ser Gln Tyr Arg Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Ile Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys
 85 90 95
 Leu Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu
 100 105 110
 Pro Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp
 115 120 125
 Val Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr
 130 135 140
 Ser Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Pro Gly Ser Val Gly
 145 150 155 160
 Gly Leu Ser Pro Ser Gln Ala Ser Ser Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ser
 165 170 175
 Ser Pro Gly Ser Gly Ile Ser Glu Ala Leu Arg Ala Gly Ala Gly Ser
 180 185 190
 Gly Thr Gly Tyr Asn Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val
 195 200 205
 Asp Gly Asp Gly Ser Ile Tyr Ala Cys Ile Ile Pro Ser Gln Gly Arg
 210 215 220
 Lys Phe Lys His Gln Leu Ile Leu Arg Phe Thr Val Ala Gln Lys Thr
 225 230 235 240
 Gln Arg Arg Trp Phe Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly
 245 250 255
 Tyr Val Ser Asp Thr Gly Ser Val Ser Thr Tyr Val Leu Ser Gln Ile
 260 265 270
 Lys Pro Leu His Asn Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu
 275 280 285
 Lys Gln Lys Gln Ala Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro
 290 295 300
 Ser Ala Lys Glu Ser Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val
 305 310 315 320
 Asp Gln Ile Ala Ala Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser
 325 330 335
 Glu Thr Val Arg Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Lys Lys Lys Ser
 340 345 350
 Ser Pro
 <210> 54

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 54

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

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

Met	Lys	Phe	Lys	His	Arg	Leu	Leu	Glu	Phe	Asn	Val	Thr	Gln	Lys
	35					40					45			

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

Asp Gly Asp Gly Ser Ile Cys Ala Val Ile Lys Pro Gln Gln Tyr Asn
210 215 220

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 55

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 55

ES 2 905 791 T3

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 56

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 56

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Cys Ile Arg Pro Cys Gln Trp Gly Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Ser Leu Ser Phe Gln Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Thr Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Asn Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

ES 2 905 791 T3

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 57

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 57

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Trp Ala Ser Ile Ser Pro Leu Gln Cys Leu Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Tyr Leu Glu Phe Asn Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Thr
50 55 60

Gly Ser Val Ser Gln Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp

145

<210> 58

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> Sintetizado

<400> 58

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ser Ile Arg Pro Ser Gln Gln Met Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Leu Leu Glu Phe Asn Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asn Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Thr
50 55 60

Gly Ser Val Ser Gln Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 59

<211> 147

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 59

ES 2 905 791 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ser Ile Arg Pro Ser Gln Gln Met Lys Phe Lys His Arg
20 25 30

Leu Leu Leu Glu Phe Asn Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asn Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Arg Asp Thr
50 55 60

Gly Ser Val Ser Gln Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 60

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 60

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Ile Pro Ser Gln Trp Arg Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Val Leu Arg Phe Thr Val Ala Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val His Asp Ala

ES 2 905 791 T3

50					55					60					
Gly 65	Ser	Val	Ser	Thr	Tyr 70	Tyr	Leu	Ser	Glu	Ile 75	Lys	Pro	Leu	His	Asn 80
Phe	Leu	Thr	Gln	Leu 85	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys 90	Leu	Lys	Gln	Lys	Gln 95	Ala
Asn	Leu	Val	Leu 100	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln 105	Leu	Pro	Ser	Ala	Lys 110	Glu	Ser
Pro	Asp	Lys 115	Phe	Leu	Glu	Val	Cys 120	Thr	Trp	Val	Asp	Gln 125	Ile	Ala	Ala
Leu	Asn 130	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg 135	Lys	Thr	Thr	Ser	Glu 140	Thr	Val	Arg	Ala
Val 145	Leu	Asp													
<210> 61															
<211> 147															
<212> PRT															
<213> Secuencia artificial															
<220>															
<223> Sintetizado															
<400> 61															
Lys 1	Glu	Phe	Leu	Leu 5	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe 10	Val	Asp	Gly	Asp	Gly 15	Ser
Ile	Tyr	Ala	Cys 20	Ile	Ile	Pro	Ser	Gln 25	Gly	Arg	Lys	Phe	Lys 30	His	Gln
Leu	Ile	Leu 35	Arg	Phe	Thr	Val	Ala 40	Gln	Lys	Thr	Gln	Arg 45	Arg	Trp	Phe
Leu	Asp 50	Lys	Leu	Val	Asp	Glu 55	Ile	Gly	Val	Gly	Tyr 60	Val	Ser	Asp	Thr
Gly 65	Ser	Val	Ser	Thr	Tyr 70	Val	Leu	Ser	Gln	Ile 75	Lys	Pro	Leu	His	Asn 80
Phe	Leu	Thr	Gln	Leu 85	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys 90	Leu	Lys	Gln	Lys	Gln 95	Ala
Asn	Leu	Val	Leu 100	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln 105	Leu	Pro	Ser	Ala	Lys 110	Glu	Ser

ES 2 905 791 T3

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 62

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 62

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Cys Ala Val Ile Lys Pro Gln Gln Tyr Asn Lys Phe Lys His Leu
20 25 30

Leu Gln Leu Arg Phe Gln Val Ala Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Gln Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 63

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 905 791 T3

<220>

<223> Sintetizado

<400> 63

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Thr Ile Ile Pro Asn Gln Cys His Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Leu Leu Arg Phe Arg Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Glu Asp Gln
50 55 60

Gly Ser Val Ser Ser Tyr Thr Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

5

<210> 64

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Sintetizado

<400> 64

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

ES 2 905 791 T3

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

ES 2 905 791 T3

				260				265				270			
Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu
		275					280					285			
Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro
	290					295					300				
Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val
305					310					315					320
Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	Ser
				325					330					335	
Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Lys	Ser
			340					345					350		
Ser Pro <210> 65 <211> 354 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintetizado <400> 65															
Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe
1				5					10					15	
Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Tyr	Ala	Arg	Ile	Gly	Pro	Leu	Gln	Gln
			20					25					30		
Gly	Lys	Phe	Lys	His	Ser	Leu	Arg	Leu	Thr	Leu	Ser	Val	Tyr	Gln	Lys
		35					40					45			
Thr	Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val
	50					55					60				
Gly	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Tyr	His	Leu	Ser	Glu
65				70						75					80
Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys
				85					90					95	
Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu
			100					105					110		

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Val His Asp Asn Gly Ser Val Ser Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Ile
260 265 270

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 66

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

ES 2 905 791 T3

<400> 66

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Pro

<210> 67

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 67

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

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

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

ES 2 905 791 T3

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

Ser Pro

<210> 68

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 68

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Tyr Ile Gln Pro Arg Gln Thr Tyr Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Val Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Asn Tyr Lys Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

10

<210> 69

<211> 147

<212> PRT

ES 2 905 791 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 69

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ser Ile Glu Pro Lys Gln Asn Arg Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val His Asp Asn
50 55 60

Gly Ser Val Ser Ser Tyr Lys Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 70

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

ES 2 905 791 T3

<400> 70

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ser Ile His Pro Ser Gln Pro Lys Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val His Asp Asn
50 55 60

Gly Ser Val Ser Ser Tyr Lys Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 71

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 71

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Ser Ile Gln Pro Arg Gln Ser Tyr Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

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

ES 2 905 791 T3

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ala Asp Arg
50 55 60

Gly Ser Val Ser Trp Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 72

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 72

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Arg Ile Val Pro Ala Gln Thr Gly Lys Phe Lys His Asn
20 25 30

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

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp His
50 55 60

Gly Ser Val Ser Ser Tyr His Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

ES 2 905 791 T3

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 73

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 73

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Arg Ile Gly Pro Leu Gln Gln Gly Lys Phe Lys His Ser
20 25 30

Leu Arg Leu Thr Leu Ser Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Thr Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Gly Tyr His Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp

145

<210> 74

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> Sintetizado

<400> 74

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ser Ile Leu Pro Gln Gln Ser Gly Lys Phe Lys His Gly
20 25 30

Leu Arg Leu Arg Phe Ser Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp His
50 55 60

Gly Ser Val Ser Ser Tyr Thr Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 75

<211> 147

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 75

ES 2 905 791 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ser Ile Leu Pro Gln Gln Ser Gly Lys Phe Lys His Gly
20 25 30

Leu Arg Leu Arg Phe Ser Val Tyr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Ser Asp His
50 55 60

Gly Ser Val Ser Ser Tyr Thr Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 76

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 76

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

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

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

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

ES 2 905 791 T3

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

ES 2 905 791 T3

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

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

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

Ser Pro

<210> 77

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 77

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

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

Ala Lys Phe Lys His Gly Leu Ile Leu Trp Phe Thr Val Gly Gln Lys
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 905 791 T3

145		150		155		160									
Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser
				165					170					175	
Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Ser	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser
			180					185					190		
Gly	Thr	Gly	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe	Val
		195					200					205			
Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Arg	Pro	Arg	Gln	Gly	Gly
	210					215					220				
Lys	Phe	Lys	His	Thr	Leu	Asp	Leu	Arg	Phe	Asp	Val	Thr	Gln	Lys	Thr
225					230					235					240
Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Val	Gly
				245					250					255	
Tyr	Val	Tyr	Asp	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Gln	Tyr	Arg	Leu	Ser	Gln	Ile
			260					265						270	
Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu
		275					280					285			
Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro
	290					295					300				
Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val
305					310					315					320
Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	Ser
				325					330					335	
Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Lys	Ser
			340					345					350		

Ser Pro

<210> 78

<211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 78

ES 2 905 791 T3

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

ES 2 905 791 T3

				245				250				255				
Tyr	Val	Tyr	Asp	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr	Arg	Leu	Ser	Glu	Ile	
			260					265					270			
Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu	
		275					280					285				
Lys	Gln	Lys	Gln	Ala	Asn	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Pro	
		290					295					300				
Ser	Ala	Lys	Glu	Ser	Pro	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Val	Cys	Thr	Trp	Val	
305				310						315				320		
Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Thr	Thr	Ser	
			325						330				335			
Glu	Thr	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Lys	Lys	Lys	Ser	
			340					345					350			
Ser Pro																
<210> 79																
<211> 354																
<212> PRT																
<213> Secuencia artificial																
<220>																
<223> Sintetizado																
<400> 79																
Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Lys	Glu	Phe	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ala	Gly	Phe	
1				5					10				15			
Val	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Ile	Phe	Ala	Thr	Ile	Trp	Pro	Arg	Gln	Ser	
		20						25					30			
Ala	Lys	Phe	Lys	His	Gln	Leu	Val	Leu	Trp	Phe	Ala	Val	Gly	Gln	Lys	
		35						40					45			
Thr	Gln	Arg	Arg	Trp	Phe	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	Asp	Glu	Ile	Gly	Ala	
		50						55					60			
Gly	Tyr	Val	Val	Asp	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	Arg	Leu	Ser	Glu	
65				70							75				80	
Ile	Lys	Pro	Leu	His	Asn	Phe	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Pro	Phe	Leu	Lys	
			85						90					95		

ES 2 905 791 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Ser Pro

<210> 80

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 80

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

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

Leu Asp Leu Arg Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Gln Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 81

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 81

ES 2 905 791 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

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

Leu Asp Leu Arg Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
50 55 60

Gly Ser Val Ser Gln Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 82

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 82

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

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

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

ES 2 905 791 T3

35 40 45
 Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
 50 55 60
 Gly Ser Val Ser Ser Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80
 Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95
 Asn Leu Val Leu Lys Ile Ile Glu Gln Leu Pro Ser Ala Lys Glu Ser
 100 105 110
 Pro Asp Lys Phe Leu Glu Val Cys Thr Trp Val Asp Gln Ile Ala Ala
 115 120 125
 Leu Asn Asp Ser Lys Thr Arg Lys Thr Thr Ser Glu Thr Val Arg Ala
 130 135 140
 Val Leu Asp
 145
 <210> 83
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 83
 Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
 1 5 10 15
 Ile Tyr Ala Ser Ile Gln Pro Arg Gln Gly Arg Lys Phe Lys His Ser
 20 25 30
 Leu Glu Leu Lys Phe Asp Val Thr Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
 35 40 45
 Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Ser
 50 55 60
 Gly Ser Val Ser Ser Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
 65 70 75 80
 Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
 85 90 95

ES 2 905 791 T3

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 84

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 84

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Cys Ile Leu Pro Lys Gln Ser His Lys Phe Lys His Thr
20 25 30

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

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Val Gly Tyr Val Tyr Asp Leu
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 85

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 85

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

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

Leu Ile Leu Trp Phe Thr Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Ala Gly Tyr Val Ile Asp Leu
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 86

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 86

ES 2 905 791 T3

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Arg Pro Arg Gln Arg Pro Lys Phe Lys His Asp
20 25 30

Leu Val Leu Trp Phe Thr Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Ala Gly Tyr Val Leu Asp Leu
50 55 60

Gly Gly Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Gln Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 87

<211> 147

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 87

Lys Glu Phe Leu Leu Tyr Leu Ala Gly Phe Val Asp Gly Asp Gly Ser
1 5 10 15

Ile Phe Ala Thr Ile Trp Pro Arg Gln Ser Ala Lys Phe Lys His Gln
20 25 30

Leu Val Leu Trp Phe Ala Val Gly Gln Lys Thr Gln Arg Arg Trp Phe
35 40 45

ES 2 905 791 T3

Leu Asp Lys Leu Val Asp Glu Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val Asp Ala
50 55 60

Gly Ser Val Ser Glu Tyr Arg Leu Ser Glu Ile Lys Pro Leu His Asn
65 70 75 80

Phe Leu Thr Gln Leu Gln Pro Phe Leu Lys Leu Lys Gln Lys Gln Ala
85 90 95

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

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

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

Val Leu Asp
145

<210> 88

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 88

cctttcaact ccatctccat 20

10 <210> 89

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sintetizado

<400> 89

acatacgggt tagtcacaag t 21

<210> 90

<211> 19

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 90

tccagtcact taggctcag 19
 <210> 91
 <211> 38
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 91
 cccttacagt tattaactac tctcatgagg ttcattcc 38
 10 <210> 92
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Sintetizado
 <400> 92
 ccccggcact tgaaagtagc agatgcaaga agggcaca 38
 <210> 93
 <211> 34
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 93
 25 actataacca gcacctgaa ctccccct cata 34
 <210> 94
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Sintetizado
 <400> 94
 gccctgcctg tcattacac tgatgacatt atgctgac 38
 <210> 95
 35 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 95

ggccctacaa ccattctgcc ttcacttc agtgaata 39

5

<210> 96

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Sintetizado

<400> 96 cacaaggggg aagagtgtga ggggtggga taagaa 36

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la hemofilia A **caracterizada por** una inversión de los exones 1-22 en un gen del Factor VIII, comprendiendo dicha composición farmacéutica un portador farmacéuticamente aceptable y un ácido nucleico que codifica una nucleasa de ingeniería, en la que dicha nucleasa de ingeniería se expresa in vivo, en la que dicha nucleasa de ingeniería tiene especificidad para una secuencia de reconocimiento situada dentro de una secuencia int22h-1 de dicho gen del Factor VIII, en la que dicha secuencia int22h-1 de dicho gen del Factor VIII tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4, en la que dicha secuencia de reconocimiento está dentro de una secuencia codificante F8A1 que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, y en la que dicha nucleasa de ingeniería es una meganucleasa de ingeniería, una TALEN, una nucleasa de dedos de zinc, una TALEN compacta, una CRISPR o una megaTAL.
2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha secuencia int22h-1 de dicho gen del Factor VIII comprende la SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicha secuencia codificante F8A1 comprende la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6.
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho ácido nucleico es un ARNm.
5. La composición farmacéutica para su uso e acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición farmacéutica comprende un constructo de ADN recombinante que comprende dicho ácido nucleico
6. La composición farmacéutica para su uso e acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición farmacéutica comprende un vector viral que comprende dicho ácido nucleico, y/o en la que dicho vector viral es un vector AAV recombinante.
7. La composición farmacéutica para su uso e acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicha nucleasa de ingeniería es una meganucleasa de ingeniería.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha secuencia de reconocimiento consiste en la SEQ ID NO: 9.

Fig. 1A

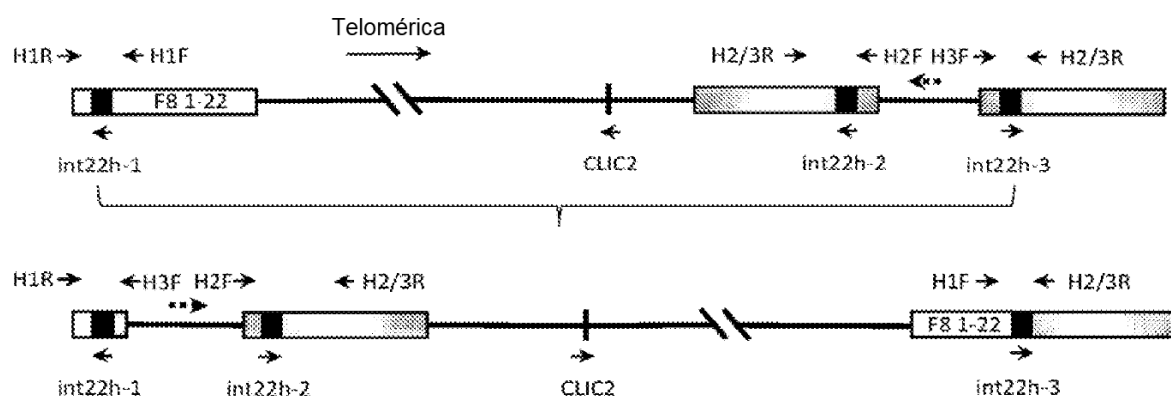
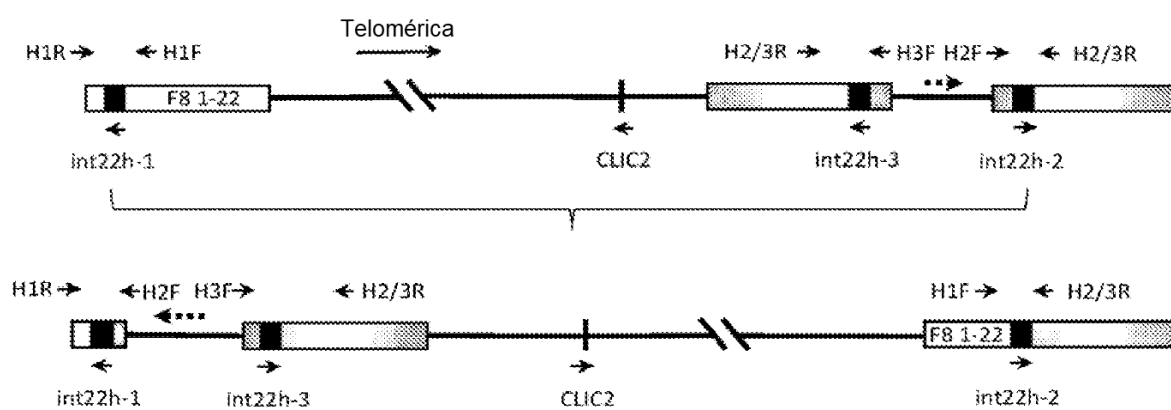


Fig. 1B



	F8R1 Semisitio	F8R2 Semisitio	
F8R 1-2	CCAGGCGCTGCAT	GCGCGTGAA	SEQ ID NO: 7
Secuencia de reconocimiento	GGTCCGCGAC	CGTACGCGCACTT	SEQ ID NO: 8
	F8R3 Semisitio	F8R4 Semisitio	
F8R 3-4	GCAGCAGCAGCA	GCGGGACAC	SEQ ID NO: 9
Secuencia de reconocimiento	CGTCGTCGT	CGTGCGCCCTGTG	SEQ ID NO: 10
	F8R9 Semisitio	F8R10 Semisitio	
F8R 9-10	CAGGATTGTGTG	AACTTCGGC	SEQ ID NO: 11
Secuencia de reconocimiento	GTCCTAACAC	CACGTTGAAGCCG	SEQ ID NO: 12
	F8R11 Semisitio	F8R12 Semisitio	
F8R 11-12	CTGCAGGCTGTAC	AAGGCTTCT	SEQ ID NO: 13
Secuencia de reconocimiento	GACGTCCGAC	CATGTTCCGAAGA	SEQ ID NO: 14
	F8R13 Semisitio	F8R14 Semisitio	
F8R 13-14	GGAGGACGGGTAC	CACGCCTTC	SEQ ID NO: 15
Secuencia de reconocimiento	CCTCCTGCC	CATGGTGCGGAAG	SEQ ID NO: 16
	F8R15 Semisitio	F8R16 Semisitio	
F8R 15-16	GGCCGTCAGGTAC	TCAATAACC	SEQ ID NO: 17
Secuencia de reconocimiento	CCGGCAGTC	CATGAGTTATTGG	SEQ ID NO: 18

Fig. 2

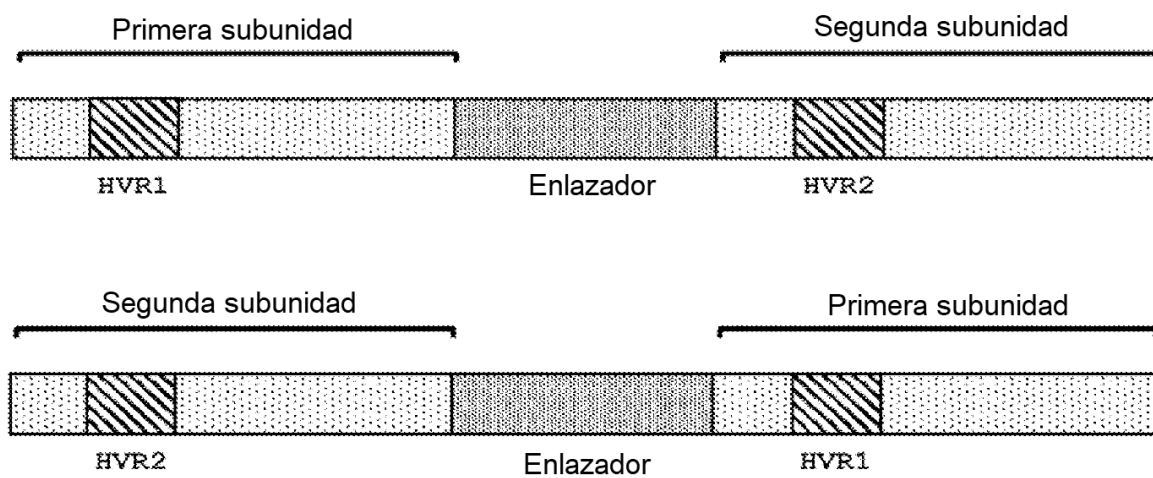


Fig. 3

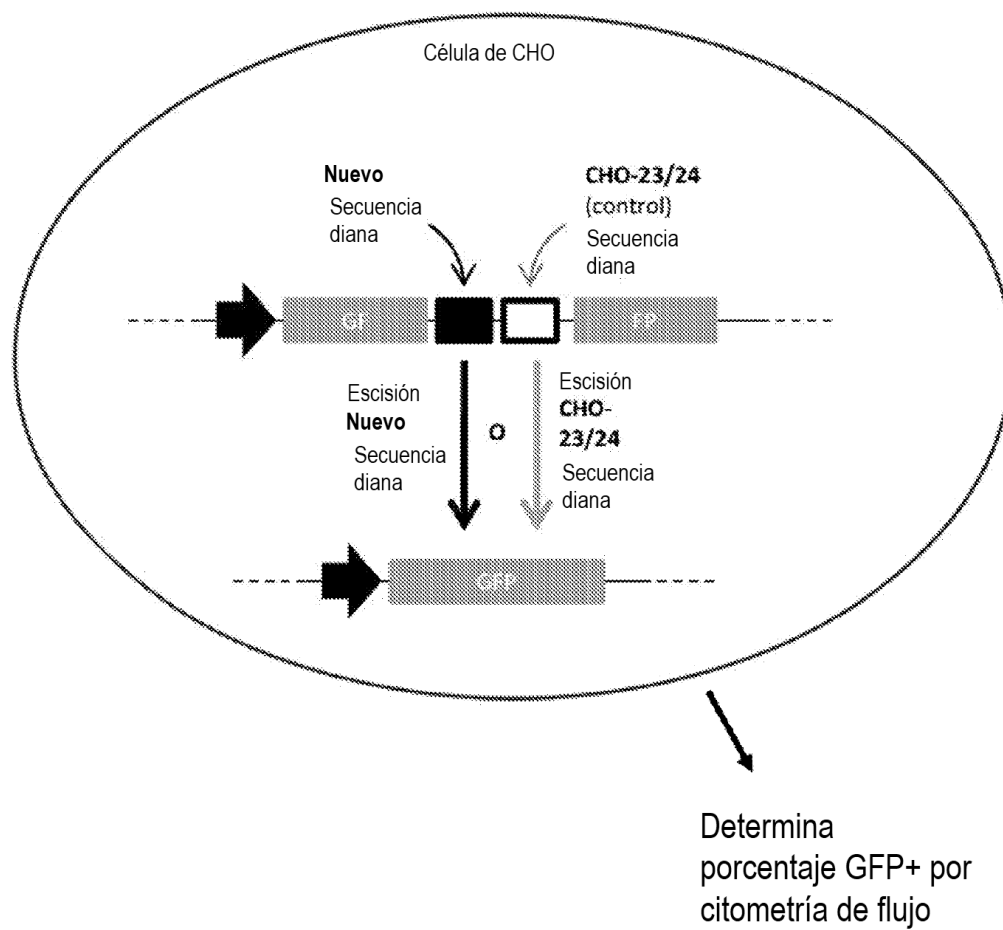


Fig. 4

Fig. 5A

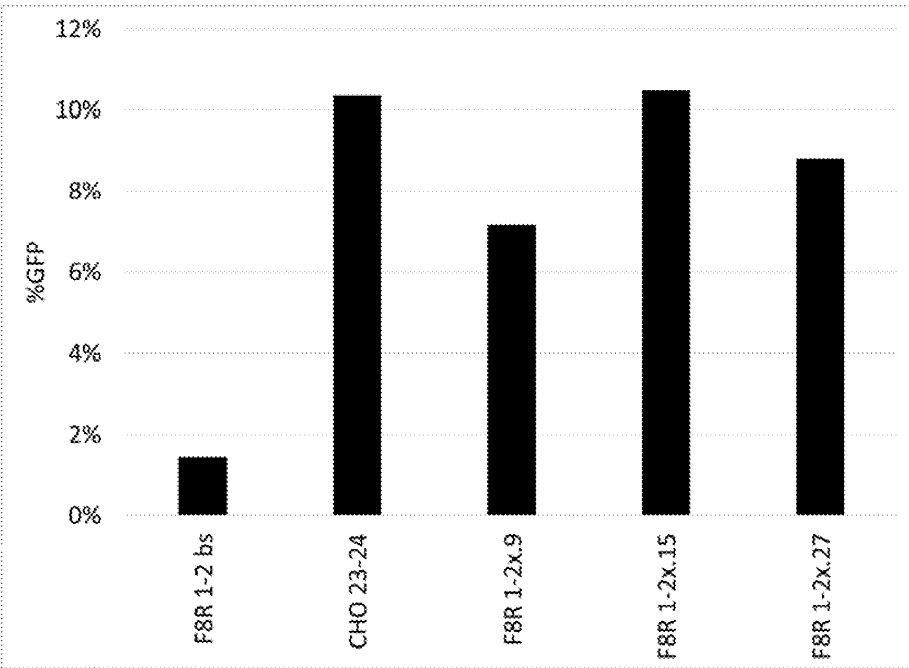


Fig. 5B

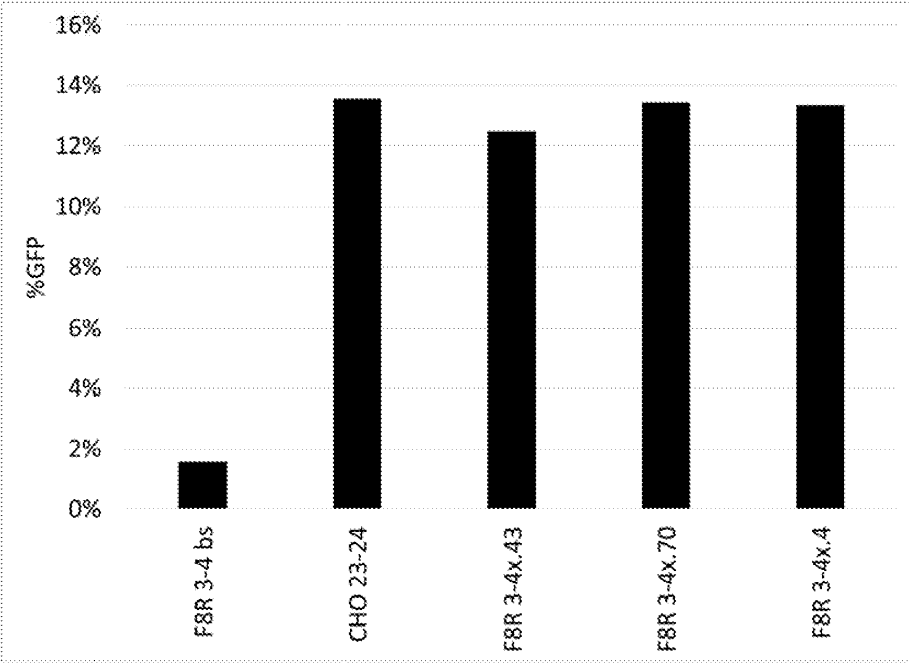


Fig. 5C

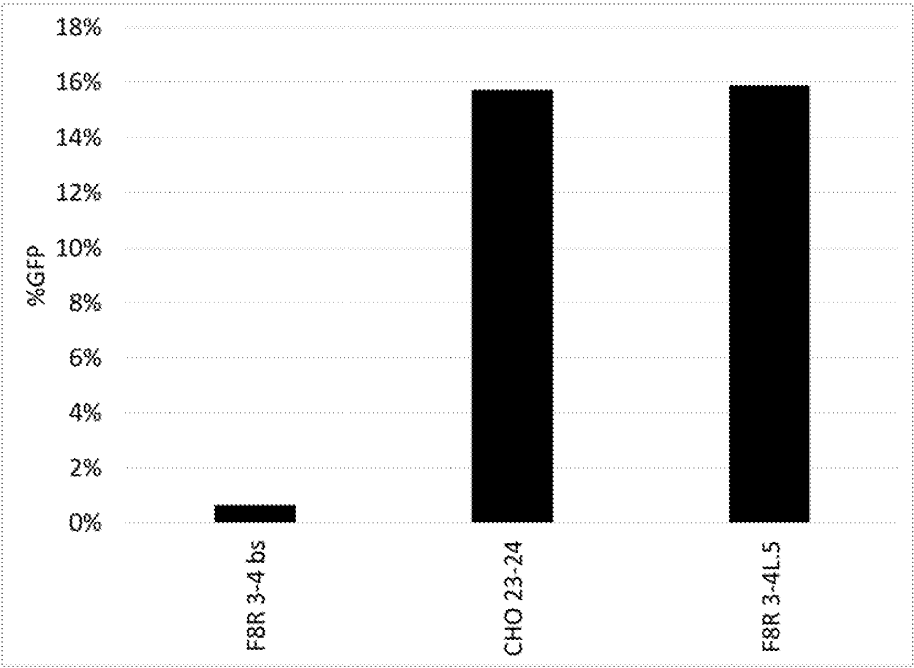


Fig. 5D

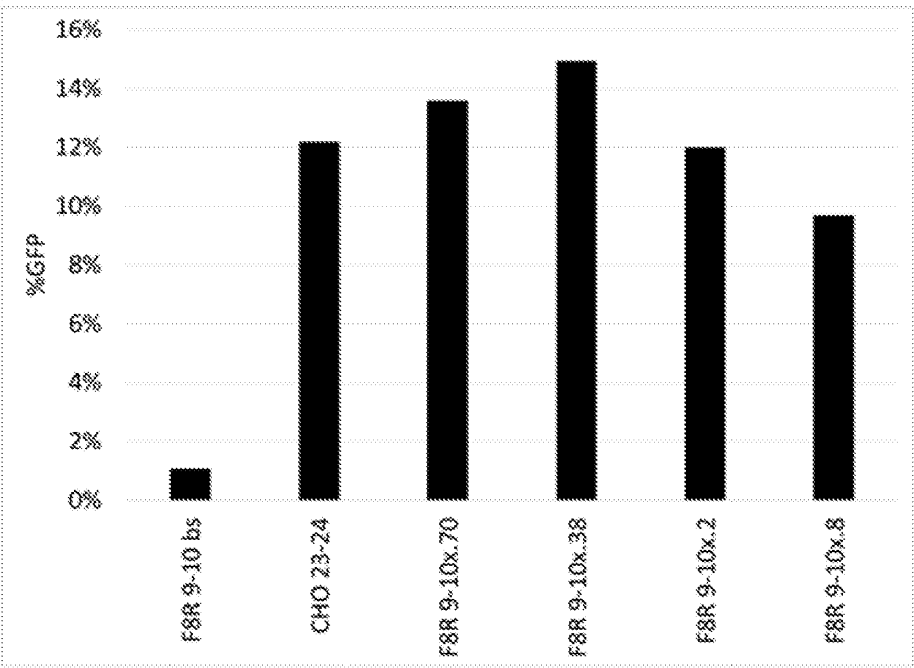


Fig. 5E

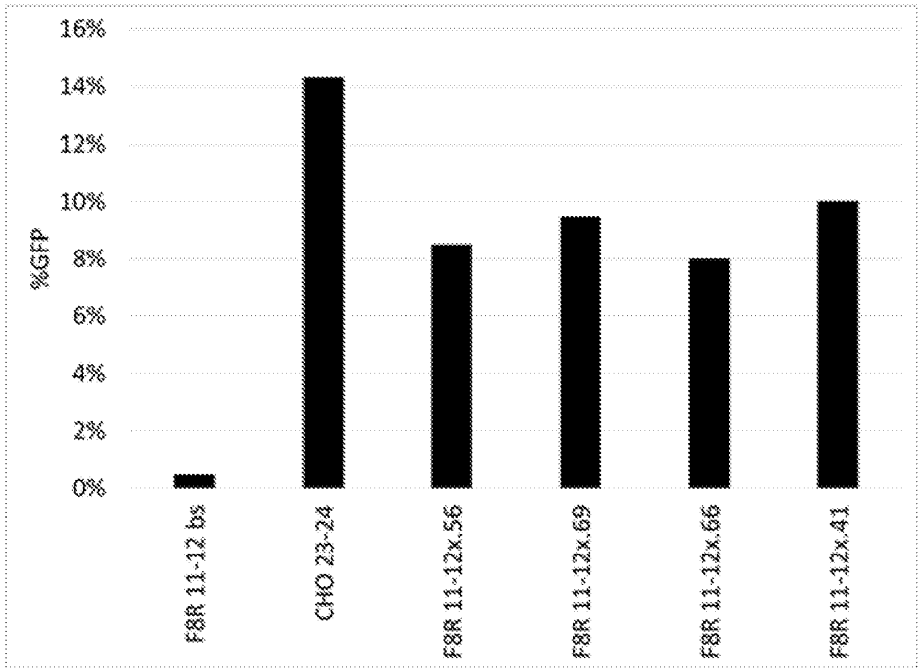


Fig. 5F

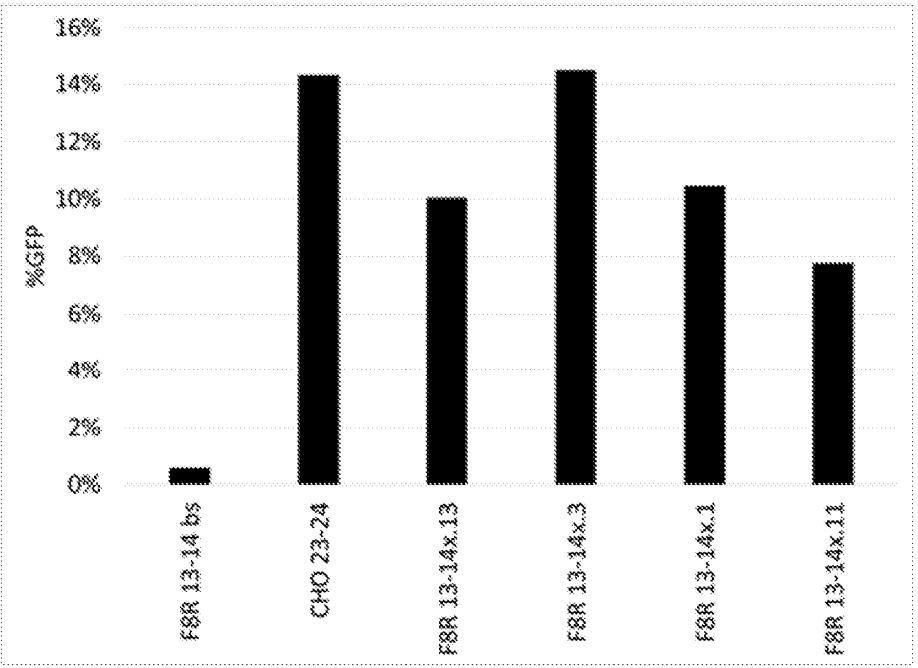


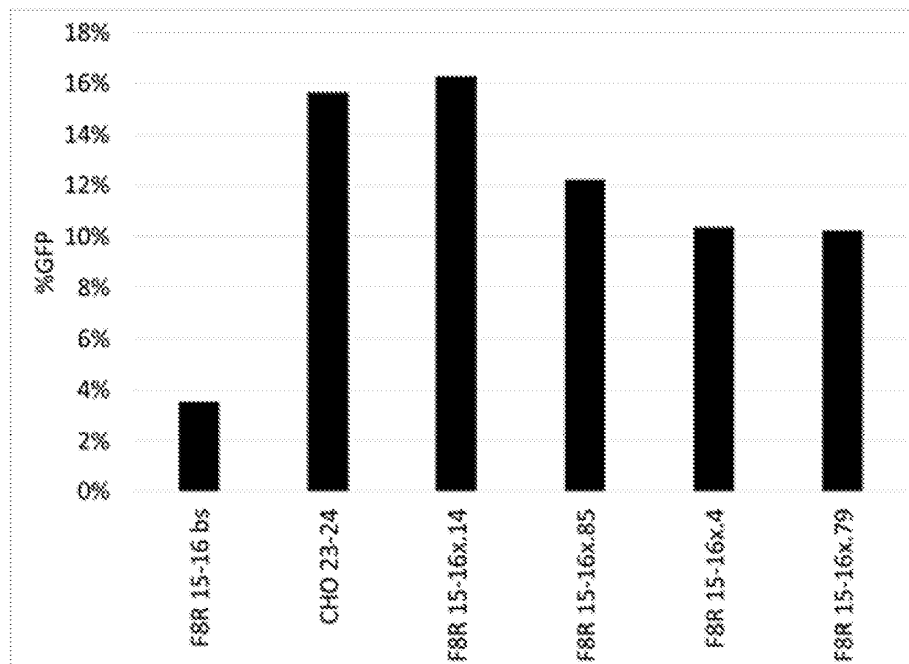
Fig. 5G

Fig. 6A

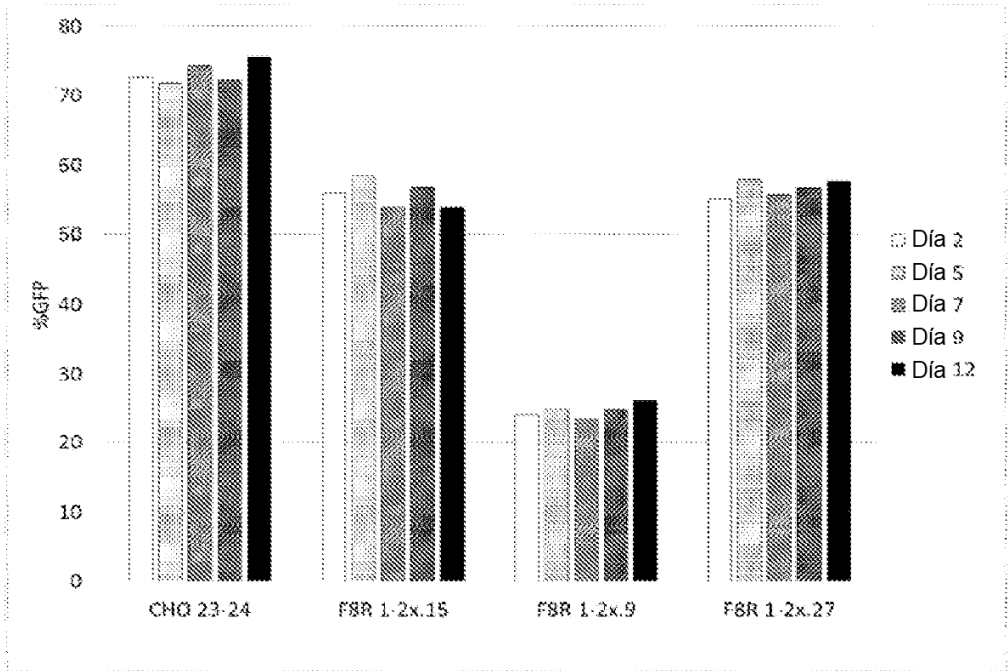


Fig. 6B

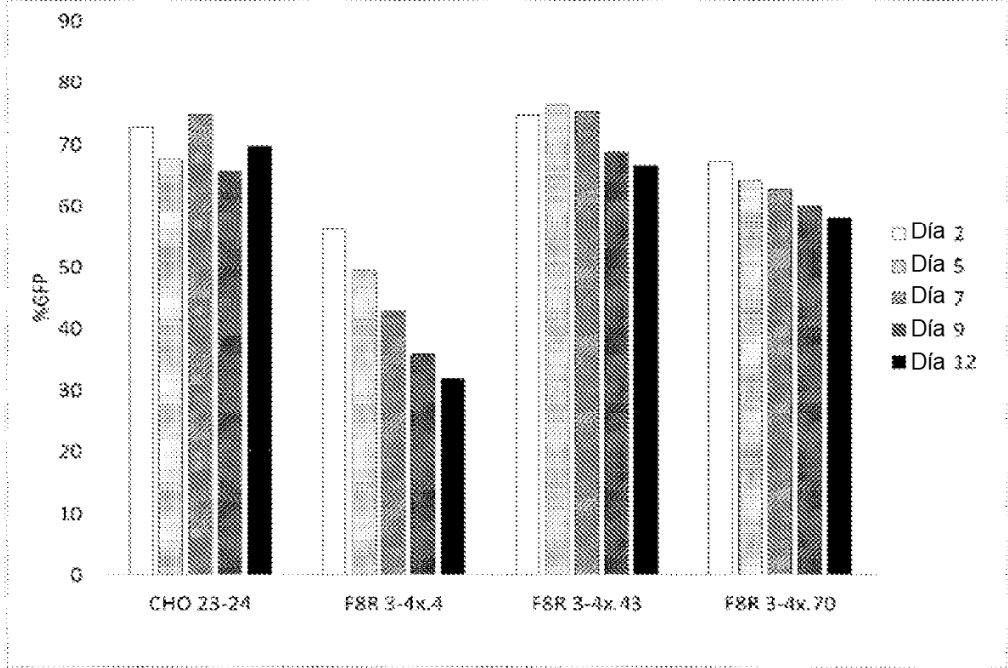


Fig. 6C

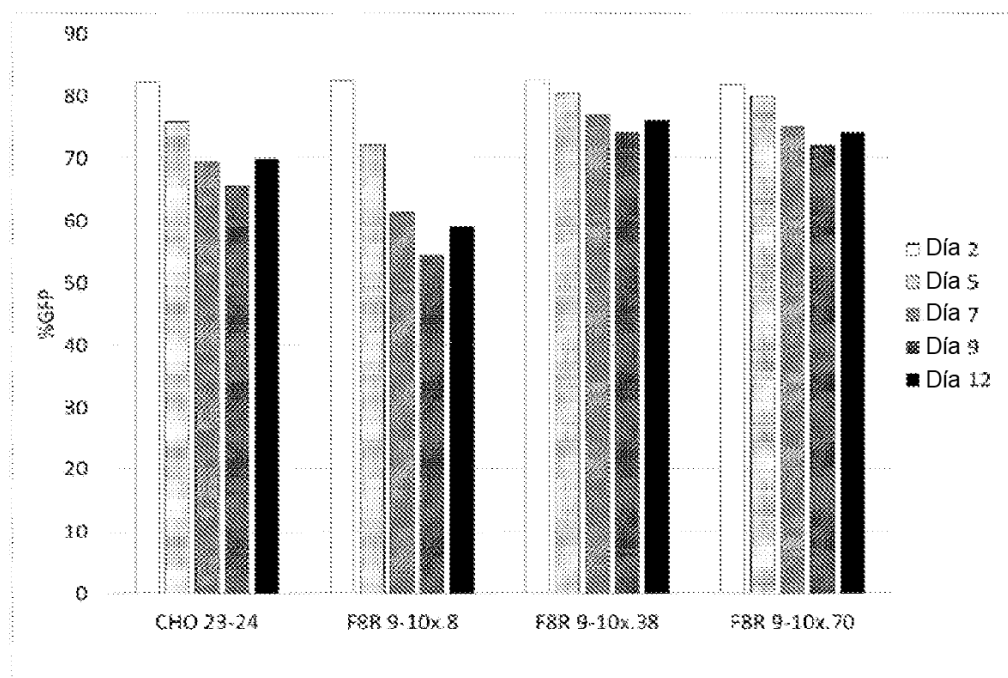


Fig. 6D

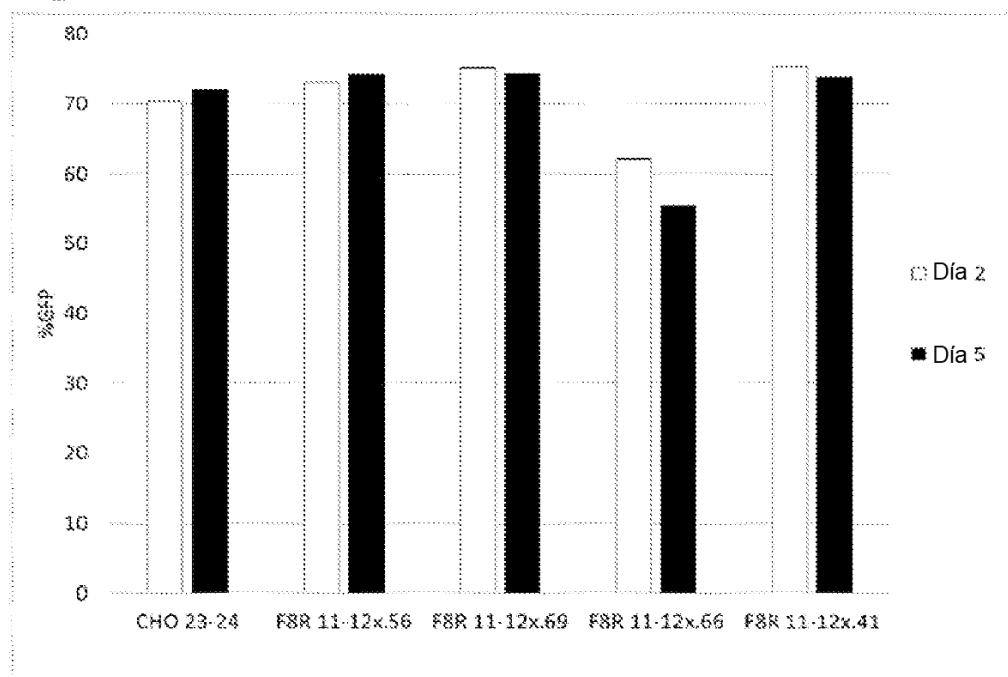


Fig. 6E

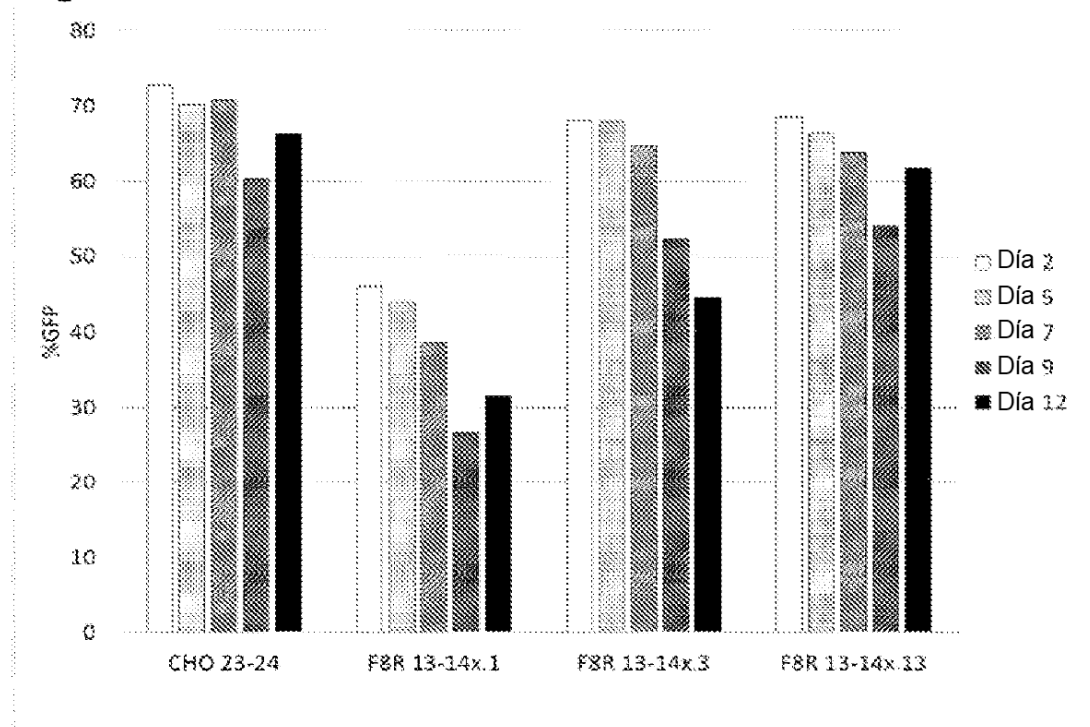
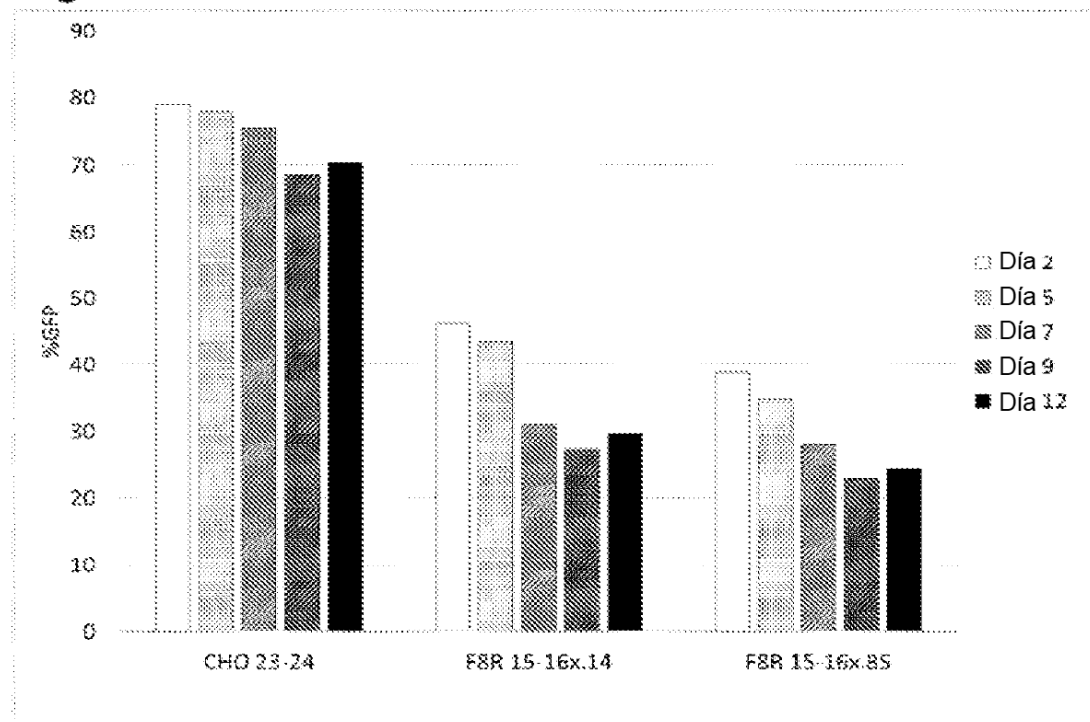


Fig. 6F



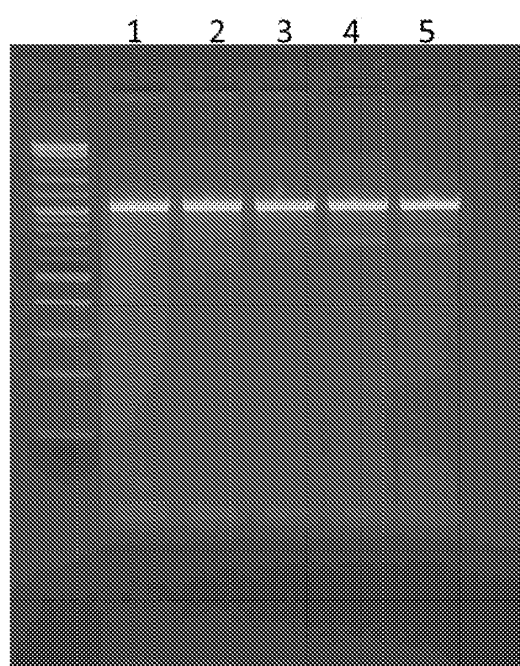


Fig. 7

Fig. 8A

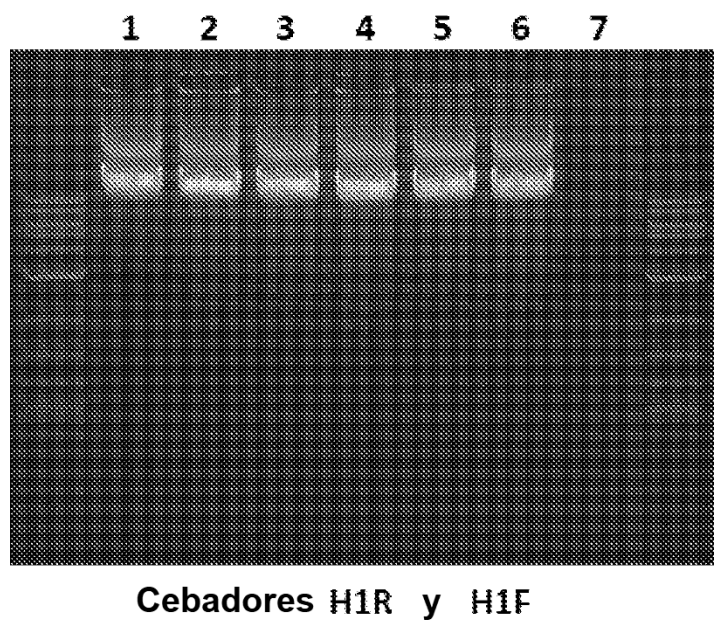
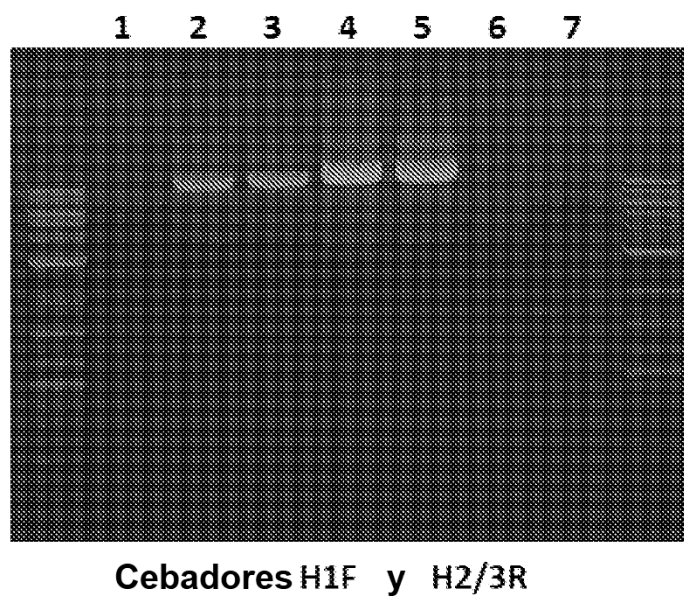


Fig. 8B



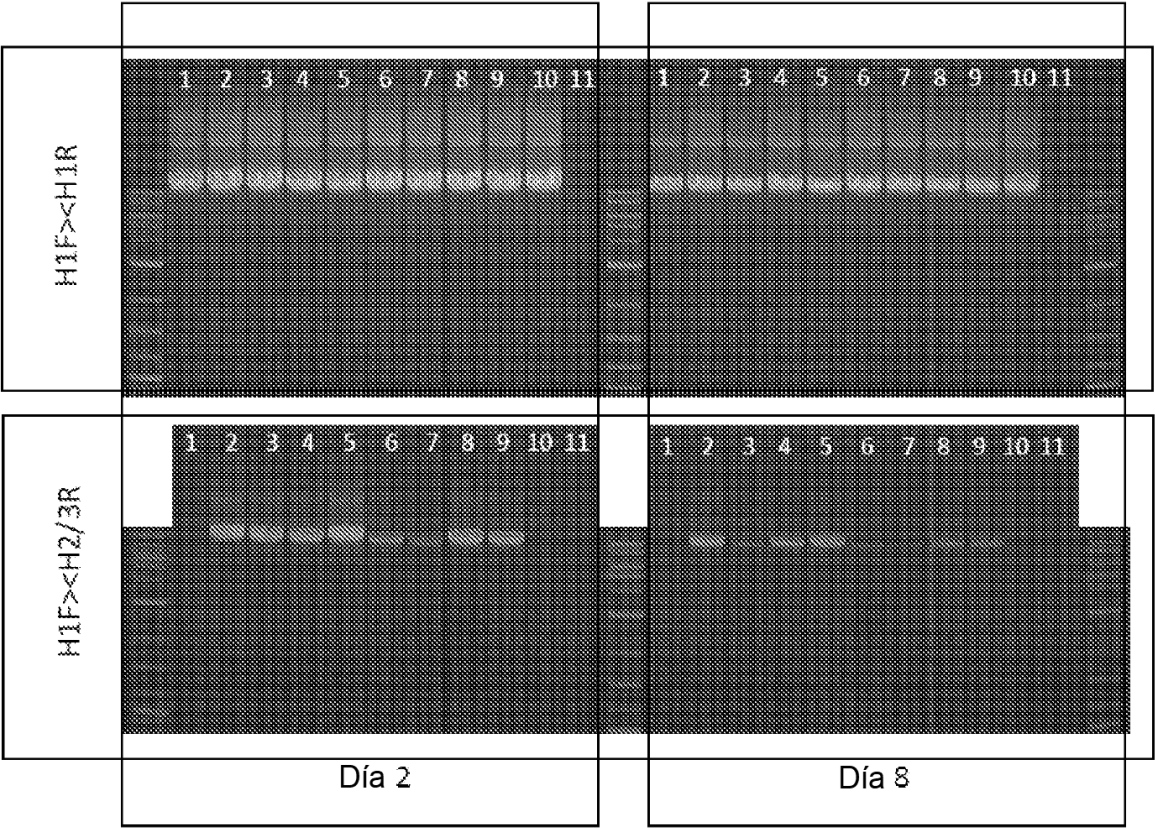


Fig. 9

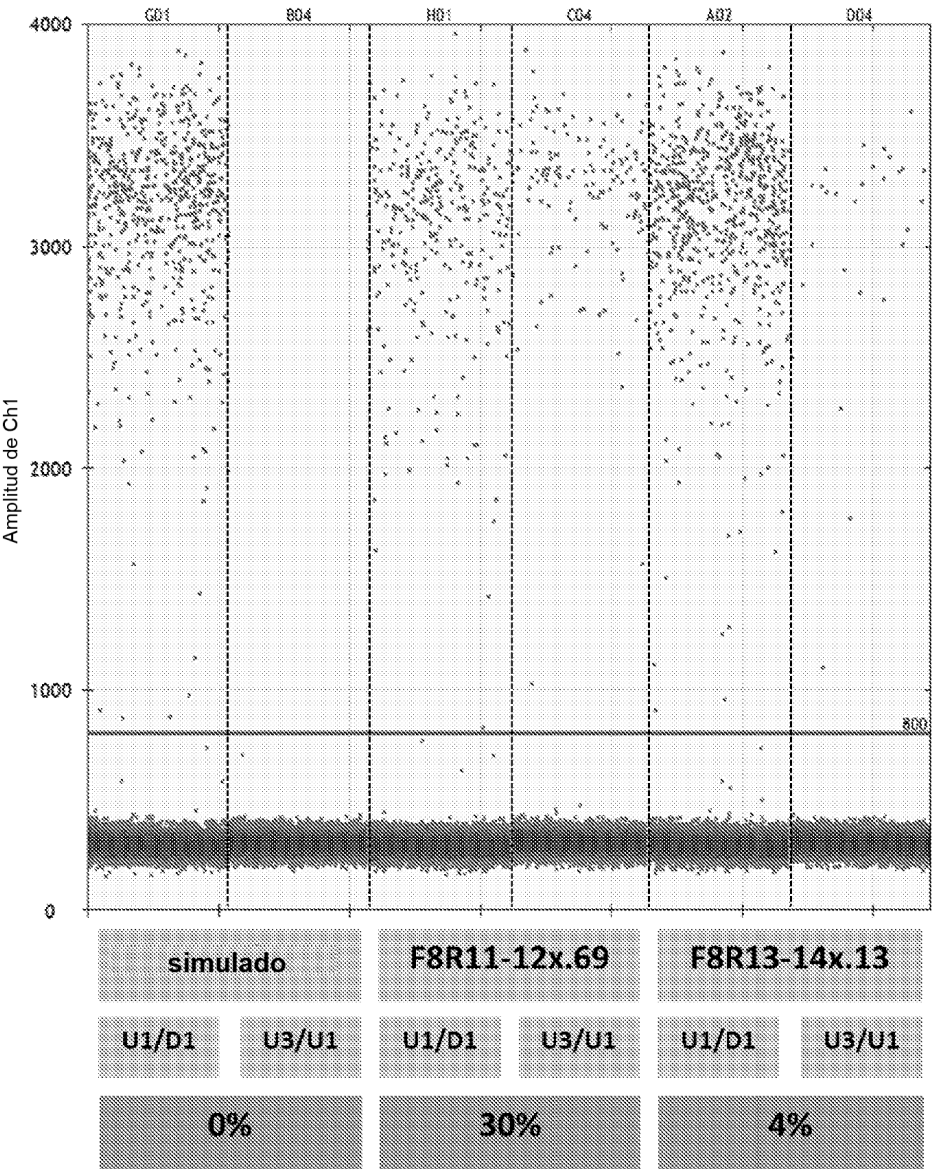
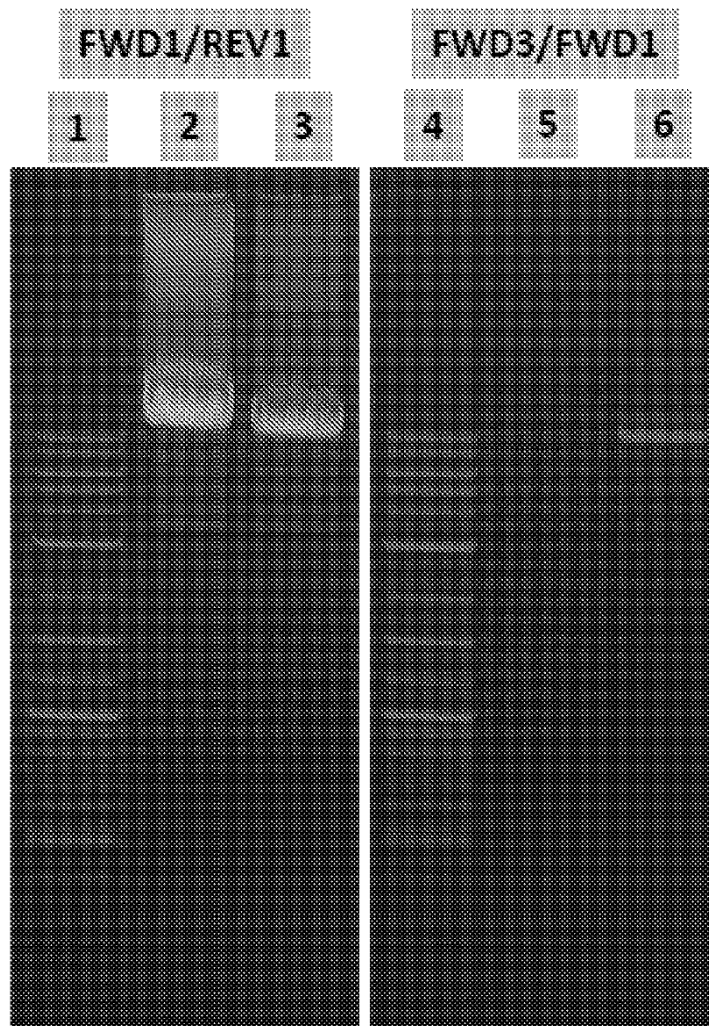
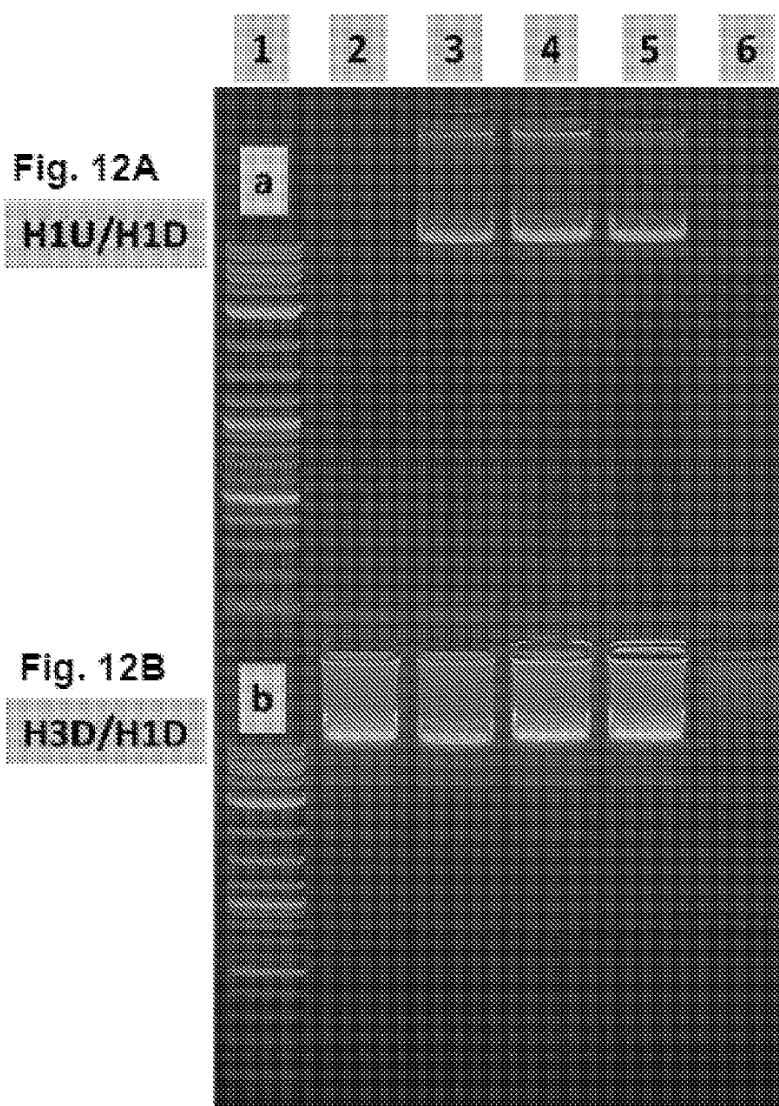


Fig. 10



carriles 1 y 4: estándar de peso molecular
carriles 2 y 5: células T humanas
carriles 3 y 6: células T humanas tratadas con nucleasa F8R3-4x.43

Fig. 11



carriles 1a y 1b: estándar de peso molecular
 carriles 2a y 2b: células T de pacientes tratados con GFP
 carriles 3a y 3b: células T de pacientes tratados con nucleasa F8R3-4x.43
 carriles 4a y 4b: células T de pacientes tratados con nucleasa F8R11-12x.69
 carriles 5a y 5b: células T de pacientes tratados con nucleasa F8R15-16x.14
 carriles 6a y 6b: control sin plantilla