



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 925 644**

(51) Int. Cl.:  
**C07K 14/705** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2017 E 20176441 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022 EP 3757120**

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

(30) Prioridad:

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

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.10.2022**

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

(74) Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 925 644 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Dominios coestimuladores para su uso en células modificadas genéticamente

**Campo de la invención**

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

**Antecedentes de la invención**

10 La inmunoterapia adoptiva con células T es un enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer. Esta estrategia utiliza células T humanas aisladas que han sido modificadas genéticamente para mejorar su especificidad por un antígeno específico asociado al tumor. La modificación genética puede implicar la expresión de un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T exógeno para injertar la especificidad del antígeno en la célula T. A diferencia de los receptores exógenos de células T, los CAR derivan su especificidad de los dominios variables de un anticuerpo monoclonal. Así, las células T que expresan CARs inducen la inmunorreactividad del tumor de una manera no restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Hasta la fecha, la inmunoterapia adoptiva de células B se ha utilizado como terapia clínica para varios tipos de cánceres, incluyendo neoplasias de células B (por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), linfoma no Hodgkin (LNH) de células B y leucemia linfocítica crónica), mieloma múltiple, neuroblastoma, glioblastoma, gliomas avanzados, cáncer de ovario, mesotelioma, melanoma y cáncer de páncreas.

20 La activación de las células T es iniciada por el receptor endógeno de las células T, que también proporciona especificidad de antígeno a la célula. La señalización de la célula T se amplifica mediante receptores coestimuladores de la superficie celular, como el CD28. En ausencia de coestimulación, la estimulación a través del receptor de células T puede ser insuficiente para impulsar la proliferación de células T, lo que da lugar a la anergia celular. La coestimulación también contribuye a evitar el agotamiento de las células T y algunas formas de muerte celular inducida por la activación. Los primeros receptores quiméricos activadores de células T se generaron fusionando la cadena  $\zeta$  de CD3 con el dominio extracelular de los correceptores de células T, incluidos CD4, CD8 y CD25.

25 Los denominados receptores de antígeno quimérico de "primera generación" se generaron entonces fusionando la cadena  $\zeta$  de CD3 con un fragmento variable de cadena única (scFv), que permitía la especificidad del antígeno y la activación de las células T inducida por el antígeno. Aunque la primera generación de CARs fue capaz de mediar en la citotoxicidad, fue incapaz de dirigir la expansión inducida por el antígeno de las células T primarias modificadas. De hecho, los estudios realizados en los primeros modelos de ratones transgénicos revelaron que las células T que expresaban CARs de primera generación sólo producían un efecto moderado sobre la progresión del tumor *in vivo* debido a la anergia y a la producción de bajas cantidades de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Los receptores de antígenos quiméricos de "segunda generación" se generaron fusionando además un único dominio coestimulador en *cis* con la cadena  $\zeta$  citoplásica de CD3. Los estudios demostraron que la adición del dominio coestimulador permitía la expansión de las células CAR-T primarias tras la exposición repetida al antígeno, así como el aumento de la secreción de citoquinas como el IFN- $\gamma$ . De hecho, los primeros ensayos clínicos con células CAR-T de segunda generación mostraron una persistencia y expansión significativamente mayores en pacientes con linfoma de células B, CLL y ALL de células B. Se han introducido varios dominios coestimuladores en los CAR, como los elementos CD28, 4-1BB u OX-40, que se han utilizado en células CAR-T administradas a pacientes con neoplasias de células B. Los denominados receptores de antígenos quiméricos de "tercera generación" introdujeron dos dominios coestimuladores en tandem con la cadena  $\zeta$  citoplasmática de CD3 para permitir un mayor aumento de la expansión celular y/o de la secreción de citoquinas tras la exposición repetida al antígeno.

30 40 45 50 Además del uso de dominios coestimuladores dentro de las construcciones CAR, los grupos también han incorporado dominios coestimuladores en varios "interruptores de seguridad" que pueden estar separados del CAR. Uno de estos interruptores de seguridad comprende los dominios de señalización MyD88 y CD40, fusionados a un dominio de unión que se dimeriza cuando se une a una pequeña molécula como el rimiducid. Este interruptor de seguridad se utiliza junto con un constructo CAR que sólo comprende una cadena CD3  $\zeta$  citoplásica para promover la activación celular. Al administrar la pequeña molécula, el interruptor de seguridad se dimeriza y permite la señalización coestimuladora MyD88/CD40 para promover la expansión de las células CAR-T y la secreción de citoquinas tras el reconocimiento del antígeno por el constructo CAR separado.

55 Se han divulgado previamente varios dominios coestimuladores tanto en patentes como en la literatura. Por ejemplo, La patente estadounidense nº 8.399.645 reivindica un polinucleótido que codifica un receptor de antígeno quimérico que comprende tanto el dominio de señalización 4-1BB como un dominio de señalización CD3  $\zeta$ . Sin embargo, ninguno ha divulgado los dominios de la presente divulgación o cualquier dominio que tenga incluso un 80% de identidad de secuencia con los dominios de la presente divulgación.

**Sumario de la invención**

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación proporciona novedosos dominios coestimuladores que son útiles para proporcionar células modificadas genéticamente para promover la proliferación celular y/o promover la secreción de citoquinas. La presente divulgación avanza en la técnica proporcionando nuevos dominios coestimuladores que promueven diferentes grados

5 de proliferación celular y/o secreción de citoquinas tras la activación celular inducida por antígenos. Por ejemplo, los dominios coestimuladores divulgados en el presente documento proporcionan una actividad superior en comparación con esos dominios, como el 4-1BB y el CD28. También se divultan en el presente documento células modificadas genéticamente que comprenden un receptor de antígeno químérico (CAR) que incorpora uno o más dominios coestimuladores divulgados en el presente documento. En otros ejemplos, las células modificadas genéticamente divulgadas en el presente documento comprenden un constructo regulador inducible que incorpora uno o más dominios coestimuladores divulgados en el presente documento. También se proporcionan aquí moléculas de ácido nucleico, construcciones de ADN recombinante (por ejemplo, plásmidos) y vectores virales que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios coestimuladores, y composiciones que comprenden los novedosos dominios coestimuladores para su uso en procedimientos de administración de los mismos a sujetos con el fin de reducir los síntomas, la progresión o la aparición de la enfermedad. En algunas realizaciones, las células modificadas genéticamente que comprenden los novedosos dominios coestimuladores aquí divulgados se formulan como composiciones farmacéuticas para su uso, por ejemplo, como inmunoterapia en el tratamiento del cáncer.

10 Así, en un aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.

15 20 La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR que comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.

25 El CAR puede comprender un dominio de unión a antígeno extracelular. El dominio extracelular de unión al antígeno puede ser un fragmento variable de cadena única (scFv). El dominio de unión a antígeno puede tener especificidad para un antígeno cancerígeno o tumoral. El CAR codificado puede comprender un dominio de unión a antígeno específico de CD19.

30 35 El CAR codificado puede comprender al menos dos dominios coestimuladores. En tales casos, los al menos dos dominios coestimuladores son dominios coestimuladores descritos en el presente documento o, alternativamente, son al menos un dominio coestimulador descrito en el presente documento y al menos un dominio coestimulador adicional conocido en la técnica (por ejemplo, 4-1BB, CD28, OX40, ICOS). El CAR codificado puede comprender además al menos un dominio de señalización intracelular. El al menos un dominio de señalización intracelular puede ser un dominio CD3 ζ.

40 La molécula de ácido nucleico puede ser un ARNm, un constructo de ADN recombinante (por ejemplo, un plásmido) o estar incluida en el genoma viral de un vector viral.

45 50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un constructo de ADN recombinante, en el que el constructo de ADN recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8. El constructo de ADN recombinante puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR descrito en el presente documento, en el que el CAR comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.

55 60 El constructo de ADN recombinante puede codificar un vector viral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, el vector viral puede ser un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral o un vector viral adeno-asociado (AAV). El vector viral puede ser un vector de virus adeno-asociado (AAV) recombinante.

65 70 En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un vector viral que comprende la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8. El vector viral puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR descrito en el presente documento, en el que el CAR comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.

75 80 El vector viral puede ser un vector retroviral, un vector lentiviral, un vector adenoviral o un vector viral adeno-asociado (AAV). En una realización particular, el vector viral es un vector AAV recombinante.

85 90 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula eucariota modificada genéticamente, en la que la célula eucariota modificada genéticamente comprende la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8. La célula eucariota modificada genéticamente puede comprender un casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica

un CAR descrito en el presente documento, en el que el CAR comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8. La célula eucariota modificada genéticamente puede comprender un casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un constructo regulador inducible descrito en el presente documento, en la que el constructo regulador inducible comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8. La molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, o el casete de expresión descrito en el presente documento, puede estar presente dentro del genoma de la célula eucariota modificada genéticamente o, alternativamente, no está integrada en el genoma de la célula. La molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, o el casete de expresión descrito en el presente documento, puede estar presente en la célula eucariota modificada genéticamente en un constructo de ADN recombinante, en un ARNm o en un genoma viral, que no está integrado en el genoma de la célula.

La célula puede ser una célula T o una célula asesina natural (NK). La célula eucariota modificada genéticamente puede ser una célula T humana primaria o una célula NK humana primaria. La célula eucariota modificada genéticamente puede ser una célula CAR-T humana o una célula CAR-NK humana.

La célula eucariota modificada genéticamente descrita en el presente documento puede mostrar un aumento de la proliferación y/o de la secreción de citoquinas en comparación con una célula de control que no comprende un dominio coestimulador descrito en el presente documento. El aumento de la proliferación y/o de la secreción de citoquinas puede presentarse *in vitro* y/o *in vivo*. El aumento de la secreción de citocinas puede comprender un aumento de IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF-alfa u otras citocinas asociadas con la activación y/o proliferación celular en comparación con una célula de control que no comprende un dominio coestimulador descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir una célula eucariota modificada genéticamente que comprende al menos un dominio coestimulador descrito en el presente documento, comprendiendo el procedimiento la introducción en una célula de al menos una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.

La molécula de ácido nucleico introducida puede codificar un CAR descrito en el presente documento que comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8. El procedimiento puede comprender además la introducción en la célula (i) una segunda molécula 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 reconoce y escinde una secuencia de reconocimiento para producir un sitio de escisión en el genoma de la célula, y en la que el ácido nucleico que codifica el al menos un dominio coestimulador o una variante activa o un fragmento del mismo se inserta en el genoma en el sitio de escisión. La nucleasa modificada puede ser una meganucleasa modificada, una nucleasa recombinante de dedos de zinc (ZFN), una nucleasa efectora similar al activador de la transcripción (TALEN) recombinante, una nucleasa CRISPR/Cas o una nucleasa megaTAL. En particular, la nucleasa de ingeniería puede ser una meganucleasa de ingeniería. Específicamente, la meganucleasa de ingeniería puede ser una meganucleasa de cadena única.

La molécula de ácido nucleico que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8 introducido en la célula puede comprender además secuencias homólogas a las secuencias que flanquean el sitio de escisión de la nucleasa, de manera que la molécula de ácido nucleico se inserta en el genoma en el sitio de escisión por recombinación homóloga. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico puede carecer de homología sustancial con el sitio de escisión de la nucleasa, de manera que la molécula de ácido nucleico se inserta en el genoma mediante la unión de extremos no homólogos.

La célula puede ser una célula T o una célula asesina natural (NK), como una célula T humana primaria o una célula NK humana primaria. La célula eucariota modificada genéticamente producida por el procedimiento puede ser una célula CAR-T humana o una célula CAR-NK humana.

La molécula de ácido nucleico que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende las secuencias de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 8 puede introducirse en la célula utilizando un ARNm descrito en el presente documento, un constructo de ADN recombinante descrita en el presente documento o un vector viral descrito en el presente documento.

La introducción de la al menos una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento que codifica al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8 puede aumentar la activación, la proliferación y/o la secreción de citoquinas de la célula modificada genéticamente. En realizaciones específicas, el aumento de la secreción de citoquinas comprende un aumento de la secreción de IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF-alfa o cualquier otra citoquina asociada a la activación y/o proliferación celular en comparación con una célula de control que no comprende un dominio coestimulador descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y células eucariotas genéticamente modificadas descritas en el presente documento que comprenden al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en

la SEQ ID NO: 8. En realizaciones particulares, las células eucariotas modificadas genéticamente comprenden un CAR descrito en el presente documento que comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.

5 En realizaciones específicas, las células eucariotas modificadas genéticamente son células CAR-T . En algunas de estas realizaciones, las células CAR-T comprenden un CAR que incluye un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8. En diversas realizaciones, las células CAR-T tienen especificidad para un cáncer o un antígeno específico del tumor, y la composición farmacéutica es útil en procedimientos de inmunoterapia contra el cáncer.

10 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona células eucariotas modificadas genéticamente para su uso en un procedimiento de inmunoterapia para tratar el cáncer en un sujeto, en el que las células eucariotas modificadas genéticamente son las descritas en el presente documento que comprenden al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, las células eucariotas modificadas genéticamente comprenden un CAR descrito en el presente documento que comprende al menos un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.

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

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

25 En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un cáncer de origen de células B, cáncer de mama, cáncer gástrico, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de colon, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, sarcoma de rhabdomio, leucemia y linfoma de Hodgkin. En algunas realizaciones , el cáncer de origen de células B se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda de linaje B, leucemia linfocítica crónica de células B y linfoma no Hodgkin de células B.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

30 La figura 1 muestra la alineación de los novedosos dominios coestimuladores Novell (SEQ ID NO: 5), FXN1-Novel3 (SEQ ID NO: 6), FXN1-Novel5 (SEQ ID NO: 7), FXN1-Novel6 (SEQ ID NO: 8). Se identifican motivos individuales de unión a TRAF y se pueden encontrar regiones espaciadoras entre los motivos de unión a TRAF dentro de cada dominio coestimulador enumerado.

35 La figura 2 muestra construcciones CAR que comprenden un scFv anti-CD 19, un dominio transmembrana y bisagra CD8, un dominio coestimulador y un dominio de señalización intracelular CD3  $\zeta$ . Los dominios coestimuladores mostrados incluyen CD28, 4-1BB, Novel1 (N1), Novel3 (N3), Novel5 (N5) y Novel6 (N6). También se muestra un constructo CAR que carece de un dominio coestimulador.

40 Las Figuras 3A-3H informan de los resultados de un análisis de GFP que demuestra la expresión de CAR tras la transducción por lentivirus de células T humanas de donantes. Los resultados se presentan para cada uno de los novedosos dominios coestimuladores Novell (N1), Novel3 (N3), Novel5 (N5) y Novel6 (N6). Figura 3A) Transducción simulada. Figura 3B) Transducción con CAR que comprende el dominio coestimulador 4-1BB. Figura 3C) Transducción con CAR que comprende el dominio coestimulador CD28. Figura 3D) Transducción con CAR sin dominio coestimulador (BB-). Figura 3E) Transducción con CAR que comprende el dominio coestimulador de Novell (N1). Figura 3F) Transducción con CAR que comprende el dominio coestimulador Novel3 (N3). Figura 3G) Transducción con CAR que comprende el dominio coestimulador Novel5 (N5). Figura 3H) Transducción con CAR que comprende el dominio coestimulador Novel6 (N6).

45 Las figuras 4A, 4B y 4C muestran los números de expansión de las células CAR-T medidos a lo largo del tiempo tras la activación repetida inducida por el antígeno en el cultivo de Raji. Los resultados se presentan para cada uno de los novedosos dominios coestimuladores Novell (N1), Novel3 (N3), Novel5 (N5) y Novel6 (N6). La Figura 4A muestra los resultados obtenidos para una población mixta de células CAR-T CD4 $^{+}$  y CD8 $^{+}$ . La figura 4B muestra los resultados obtenidos para la población de células CAR-T CD4 $^{+}$ . La Figura 4C muestra los resultados obtenidos para la población de células CAR-T CD8 $^{+}$ .

50 Las figuras 5A, 5B y 5C muestran la secreción de citoquinas en cada población de células CAR-T transducidas a los 3, 7, 10 y 14 días después de la transducción. La figura 5A muestra la secreción de interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). La figura 5B muestra la secreción de TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ). La Figura 5C muestra la secreción de IL-2.

- 5 Las figuras 6A, 6B y 6C muestran los números de expansión de las células CAR-T medidos a lo largo del tiempo tras la activación repetida inducida por el antígeno en el cultivo de Raji, utilizando un encuentro más frecuente con el antígeno y una mayor relación de diana: efector. Los resultados se presentan para cada uno de los novedosos dominios coestimuladores Novell (N1), Novel3 (N3), Novel5 (N5) y Novel6 (N6). La figura 5A muestra los resultados obtenidos para una población mixta de células CAR-T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. La figura 5B muestra los resultados obtenidos para la población de células CAR-T CD4<sup>+</sup>. La Figura 5C muestra los resultados obtenidos para la población de células CAR-T CD8<sup>+</sup>.
- 10 La Figura 7 muestra constructos de plantillas de donantes que comprenden, de 5' a 3', una repetición terminal invertida (ITR) de 5', un brazo de homología de 5', un promotor, secuencias de codificación para un scFv anti-CD 19, un dominio de bisagra y transmembrana de CD8, un dominio coestimulador y un dominio de señalización intracelular de CD3  $\zeta$ , una señal de poliA de SV40, un brazo de homología de 3' y un ITR de 3'. Los dominios coestimuladores mostrados incluyen 4-1BB, Novell (N1) y Novel6 (N6).
- 15 Las figuras 8A y 8B muestran la proliferación de CAR-T a lo largo del tiempo en respuesta al antígeno utilizando células CAR-T preparadas a partir de dos donantes diferentes. Se midió la proliferación de las células CAR-T que incluían los dominios coestimuladores 4-1BB, N1 o N6. Se encontró que los novedosos dominios de señalización costimuladora apoyan niveles de proliferación iguales o mejores que los niveles apoyados por la señalización 4-1BB. La Figura 8A muestra los resultados utilizando células CAR-T preparadas a partir del donante K799. La Figura 8B muestra los resultados utilizando células CAR-T preparadas a partir del donante z4100.
- 20 Las figuras 9A y 9B muestran la eliminación de células K19 en varias relaciones efectoras:objetivo (E:T) a las 24 y 72 horas de cocultivo con células CAR-T que comprenden los dominios coestimuladores 4-1BB, N1 o N6. La Figura 9A muestra células CAR-T preparadas a partir del donante K799. La Figura 9B muestra células CAR-T preparadas a partir del donante z4100.
- 25 Las figuras 10A, 10B y 10C muestran histogramas de los resultados del ensayo de proliferación celular utilizado para determinar la proliferación relativa de las células CAR-T que comprenden los dominios coestimuladores 4-1BB, N1 o N6 en respuesta a las células diana CD19<sup>+</sup>. La Figura 10A muestra la proliferación de las células CAR-4-1BB CAR-T en comparación con las células T TRC KO de control negativo en dos relaciones E:T diferentes. La Figura 10B muestra la proliferación de las células T CAR-4-1BB en comparación con las células T CAR-N1. La Figura 10C muestra la proliferación de las células T CAR-4-1BB en comparación con las células T CAR-N6.
- 30 La Figura 11 muestra los constructos de plantillas de donantes 7241, 7205 y 7206 que comprenden, de 5' a 3', una repetición terminal invertida (ITR) de 5', un brazo de homología de 5', un promotor, secuencias de codificación para un scFv anti-CD 19, un dominio de bisagra y transmembrana de CD8, un dominio coestimulador y un dominio de señalización intracelular de CD3  $\zeta$ , una señal SV40 poliA o una señal SV40 bi-poliA, un brazo de homología de 3' y un ITR de 3'. Los dominios coestimuladores mostrados incluyen el 4-1BB (constructo 7241) y el Novel 6 (N6; constructos 7205 y 7206).
- 35 Las figuras 12A-12G muestran los valores de flujo total dorsal y ventral observados *in vivo* en ratones tras el injerto y crecimiento de las células Raji-ffluc y el posterior tratamiento con células TCR KO, o con células T CAR portadoras de los constructos CAR 7205, 7206 o 4-1BB. La Figura 12A muestra el flujo dorsal tras el tratamiento con células TCR KO. La Figura 12B muestra el flujo dorsal tras el tratamiento con células T CAR 7205. La Figura 12C muestra el flujo dorsal tras el tratamiento con 7206 células T CAR. La Figura 12D muestra el flujo dorsal tras el tratamiento con células T CAR 4-1BB. La Figura 12E muestra el flujo ventral tras el tratamiento con células TCR KO. La Figura 12F muestra el flujo ventral tras el tratamiento con células T CAR 7205. La Figura 12G muestra el flujo ventral tras el tratamiento con células T CAR 7206. La Figura 12H muestra el flujo ventral tras el tratamiento con células T CAR 4-1BB.
- 40 Las figuras 13A-13D muestran imágenes del flujo total dorsal y ventral observado *in vivo* en ratones tras el injerto y el crecimiento de las células Raji-ffluc y el posterior tratamiento con células TCR KO, o con células T CAR portadoras de los constructos CAR 7205, 7206 o 4-1BB. La Figura 13A muestra imágenes del flujo dorsal en los días 7, 10 y 16 en grupos tratados con células TCR KO, células T CAR 7205, células T CAR 7206 y células T CAR 4-1BB. La Figura 13B muestra imágenes del flujo dorsal en los días 24, 31 y 38 en los grupos tratados con células T CAR 7205, células T CAR 7206 y células T CAR 4-1BB. La Figura 13C muestra imágenes del flujo ventral en los días 7, 10 y 16 en grupos tratados con células TCR KO, células T CAR 7205, células T CAR 7206 y células T CAR 4-1BB. La Figura 13D muestra imágenes del flujo ventral en los días 24, 31 y 38 en grupos tratados con células T CAR 7205, células T CAR 7206 y células T CAR 4-1BB.
- 45 La Figura 14 muestra una curva de supervivencia de los ratones tras el injerto y crecimiento de las células Raji-ffluc y el posterior tratamiento con células TCR KO, o con células T CAR que llevan los constructos CAR 7205, 7206 o 4-1BB.

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

10 10 Las figuras 16A-16F muestran los resultados de un ensayo de proliferación de Cell Trace Violet utilizando células T humanas transfectadas para expresar un CAR anti-CD 19 que comprende el dominio coestimulador Novel6 (N6), o un CAR que comprende tanto los dominios coestimuladores MyD88 y Novel6 (N6). Las células transfectadas se marcaron con Cell Trace Violet y se co-cultivaron con células K562 CD19-negativas o con células K562 CD19-positivas modificadas (células K19). La proliferación se evaluó mediante citometría de flujo para los subconjuntos de células T CD4 $^{+}$  y CD8 $^{+}$ . La Figura 16A muestra células CD4 $^{+}$  transfectadas con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE únicamente. La Figura 16B muestra células CD8 $^{+}$  transfectadas con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE únicamente. La Figura 16C muestra células CD4 $^{+}$  transfectadas con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y una plantilla de donante N6 CAR. La Figura 16D muestra células CD8 $^{+}$  transfectadas con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y una plantilla de donante N6 CAR. La Figura 16E muestra células CD4 $^{+}$  transfectadas con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y una plantilla de donante MyD88/N6 CAR. La Figura 16F muestra células CD8 $^{+}$  transfectadas con la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y una plantilla de donante MyD88/N6 CAR.

15 15 La Figura 17 muestra el constructo de plantilla del donante 7235 que comprende, de 5' a 3', una repetición terminal invertida (ITR) en 5', un brazo de homología en 5', un promotor, secuencias de codificación para un dominio coestimulador MyD88, un dominio coestimulador Novel6 (N6) y dominios FKBP12v36 de unión a ligando en tandem (Fv), un elemento T2A, secuencias de codificación para un scFv anti-CD19, un dominio de bisagra y transmembrana de CD8, y un dominio de señalización intracelular de CD3  $\zeta$ , una señal SV40 bi-polA, un brazo de homología 3', y un ITR 3'.

20 20 Las figuras 18A y 18B muestran los resultados de un ensayo de proliferación con Cell Trace Violet utilizando células T humanas transfectadas para expresar la meganucleasa TRC 1-2x.87EE únicamente sin una plantilla donante. Las células transfectadas se marcaron con Cell Trace Violet y se co-cultivaron con células K562 CD19-negativas o con células K562 CD19-positivas modificadas (células K19). La proliferación se evaluó mediante citometría de flujo para los subconjuntos de células T CD4 $^{+}$  y CD8 $^{+}$ . La figura 18A muestra el subconjunto de células CD4 $^{+}$ . La figura 18B muestra el subconjunto de células CD8 $^{+}$ .

25 25 Las figuras 19A-9D muestran los resultados de un ensayo de proliferación con Cell Trace Violet utilizando células T humanas transfectadas para expresar un CAR anti-CD 19 que comprende un dominio Novel6 (N6). Las células transfectadas se marcaron con Cell Trace Violet y se co-cultivaron con células K562 CD19-negativas o con células K562 CD19-positivas modificadas (células K19). La proliferación se evaluó mediante citometría de flujo para los subconjuntos de células T CD4 $^{+}$  y CD8 $^{+}$ . Además, se evaluaron las células en cocultivo K19 en presencia o ausencia de rimiducid. La Figura 19A muestra el subconjunto de células CD4 $^{+}$  cultivadas en células K19 o K562. La Figura 19B muestra el subconjunto de células CD4 $^{+}$  cultivadas en células K19 en presencia o ausencia de rimiducid. La Figura 19C muestra el subconjunto de células CD8 $^{+}$  cultivadas en células K19 o K562. La Figura 19D muestra el subconjunto de células CD8 $^{+}$  cultivadas en células K19 en presencia o ausencia de rimiducid.

30 30 Las Figuras 20A-20D muestran los resultados de un ensayo de proliferación con Cell Trace Violet utilizando células T humanas transfectadas para expresar un CAR anti-CD 19 que carece de un dominio coestimulador en combinación con un constructo inducible que comprende tanto el dominio coestimulador MyD88 como el Novel6 (N6) (iMyD88/N6 CAR). Las células transfectadas se marcaron con Cell Trace Violet y se co-cultivaron con células K562 CD19-negativas o con células K562 CD19-positivas modificadas (células K19). Además, se evaluaron las células en cocultivo K19 en presencia o ausencia de rimiducid. La proliferación se evaluó mediante citometría de flujo para los subconjuntos de células T CD4 $^{+}$  y CD8 $^{+}$ . La Figura 20A muestra el subconjunto de células CD4 $^{+}$  cultivadas en células K19 o K562. La Figura 20B muestra el subconjunto de células CD4 $^{+}$  cultivadas en células K19 en presencia o ausencia de rimiducid. La Figura 20C muestra el subconjunto de células CD8 $^{+}$  cultivadas en células K19 o K562. La Figura 20D muestra el subconjunto de células CD8 $^{+}$  cultivadas en células K19 en presencia o ausencia de rimiducid.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

35 35 La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador de Novell.

40 40 La SEQ ID NO:2 establece la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador de Novel3.

45 45 La SEQ ID NO:2 establece la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador de Novel3.



La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador de Novell.

La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador de Novell.

La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador de Novell.

La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador de Novell.

5 La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador de Novell.

La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador de Novell.

La SEQ ID NO: 1 establece la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador de Novell.

10 42 establece la secuencia de ácido nucleico de un vector que codifica el constructo CAR anti-CD 19 7235 que codifica un CAR de primera generación y un constructo regulador inducible que comprende dominios coestimuladores MyD88 y Novel6 y dominios FKBP12v36 de unión a ligando en tandem..

#### Descripción detallada de la invención

##### 1.1 Referencias y definiciones

La literatura científica y de patentes a la que se hace referencia en el presente documento establece conocimientos que están disponibles para los expertos en la materia.

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

20 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 normales en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología empleada en la descripción de la presente divulgación aquí expuesta tiene por objeto describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitativa de la presente divulgación.

25 Tal y como se utiliza en el presente documento, "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.

30 Tal como se utiliza en el presente documentos, 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 "ya sea/o"

35 Tal como se utiliza en el presente documento, un "dominio coestimulador" se refiere a un dominio polipeptídico que transmite una señal proliferativa intracelular y/o de supervivencia celular tras su activación. La activación de un dominio coestimulador puede producirse tras la homodimerización de dos polipéptidos del dominio coestimulador. La activación también puede producirse, por ejemplo, tras la activación de un constructo que comprenda el dominio coestimulador (*por ejemplo*, un receptor antigénico químérico o un constructo regulador inducible). Generalmente, un dominio coestimulador puede derivarse de un receptor coestimulador transmembrana, particularmente de una porción intracelular de un receptor coestimulador. Ejemplos no limitantes de polipéptidos coestimuladores incluyen, pero no se limitan a, los dominios coestimuladores descritos en el presente documento, 4-1BB, CD28, ICOS, OX-40 y CD27.

40 Tal como se usa en el presente documento, un "receptor de antígeno químérico" o "CAR" se refiere a un receptor de ingeniería que injerta especificidad para un antígeno u otro ligando o molécula en una célula efectora inmunitaria (*por ejemplo*, una célula T o una célula NK).. Un receptor de antígeno químérico normalmente comprende al menos un dominio o fracción de unión a ligando extracelular y un dominio intracelular que comprende uno o más dominios de señalización y/o dominios coestimuladores..

45 En algunas realizaciones, el dominio o la fracción de unión al ligando extracelular tiene la forma de un fragmento variable de cadena única (scFv) derivado de un anticuerpo monoclonal, que proporciona especificidad para un epítopo o antígeno particular (*por ejemplo*, un epítopo o antígeno presente preferentemente en la superficie de una célula, como una célula cancerosa u otra célula o partícula causante de la enfermedad). En algunas realizaciones, el scFv se une a través de una secuencia enlazadora.

50 En algunas realizaciones, el dominio de unión al ligando extracelular es específico para cualquier antígeno o epítopo de interés. En algunas realizaciones, el scFv es humanizado.

- En algunas realizaciones, el dominio extracelular de un receptor de antígeno químérico también puede comprender un autoantígeno (véase, Payne et al. (2016) *Science*, Vol. 353 (6295): 179-184), que puede ser reconocido por los receptores de células B específicas de autoantígeno en linfocitos B, dirigiendo así a las células B al direccionamiento y la destrucción específica de los linfocitos B autorreactivos en enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos.
- 5 Dichos CARs pueden denominarse receptores químéricos de autoanticuerpos (CAARs), y la incorporación de uno o más dominios coestimuladores descritos en el presente documento en dichos CAARs está comprendida en la presente divulgación.
- Los dominios de señalización intracelular son dominios citoplasmáticos que transmiten una señal de activación a la célula tras la unión del dominio extracelular. Un dominio de señalización intracelular puede ser cualquier dominio de señalización intracelular de interés conocido en la técnica. Dichos dominios de señalización citoplasmática pueden incluir, sin limitación, CD3 ζ.
- 10 En algunas realizaciones, el dominio intracelular también incluye uno o más dominios coestimuladores intracelulares, como los descritos en el presente documento, que transmiten una señal coestimuladora que promueve la proliferación celular, la supervivencia celular y/o la secreción de citoquinas tras la unión del dominio extracelular. Dichos dominios coestimuladores intracelulares pueden incluir, sin limitación, cualquier dominio coestimulador divulgado en el presente documento o aquellos dominios conocidos en la técnica, como, por ejemplo, un dominio CD28, un dominio 4-1BB, un dominio OX-40, un dominio ICOS o un dominio CD27. En algunas realizaciones, un receptor de antígeno químérico puede incluir además elementos estructurales adicionales, incluyendo un dominio transmembrana que se une al dominio de unión al ligando extracelular a través de una secuencia de bisagra o de unión.
- 15 20 Tal como se utiliza en el presente documento, un "constructo regulador inducible" se refiere a un constructo transmembrana o intracelular expresado en una célula que proporciona una señal coestimuladora inducible para promover la proliferación celular, la supervivencia celular y/o la secreción de citoquinas. Tales constructos comprenden uno o más dominios coestimuladores, como los descritos en el presente documento y/u otros conocidos en la técnica, que proporcionan una señal coestimuladora tras la activación. En algunas realizaciones, se induce una señal coestimuladora, por ejemplo, mediante la homodimerización de dos polipéptidos de constructos reguladores inducibles. Un constructo regulador inducible comprende generalmente un dominio de unión que permite la homodimerización tras la unión de una pequeña molécula, un anticuerpo u otra molécula que permite la homodimerización de dos polipéptidos de constructos.
- 25 30 35 Tal como se utiliza en el presente documento, una "señal coestimuladora" se refiere a una señal intracelular inducida por un dominio coestimulador que promueve la proliferación celular, la expansión de una población celular *in vitro* y/o *in vivo*, promueve la supervivencia celular, modula (*por ejemplo*, sobreregula o subregula) la secreción de citoquinas, y/o modula la producción y/o secreción de otras moléculas inmunomoduladoras. En algunas realizaciones, se induce una señal coestimuladora tras la homodimerización de dos polipéptidos de dominio coestimulador. En algunas realizaciones, se induce una señal coestimuladora tras la activación de un constructo que comprende el dominio coestimulador (*por ejemplo*, un receptor de antígeno químérico o un constructo regulador inducible).
- 40 45 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "activación" se refiere al estado de una célula (*por ejemplo*, una célula T) que ha sido suficientemente estimulada para inducir una función efectora detectable. En algunas realizaciones, la activación se asocia con la producción inducida de citoquinas y/o la proliferación y expansión celular inducida.
- 50 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "actividad antitumoral" o "efecto antitumoral" se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por una disminución del volumen del tumor, una disminución del número de células tumorales, una disminución del número de metástasis, un aumento de la esperanza de vida o una mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados a la enfermedad cancerosa. Un "efecto antitumoral" también puede manifestarse por la capacidad de las células genéticamente modificadas de la presente divulgación en la prevención de la aparición de un tumor en primer lugar.
- Tal y como se utiliza en el presente documento, con respecto a una proteína, el término "recombinante" significa que tiene una secuencia de aminoácidos alterada como resultado de la aplicación de técnicas de ingeniería genética a los ácidos nucleicos que codifican la proteína, y a las células u organismos que expresan la proteína. Con respecto a un ácido nucleico, el término de ingeniería o "recombinante" significa que tiene una secuencia de ácido nucleico alterada como resultado de la aplicación de técnicas de ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética incluyen, pero sin limitación, PCR y tecnologías de clonación de ADN; transfección, transformación y otras tecnologías de transferencia de genes; recombinación homóloga; mutagénesis dirigida al sitio; y 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.
- 55 Tal y como se utiliza en este documento, el término "tipo salvaje" se refiere a la secuencia polinucleotídica o polipeptídica más común de origen natural responsable de un fenotipo determinado. 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.

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

5 Tal y como se utiliza en el presente documento, 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.

10 Como se usa en el presente documento, el término "unión final no homóloga" o "NHEJ" se refiere al proceso celular natural en el que se repara una rotura de ADN de doble cadena mediante la unión directa de dos segmentos de ADN no homólogos (véase, por ejemplo, Cahill et al.

(2006), *Front. Biosci.* 11:1958-1976).

15 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "reducido" se refiere a cualquier reducción de los síntomas o la gravedad de una enfermedad o a cualquier reducción de la proliferación o el número de células cancerosas. En cualquier caso, dicha reducción es de hasta el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o hasta el 100%. En consecuencia, el término "reducido" abarca tanto una reducción parcial como una reducción completa de un estado de enfermedad.

20 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "aumento" se refiere a cualquier incremento en la activación, proliferación o señalización de citoquinas de una célula modificada genéticamente para que comprenda un dominio coestimulador divulgado en el presente documento, o un fragmento activo o variante del mismo. Tal reducción puede ser de hasta un 5 %, un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, o hasta un 100 %, o más. Se puede utilizar cualquier procedimiento para medir el aumento de la activación, la proliferación o la señalización de citoquinas de una célula. Por ejemplo, el aumento de la activación y/o de la expresión de citoquinas puede abarcar un aumento de la expresión de cualquiera de los IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  o cualquier otra citoquina que pueda utilizarse para determinar un cambio en la activación y/o proliferación celular. En algunas realizaciones, un aumento de la proliferación abarca un aumento del número de células o de la división celular, e incluye una expansión de una población celular.

30 Tal y 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 un alineamiento de las secuencias que maximiza la similitud entre 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 longitud de brechas en el alineamiento de la secuencia. Existen diversos algoritmos y programas informáticos para determinar la similitud de las secuencias utilizando parámetros estándar. Tal como se usa en el presente documento, la similitud de secuencia se mide usando el programa BLASTp para secuencias de aminoácidos y el programa BLASTn para secuencias de ácido nucleico, ambos están disponibles a través del National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), y se describen en, por ejemplo, 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 como se usa en el presente documento, el porcentaje de similitud de dos secuencias de aminoácidos es la puntuación basada en los siguientes parámetros para el algoritmo BLASTp: tamaño de palabra=3; penalización por apertura de brecha=-11; penalización de extensión de brecha=-1; y matriz de puntuación=BLOSUM62. Tal como se usa en el presente documento, el porcentaje de similitud de dos secuencias de ácido nucleico es la puntuación basada en los siguientes parámetros para el algoritmo BLASTn: tamaño de palabra=11; penalización por apertura de brecha=-5; penalización de extensión de brecha=-2; recompensa de coincidencia = 1; y penalización por falta de coincidencia=-3.

50 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" por el aminoácido "A" en la primera proteína corresponderá a la modificación del residuo "Y" por el aminoácido "A" en la segunda proteína si los residuos X e Y se corresponden entre sí en una alineación de secuencias, y a pesar del hecho de que X e Y pueden ser números diferentes.

55 Los términos "constructo de ADN recombinante", "constructo recombinante", "casete de expresión", "constructo de expresión", "constructo químérico" 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 o no natural de moléculas de ácido nucleico, incluyendo, sin limitación, secuencias reguladoras y codificadoras. Aunque

el constructo recombinante en su totalidad no se encuentra en la naturaleza, partes del constructo pueden encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un constructo de ADN recombinante puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que provienen de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes que provienen de la misma fuente y se disponen de manera diferente a la encontrada en la naturaleza. 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 técnica. Los vectores pueden incluir, sin limitación, vectores de plásmidos y vectores de AAV recombinantes, o cualquier otro vector conocido en esa técnica adecuado para administrar un gen que codifica una meganucleasa de la presente divulgación a una célula diana. El experto en la técnica conoce bien los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector para poder transformar con éxito, seleccionar y propagar células huésped que comprenden cualquiera de los nucleótidos aislados o secuencias de ácido nucleico de la presente divulgación.

Tal como se utiliza en el presente documento, 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 y como se utiliza en el presente documento, el término "operativamente enlazado" pretende significar un enlace funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, un enlace operable entre una secuencia de ácido nucleico que codifica una nucleasa como se divulga en el presente documento y una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor) es un enlace funcional que permite la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la nucleasa. Los elementos enlazados operativamente pueden ser contiguos o no contiguos. Cuando se utiliza para referirse a la unión de dos regiones codificantes de proteínas, por operativamente enlazado se entiende que las regiones codificantes están en el mismo marco de lectura.

Tal y como se utiliza en el presente documento, "transfectado" o "transformado" o "transducido" o "nucleofectado" se refiere a un proceso por el que se transfiere o introduce ácido nucleico exógeno en la célula huésped. Una célula "transfectada" o "transformada" o "transducida" es aquella que ha sido transfectada, transformada o transducida con ácido nucleico exógeno. La célula incluye la célula primaria del sujeto y su progenie.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "célula T humana" o "célula T" se refiere a una célula T aislada de un donante humano. Las células T humanas, y las células que provienen de los mismos, incluyen células T aisladas que no se han pasado en cultivo, células T que han sido pasadas y mantenidas en condiciones de cultivo celular sin inmortalización, y células T que han sido inmortalizadas y se pueden mantener en condiciones de cultivo celular indefinidamente.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "célula asesina natural humana" o "célula NK humana" o "célula asesina natural" o "célula NK" se refiere a un tipo de linfocito citotóxico fundamental para el sistema inmunitario innato. El papel que desempeñan las células NK es análogo al de las células T citotóxicas en la respuesta inmunitaria adaptativa de los vertebrados. Las células NK proporcionan respuestas rápidas a las células infectadas por el virus y responden a la formación de tumores, actuando alrededor de 3 días después de la infección. Las células NK humanas y las células derivadas de las mismas incluyen células NK aisladas que no se han sometido a pases en cultivo, células NK que se han sometido a pases y se han mantenido en condiciones de cultivo celular sin inmortalización, y células NK que se han inmortalizado y se pueden mantener en condiciones de cultivo celular indefinidamente.

Tal como se utiliza en el presente documento, 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 como material de partida para la alteración genética que dio como resultado la célula genéticamente modificada; (b) una célula del mismo genotipo que la célula modificada genéticamente pero que se ha transformado con una construcción nula (es decir, con un constructo que no tiene ningún efecto conocido sobre el rasgo de interés); o, (c) una célula genéticamente idéntica a la célula modificada genéticamente pero que no está expuesta a condiciones o estímulos o modificaciones genéticas adicionales que inducirían la expresión de un genotipo o fenotipo alterado.

El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para lograr resultados biológicos y/o clínicos beneficiosos o deseables. La cantidad variará en función de la formulación o composición terapéutica (por ejemplo, célula modificada genéticamente, célula CAR-T, célula CAR-NK), de la enfermedad y su gravedad, y de la edad, el peso, la condición física y la capacidad de respuesta del sujeto a tratar. En realizaciones específicas, una cantidad efectiva de una célula que comprende un dominio coestimulador divulgado en el presente documento o las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento reduce al menos un síntoma o la progresión de una enfermedad.

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

- 5 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "cáncer" debe entenderse que abarca cualquier enfermedad neoplásica (sea o no invasiva o metastásica) que se caracteriza por un crecimiento celular anormal. Los cánceres invasivos o metastásicos tienen el potencial de extenderse a otras partes del cuerpo. Los cánceres con una división celular incontrolada pueden causar un crecimiento maligno o tumores, mientras que los cánceres con células que se dividen lentamente pueden causar un crecimiento benigno o tumores.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "carcinoma" se refiere a un crecimiento maligno formado por células epiteliales.
- 10 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "leucemia" se refiere a las enfermedades malignas de los órganos/sistemas hematopoyéticos y se caracteriza generalmente por una proliferación y desarrollo anormal de los leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea.
- Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "sarcoma" se refiere a un tumor que está formado por una sustancia como el tejido conectivo embrionario y que generalmente está compuesto por células estrechamente empaquetadas incrustadas en una sustancia fibrilar, heterogénea u homogénea.
- 15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "melanoma" se refiere a un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos.
- Tal como se utiliza en el presente documento, el término "linfoma" se refiere a un grupo de tumores de células sanguíneas que se desarrollan a partir de linfocitos.
- Tal y como se utiliza en este documento, el término "blastoma" se refiere a un tipo de cáncer que está causado por neoplasias en células precursoras o blastos (tejido inmaduro o embrionario).
- 20 Tal y como se utiliza en el presente 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. En algunas realizaciones, la secuencia de reconocimiento de una meganucleasa de la presente divulgación es de 22 pares de bases. Una meganucleasa puede ser una endonucleasa que proviene de I-Crel, y puede referirse a una variante de ingeniería de I-Crel que se ha modificado en relación con la I-Crel natural con respecto a, por ejemplo, la especificidad de unión al ADN, la actividad de escisión del ADN, la afinidad de unión al ADN o propiedades de dimerización. Los procedimientos para producir tales variantes modificadas de I-Crel son conocidos en la técnica (*por ejemplo* el documento WO 2007/047859). Una meganucleasa, tal como se utiliza en el presente documento, 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. La expresión "endonucleasa de anidamiento" es sinónimo del término "meganucleasa". Las meganucleasas de la presente divulgación son sustancialmente no tóxicas cuando se expresan en células, particularmente en células B humanas, de tal manera que las células se pueden transfectar y mantener a 37 °C sin observar efectos nocivos sobre la viabilidad celular o reducciones significativas en la actividad de escisión de meganucleasa cuando se mide usando los procedimientos descritos en el presente documento.
- 25 30 35 40 45 50 55 Tal como se utiliza en el presente documento, 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 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 sencilla se puede denominar "heterodímero de cadena sencilla" o "meganucleasa heterodimérica de cadena sencilla" aunque no es, de hecho, dimérica. En aras de la claridad, a menos que se especifique otra cosa, la expresión "meganucleasa" se puede referir a una meganucleasa dimérica o monocatenaria.
- Tal como se utiliza en el presente documento, 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 bajo condiciones fisiológicas. Un enlazador puede incluir, sin limitación, cualquiera de los abarcados por las Patentes de Estados Unidos Nos 8,445,251 y 9,434,931..
- Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "nucleasa de dedos de zinc" o "ZFN" se refiere a las proteínas químéricas que comprenden un dominio de unión al ADN de dedos de zinc fusionado a un dominio de nucleasa de una endonucleasa o exonucleasa, incluyendo, pero sin limitarse a ello, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de anidamiento, una nucleasa S1, una nucleasa de judía mungo, una ADNs I pancreática, una nucleasa micrococcal y una endonucleasa HO de levadura. Los dominios de nucleasas útiles para el diseño de nucleasas de dedos de zinc incluyen los de una endonucleasa de restricción de tipo IIs, incluyendo pero sin limitarse a la enzima de restricción FokI, FokM, StsI. Otras endonucleasas de restricción de tipo II se describen en la Publicación Internacional No WO 2007/014275. La estructura de un dominio de dedo de zinc se estabiliza mediante la coordinación de un ion de zinc. Las proteínas de unión al ADN que comprenden uno o más dominios de dedos de zinc se unen al

ADN de forma específica a la secuencia. El dominio del dedo de zinc se puede rediseñar a través de medios racionales o experimentales para producir una proteína que se une a una secuencia de ADN predeterminada de ~18 pares de bases de longitud. Véase, por ejemplo, La Pat. de los EE.UU. Nº 5.789.538, 5.925.523, 6.007.988, 6.013.453, 6.200.759 y la publicación internacional núm WO 95/19431, WO 96/06166, WO 98/53057, WO 98/54311, WO 00/27878, WO 01/60970, WO 01/88197 y WO 02/099084. Al fusionar este dominio proteico de ingeniería con la nucleasa FokI, es posible dirigir las roturas de ADN con especificidad a nivel del genoma. La selección de los sitios objetivo, las proteínas de dedos de zinc y los procedimientos para el diseño y la construcción de nucleasas de dedos de zinc son conocidos por los expertos en la materia y se describen en detalle en Publicaciones de EE.UU. nº 20030232410, 20050208489, 2005064474, 20050026157, 20060188987 y la Publicación Internacional No WO 07/014275.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "TALEN" se refiere a una endonucleasa que comprende un dominio de unión al ADN que comprende una pluralidad de repeticiones del dominio TAL fusionado a un dominio de nucleasa o a una porción activa del mismo de una endonucleasa o exonucleasa, incluyendo, pero sin limitarse a, una endonucleasa de restricción, una endonucleasa de anidamiento, una nucleasa S1, una nucleasa de judía mungo, una DNase I pancreática, una nucleasa micrococcal y una endonucleasa HO de levadura. Véase, por ejemplo, Christian et al. (2010) *Genetics* 186:757-761.

Los dominios de nucleasas útiles para el diseño de TALENs incluyen los de una endonucleasa de restricción de tipo IIs, incluyendo pero no limitándose a FokI, FoM, StsI, Hhal, HindIII, Nod, BbvCI, EcoRI, BgII y AlwI. Otras endonucleasas de restricción de tipo II se describen en la Publicación Internacional No WO 2007/014275. En algunas realizaciones, el dominio nucleasa del TALEN es un dominio nucleasa FokI o una porción activa del mismo. Las repeticiones del dominio TAL pueden derivarse de la familia de proteínas TALE (efector similar al activador de la transcripción) utilizadas en el proceso de infección por patógenos vegetales del género *Xanthomonas*. Las repeticiones del dominio TAL son secuencias de 33-34 aminoácidos con los aminoácidos 12 y 13 divergentes. Estas dos posiciones, denominadas dipéptido variable repetido (RVD), son muy variables y muestran una fuerte correlación con el reconocimiento de nucleótidos específicos. Cada par de bases de la secuencia diana de ADN es contactado por una sola repetición de TAL, con la especificidad resultante de la RVD. En algunas realizaciones, el TALEN comprende 16-22 repeticiones de dominio TAL. Las escisiones del ADN por un TALEN requiere dos regiones de reconocimiento del ADN que flanquean una región central inespecífica (es decir, el "espaciador"). El término "espaciador" en referencia a un TALEN se refiere a la secuencia de ácido nucleico que separa las dos secuencias de ácido nucleico reconocidas y unidas por cada monómero que constituye un TALEN. Las repeticiones del dominio TAL pueden ser secuencias nativas de una proteína TALE de origen natural o pueden ser rediseñadas por medios racionales o experimentales para producir una proteína que se une a una secuencia de ADN predeterminada (véase, por ejemplo, Boch et al. (2009), *Science* 326(5959): 1509-1512 y Moscou y Bogdanove (2009) *Science* 326(5959): 1501). Véase también, la publicación estadounidense nº 20110145940 y la Publicación Internacional No WO 2010/079430 para los procedimientos de ingeniería de un TALEN para reconocer una secuencia específica y ejemplos de RVDs y sus correspondientes nucleótidos objetivo. En algunas realizaciones, cada monómero de la nucleasa (por ejemplo, FokI) puede fusionarse con una secuencia efectora TAL que reconoce una secuencia de ADN diferente, y sólo cuando los dos sitios de reconocimiento están cerca, los monómeros inactivos se unen para crear una enzima funcional.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "TALEN compacta" se refiere a una endonucleasa que comprende un dominio de unión al ADN con una o más repeticiones del dominio TAL fusionadas en cualquier orientación a cualquier porción de la endonucleasa de localización I-TevI o a cualquiera de las endonucleasas enumeradas en la Tabla 2 de la Solicitud de EE.UU. nº 20130117869, incluyendo, pero no limitada a, Mmel, EndA, End1, I-BasI, I-TevII, I-TevIII, I-TevI, Mspl, Mval, NucA y NucM. Los TALEN compactos no requieren dimerización para la actividad de procesamiento del ADN, lo que alivia la necesidad de sitios objetivo dobles con espaciadores de ADN interviniéntes. En algunas realizaciones, el TALEN compacto comprende entre 16 y 22 repeticiones de dominio TAL.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "CRISPR" se refiere a una endonucleasa con base en la caspasa que comprende una caspasa, tal 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. El componente caspasa de una CRISPR es una endonucleasa de ADN guiada por ARN. En ciertas realizaciones, la caspasa es una enzima Cas de clase II. En algunas de estas realizaciones, la caspasa es una enzima de clase II, tipo II, como Cas9. En otras realizaciones, la caspasa es una enzima de clase II, tipo V, como la Cpf1. El ARN guía comprende una repetición directa y una secuencia guía (a menudo denominada espaciador en el contexto de un sistema CRISPR endógeno), que es complementaria al sitio de reconocimiento de la diana. En ciertas realizaciones, el CRISPR comprende además un tracrRNA (ARN transactivador CRISPR) que es complementario (total o parcialmente) a una secuencia de repetición directa (a veces denominada secuencia tracr-mate) presente en el ARN guía. En particular, la caspasa puede estar mutada con respecto a una enzima correspondiente de tipo salvaje, de manera que la enzima carece de la capacidad de escindir una cadena de un polinucleótido diana, funcionando como una nicasa, escindiendo sólo una cadena del ADN diana. Ejemplos no limitantes de enzimas caspasas que funcionan como nicasas incluyen las enzimas Cas9 con una mutación D10A dentro del dominio catalítico RuvC I, o con una mutación H840A, N854A o N863A.

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

5 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia de reconocimiento" se refiere a una secuencia de ADN que está unida y escindida por una endonucleasa. En el caso de una meganucleasa, una secuencia de reconocimiento comprende un par de "medios sitios" invertidos de 9 pares de bases que están separados por cuatro pares de bases. En el caso de una meganucleasa de cadena sencilla, el dominio N-terminal de la proteína contacta con un primer semisitio y el dominio C-terminal de la proteína contacta con un segundo semisitio. La escisión por una meganucleasa produce cuatro "salientes" de pares de bases en 3'. Los "salientes" o "extremos adhesivos" son segmentos cortos de ADN monocatenarios de cadena sencilla que se pueden producir mediante la escisión por endonucleasa de una secuencia de ADN bicatenario. En el caso de meganucleasas y meganucleasas de cadena sencilla derivadas de I-Crel, el saliente comprende las bases 10-13 de la secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases. En el caso de un TALEN compacto, la secuencia de reconocimiento comprende una primera secuencia CNNNGN que es reconocida por el dominio I-TevI, seguido de un espaciador no específico de 4-16 pares de bases de longitud, seguido de una segunda secuencia de 16-22 pb de longitud que es reconocida por el dominio efector TAL (esta secuencia típicamente tiene una base de T en 5'). La escisión por un TALEN compacto produce dos salientes de pares de bases en 3'. En el caso de una CRISPR, la secuencia de reconocimiento es la secuencia, típicamente de 16-24 pares de bases, a la que el ARN guía se une a la escisión directa de Cas9. La complementariedad total entre la secuencia guía y la secuencia de reconocimiento no es necesariamente necesaria para efectuar la escisión. La escisión por una CRISPR puede producir extremos romos (como por una caspasa de clase II, tipo II) o extremos sobresalientes (como por una caspasa de clase II, tipo V), dependiendo de la caspasa. En aquellas realizaciones en las que se utiliza una caspasa Cpfl, la escisión por el complejo CRISPR que comprende la misma dará lugar a salientes de 5' y, en ciertas realizaciones, a salientes de 5 nucleótidos. Cada enzima caspasa también requiere el reconocimiento de una secuencia PAM (motivo adyacente al protoespaciador) que esté cerca de la secuencia de reconocimiento complementaria al ARN guía. La secuencia precisa, los requisitos de longitud de la PAM y la distancia a la secuencia diana difieren según la enzima caspasa, pero las PAM suelen ser secuencias de 2 a 5 pares de bases adyacentes a la secuencia diana/de reconocimiento. Las secuencias PAM para determinadas enzimas caspasas son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 8.697.359 y Publicación estadounidense nº 20160208243) y las secuencias PAM para enzimas caspasas nuevas o modificadas pueden identificarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica, como un ensayo de agotamiento de PAM (véase, por ejemplo, Karvelis et al. (2017) Methods 121-122 3-8.)

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

35 Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos "gen del receptor de células T alfa" o "gen del TCR alfa" son intercambiables y se refieren al locus de una célula T que codifica la subunidad del receptor de células T alfa. El receptor de células T alfa puede referirse al número de identificación del gen 6955 del NCBI, antes o después del reordenamiento. Tras el reordenamiento, el gen del receptor de células T alfa comprende un promotor endógeno, segmentos V y J reordenados, un sitio donante de empalme endógeno, un intrón, un sitio aceptor de empalme endógeno y el locus de la región constante del receptor de células T alfa, que comprende los exones codificantes de la subunidad.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "gen de la región constante del receptor de células T alfa" se refiere a la secuencia de codificación del gen del receptor de células T alfa. El gen de la región constante del receptor de células T alfa incluye la secuencia de tipo salvaje, y sus variantes funcionales, identificadas por el NCBI Gen ID NO. 28755.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, la indicación de un intervalo numérico para una variable pretende transmitir que la presente divulgación 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  $\geq 0$  y  $\leq 2$  si la variable es intrínsecamente continua.

## **2.1 Principio de la invención**

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

55 La presente divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de que los dominios coestimuladores de ingeniería pueden demostrar una actividad equivalente o superior en comparación con los dominios coestimuladores convencionales. En ejemplos específicos, los dominios coestimuladores aquí divulgados tienen una actividad coestimuladora equivalente o superior en términos de proliferación celular tras la activación inducida por antígenos y/o la secreción de citoquinas. En algunas realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende

una secuencia de ácido nucleico que codifica uno de los dominios coestimuladores divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, el dominio coestimulador se expresa en una célula modificada genéticamente como parte de un constructo tal como, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico o un constructo regulador inducible. En consecuencia, se proporcionan células que comprenden los novedosos dominios coestimuladores aquí divulgados, así como procedimientos para fabricar células que comprenden los novedosos dominios coestimuladores. Además, se divultan en el presente documento células modificadas genéticamente que comprenden un dominio coestimulador divulgado en el presente documento para su uso en la reducción de los síntomas o la gravedad de una enfermedad. En algunas realizaciones, la administración de células modificadas genéticamente que comprenden los dominios coestimuladores divulgados en el presente documento reduce los síntomas o la gravedad de las enfermedades, como los cánceres, los trastornos autoinmunes y otras afecciones que pueden ser objeto de las células modificadas genéticamente de la presente divulgación. También se divultan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden una célula genéticamente modificada divulgada en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en procedimientos de inmunoterapia para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite.

15 **2.2 Moléculas de ácido nucleico que codifican dominios coestimuladores**

Se proporcionan aquí moléculas de ácido nucleico que codifican novedosos dominios coestimuladores y variantes de los mismos que tienen actividad coestimuladora (*es decir*, variantes activas). La actividad coestimuladora de un dominio individual puede determinarse utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica que mida la activación, la proliferación y la secreción de citoquinas de las células, como las células inmunitarias. Un ejemplo de este procedimiento es el divulgado en Linsley et al., *Journal of Experimental Medicine* 176 (1992), 1595-604. Otros ejemplos incluyen los procedimientos aquí descritos para medir la proliferación celular y la secreción de citoquinas.

En consecuencia, se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios coestimuladores establecidos en las SEQ ID NO: 5-8 y sus variantes activas. En concreto, la secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 1 codifica el dominio coestimulador de SEQ ID NO: 5, denominado en el presente documento dominio de Novell. La secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 2 codifica el dominio coestimulador de SEQ ID NO: 6, denominado en el presente documento dominio Novel3. La secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 3 codifica el dominio coestimulador de SEQ ID NO: 7, denominado en el presente documento dominio Novel5. La secuencia de ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO: 4 codifica el dominio coestimulador de SEQ ID NO: 8, denominado en el presente documento dominio Novel6.

30 También se proporcionan en el presente documento variantes activas de las secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios coestimuladores divulgados en el presente documento, en las que las secuencias de ácido nucleico variantes codifican un dominio que tiene actividad coestimuladora. Además, se proporcionan variantes de los dominios coestimuladores divulgados aquí que conservan la actividad coestimuladora. Tal como se usa en el presente documento, "variantes" pretende significar secuencias sustancialmente similares. Se pretende que una "variante" de polipéptido signifique un polipéptido que proviene del polipéptido "natural" mediante delección o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos en la proteína natural y/o sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en el polipéptido natural. Asimismo, un polinucleótido "variante" es un polinucleótido derivado del polinucleótido "nativo" por delección y/o adición de uno o más ácidos nucleicos en uno o más sitios de la secuencia de nucleótidos nativa. Tal como se usa en el presente documento, un polinucleótido o polipéptido "natural" comprende una secuencia original a partir de la cual se obtienen las variantes. Las secuencias parentales de ácido nucleico de los polinucleótidos variantes que codifican los dominios coestimuladores pueden incluir las SEQ ID NO: 1-4. Asimismo, las secuencias polipeptídicas parentales de los polipéptidos variantes que codifican los novedosos dominios coestimuladores pueden incluir las SEQ ID NOs: 5-8.

45 **0094]** Los polipéptidos variantes abarcados por las divulgaciones son biológicamente activos. Es decir, siguen poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa; es decir, *la* actividad coestimuladora. Dichas variantes pueden, por ejemplo, ser resultado de la manipulación humana. Variantes biológicamente activas de un dominio coestimulador nativo de la divulgación (*por ejemplo*, SEQ ID NOs: 5-8), o variantes de las secuencias de ácido nucleico nativas (*por ejemplo*, SEQ ID NOs: 1-4) que codifica los dominios coestimuladores descritos en este documento, tendrán al menos aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 %, de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del polipéptido nativo o la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido nativo, según lo determinado por los programas de alineamiento de secuencias y los parámetros descritos en otra parte del presente documento. Una variante biológicamente activa de un dominio coestimulador de la divulgación puede diferir de ese dominio coestimulador polipéptido en tan pocos como aproximadamente 1-20 residuos de aminoácidos, tan pocos como aproximadamente 1-10, tan pocos como aproximadamente 1-5, tan pocos como aproximadamente 4, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

60 Los polipéptidos de las realizaciones se pueden alterar de diversas maneras, incluyendo sustituciones, eliminaciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los procedimientos para tales manipulaciones son generalmente

conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de la secuencia de aminoácidos se pueden preparar mediante mutaciones en el ADN. Los procedimientos para mutagénesis y alteraciones de polinucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 Kunkel et al. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382 Pat. de EE.UU. No. 4,873,192 Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York) y las referencias allí citadas. Se pueden encontrar directrices sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Las sustituciones conservadoras, tales como el cambio de un aminoácido por otro con propiedades similares, pueden ser óptimas.

5 Dependiendo del contexto, "fragmento" se refiere a una porción de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o proteína, o polinucleótido que codifica una porción de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido o proteína. Los fragmentos pueden conservar la actividad de la proteína original y, por lo tanto, dichos fragmentos "activos" incluyen, por ejemplo, fragmentos de dominio coestimulador, como un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 5-8 que conserva la actividad coestimuladora. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio coestimulador, como un fragmento de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4 puede codificar un fragmento de proteína que es biológicamente activo. Se puede preparar un fragmento de nucleótido biológicamente activo aislando una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador, expresando la porción codificada del dominio coestimulador y evaluando la actividad de la porción codificada del dominio coestimulador. Los fragmentos de dominios coestimuladores incluyen fragmentos de las SEQ ID NOS: 5-8. Los fragmentos de dominios coestimuladores comprenden al menos aproximadamente 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 o 42 aminoácidos.

10 Las variantes o fragmentos de los dominios coestimuladores divulgados en el presente documento pueden comprender al menos un motivo de unión al Factor Asociado al TNFR (TRAF), referido en el presente documento como motivos TRAF. Los ejemplos de motivos TRAF proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, QMED (SEQ ID NO:9), QEED (SEQ ID NO:10) y EEEG (SEQ ID NO:11). Por ejemplo, las variantes o fragmentos activos de los dominios coestimuladores aquí divulgados pueden comprender la SEQ ID NO: 9 y las SEQ ID NO: 10 y 11.

15 25 30 35 Los dominios coestimuladores o variantes o fragmentos de los mismos pueden comprender dos motivos TRAF separados por una región espaciadora. Como se utiliza en el presente documento, el término "región espaciadora" se refiere a la región entre dos motivos TRAF predichos de un dominio coestimulador. La región espaciadora puede comprender una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ASSCRCPQ (SEQ ID NO: 12), ASSCRFPE (SEQ ID NO: 13), ASSCRFPQ (SEQ ID NO: 14), y ASSCRAPS (SEQ ID NO: 15). En variantes específicas de dominios coestimuladores activos, la región espaciadora de SEQ ID NO: 12 se encuentra entre los motivos de unión a TRAF de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 11. En otras variantes activas de dominios coestimuladores, la región espaciadora de SEQ ID NO: 13 se encuentra entre los motivos de unión a TRAF de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. En algunas variantes activas de dominios coestimuladores, la región espaciadora de SEQ ID NO: 14 se encuentra entre los motivos de unión a TRAF de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. En otras variantes activas de dominios coestimuladores, la región espaciadora de SEQ ID NO: 15 se encuentra entre los motivos de unión a TRAF de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. Alternativamente, la región espaciadora podría ser cualquier secuencia que mantenga la actividad coestimuladora del dominio variante.

40 45 50 En ciertas realizaciones, se proporcionan casetes de expresión o constructos de expresión para la expresión de al menos un dominio coestimulador divulgado aquí, o una variante activa del mismo, en una célula. En algunas realizaciones, el casete incluye secuencias reguladoras 5' y 3' enlazadas operativamente a una molécula de ácido nucleico proporcionada en el presente documento que codifica un novedoso dominio coestimulador, o una variante activa del mismo. Se entiende por "operativamente enlazado" un enlace funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, un enlace operable entre una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador como se divulga en el presente documento y una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor) es un enlace funcional que permite la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio coestimulador. Los elementos enlazados operativamente pueden ser contiguos o no contiguos. Cuando se utiliza para referirse a la unión de dos regiones codificantes de proteínas, por operativamente enlazado se entiende que las regiones codificantes están en el mismo marco de lectura.

55 En algunas realizaciones, el casete comprende además al menos un gen adicional para ser co-transformado en una célula. En otras realizaciones, el o los genes adicionales se proporcionan en múltiples casetes de expresión. En algunas realizaciones, dicho casete de expresión está provisto de una pluralidad de sitios de restricción y/o sitios de recombinación para la inserción de un polinucleótido recombinante que estará bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras. En algunas realizaciones, el casete de expresión contiene además genes marcadores seleccionables.

60 En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye en la dirección 5'-3' de la transcripción, una región de iniciación transcripcional y traslacional (es decir, un promotor), una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador, o una variante activa del mismo, como se divulga en el presente documento, y una región de terminación transcripcional y traslacional (es decir, una región de terminación) funcional en las células modificadas genéticamente de la presente divulgación. Las regiones reguladoras (es decir, los promotores, las regiones

reguladoras de la transcripción y las regiones de terminación de la traducción) y/o una molécula de ácido nucleico proporcionada en el presente documento pueden ser nativas/análogas a la célula huésped o entre sí. Alternativamente, las regiones reguladoras y/o una molécula de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento pueden ser heterólogas a la célula huésped o entre sí. Tal y como se utiliza en el presente documento, "heteróloga" en referencia a una secuencia es una secuencia que se origina en una especie extranjera o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificada de su forma nativa en composición y/o locus genómico por la intervención humana deliberada. Por ejemplo, un promotor enlazado operativamente a una molécula de ácido nucleico heteróloga es de una especie diferente a la especie de la que se derivó la molécula de ácido nucleico, o, si es de la misma especie o de una especie análoga, uno o ambos están sustancialmente modificados con respecto a su forma original y/o locus genómico, o el promotor no es el promotor nativo de la molécula de ácido nucleico enlazada operativamente. Alternativamente, las regiones reguladoras y/o una molécula de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento pueden ser totalmente sintéticas.

La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación transcripcional, puede ser nativa con la molécula de ácido nucleico enlazada operativamente, puede ser nativa con el huésped celular, o puede derivarse de otra fuente (es decir, ajena o heteróloga) al promotor, la molécula de ácido nucleico, el huésped celular, o cualquier combinación de los mismos. Al preparar el casete de expresión, los diversos fragmentos de ADN pueden ser manipulados, de manera que las secuencias de ADN estén en la orientación adecuada. Con este fin, se pueden emplear adaptadores o enlazadores para unir los fragmentos de ADN o se pueden realizar otras manipulaciones para proporcionar sitios de restricción convenientes, eliminar el ADN superfluo, eliminar los sitios de restricción o similares. Para ello, pueden intervenir la mutagénesis *in vitro*, la reparación de cebadores, la restricción, el recocido, las resustituciones, por ejemplo, las transiciones y las transversiones.

En algunas realizaciones, se utilizan varios promotores en los cassetes de expresión aquí proporcionados. Un ejemplo de promotor adecuado es la secuencia promotora temprana inmediata del citomegalovirus (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte, capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica unida operativamente a ella. Otro ejemplo de promotor adecuado es el factor de crecimiento de elongación-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ). Sin embargo, también pueden utilizarse otras secuencias promotoras constitutivas, como, por ejemplo, el promotor temprano del virus simio 40 (SV40), el virus del tumor mamario del ratón (MMTV), el promotor de la repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el promotor del MoMuLV un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos como, por ejemplo, el promotor de la actina, el promotor de la miosina, el promotor de la hemoglobina y el promotor de la creatina quinasa. Además, la presente divulgación no debe limitarse al uso de promotores constitutivos. Los promotores inducibles también se contemplan como parte de la presente divulgación. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia polinucleotídica a la que está enlazado operativamente cuando se desea dicha expresión, o de desactivar la expresión cuando no se desea. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a un promotor de metalotioneína, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina. También se contemplan promotores sintéticos como parte de la presente divulgación, por ejemplo, el promotor JeT (véase, WO/2002/012514).

En algunas realizaciones, los promotores se seleccionan en función del resultado deseado. Se reconoce que las diferentes aplicaciones pueden ser mejoradas por el uso de diferentes promotores en los cassetes de expresión para modular el tiempo, la ubicación y/o el nivel de expresión de los polinucleótidos aquí divulgados. Tales constructos de expresión también pueden contener, si se desea, una región reguladora del promotor (por ejemplo, una que confiera una expresión inducible, constitutiva, regulada por el entorno o el desarrollo, o específica/selectiva de la célula o el tejido), un sitio de inicio de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, una señal de procesamiento del ARN, un sitio de terminación de la transcripción, y/o una señal de poliadenilación.

Para evaluar la expresión de un dominio coestimulador o de un polipéptido CAR que comprenda un dominio coestimulador, el casete de expresión puede contener también un gen marcador seleccionable o un gen informador, o ambos, para facilitar la identificación y selección de las células expresantes de la población de células que se pretende transfectar o infectar mediante vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede llevarse en un fragmento separado de ADN y utilizarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes informadores pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras adecuadas para permitir la expresión en las células huésped. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a los antibióticos y genes marcadores fluorescentes.

Se proporcionan cassetes de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican CARs que incluyen al menos un dominio coestimulador, o una variante activa del mismo, divulgada en el presente documento. Tal y como se utiliza en el presente documento, un "casete de expresión de CAR" se refiere a un casete de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR. Un casete de expresión de CAR puede codificar un CAR sin un dominio coestimulador. Un casete de expresión de CAR también puede codificar un CAR que comprenda un dominio coestimulador tal como se divulga en el presente documento, o puede codificar un CAR que comprenda un dominio coestimulador que no se divulga en el presente documento. Por ejemplo, un casete de expresión puede comprender una o más secuencias que codifican un dominio de unión al ligando extracelular y un dominio estimulador intracelular que comprende un dominio coestimulador, o una variante activa del mismo, como se

divulga en el presente documento. El dominio de unión al ligando extracelular puede ser específico para un antígeno de una célula cancerosa, como, por ejemplo, un antígeno específico del linfoma de células B.

El casete de expresión puede codificar un CAR que comprende un scFv anti-CD 19, el dominio coestimulador de Novell (SEQ ID NO: 5), o una variante activa del mismo, y un dominio de señalización CD3ζ. El casete de expresión

5 puede codificar un CAR que comprende un scFv anti-CD19, el dominio coestimulador Novel3 (SEQ ID NO: 6), o una variante activa del mismo, y un dominio de señalización CD3ζ. El casete de expresión puede codificar un CAR que comprende un scFv anti-CD19, el dominio coestimulador Novel5 (SEQ ID NO: 7), o una variante activa del mismo, y un dominio de señalización CD3ζ. El casete de expresión puede codificar un CAR que comprende un scFv anti-CD19, el dominio coestimulador Novel6 (SEQ ID NO: 8), o una variante activa del mismo, y un dominio de señalización CD3ζ.

10 Se contempla que estos casetes de expresión pueden ser diseñados para tener especificidad para cualquier antígeno o molécula específica de la enfermedad.

También se proporcionan casetes de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican un constructo regulador inducible que incluye al menos un dominio coestimulador divulgado en el presente documento, o una variante activa del mismo. Tal como se utiliza en el presente documento, un "casete de expresión reguladora" se

15 refiere a un casete de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un constructo regulador inducible. Un casete de expresión puede ser tanto un casete de expresión CAR como un casete de expresión regulador. Un único casete de expresión puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifique un CAR que no comprenda un dominio coestimulador de cualquiera de las SEQ ID NO: 5-8, o fragmentos activos o variantes de las mismas, y una secuencia de nucleótidos que codifica un constructo regulador inducible como se describe en el

20 presente documento.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, los casetes de expresión comprenden secuencias que codifican un dominio de unión y al menos un dominio coestimulador, o una variante activa del mismo, como se divulga en el presente documento, en el que una pequeña molécula, anticuerpo u otra molécula se une al dominio de unión para inducir la dimerización de dos constructos reguladores inducibles. En algunas realizaciones, dicha dimerización inicia la señal

25 coestimuladora a la célula para promover la proliferación, la supervivencia y/o la secreción de citoquinas. En algunas realizaciones, en las que el dominio de unión puede unir una pequeña molécula, el dominio de unión comprende un análogo de FKBP12 (por ejemplo, que comprende una sustitución F36V) y la pequeña molécula es rimiducid (*es decir*, AP1903). En la presente divulgación se contempla cualquier dominio de unión conocido en la técnica que sea útil en dichos constructos reguladoras inducibles, como los interruptores de seguridad de células CAR-T y similares.

30 El casete de expresión puede codificar un constructo regulador inducible que comprende un dominio de unión y el dominio coestimulador de Novell (SEQ ID NO: 5), o una variante activa del mismo. El casete de expresión puede codificar un constructo regulador inducible que comprende un dominio de unión y el dominio coestimulador Novel13 (SEQ ID NO: 6), o una variante activa del mismo. El casete de expresión puede codificar un constructo regulador inducible que comprende un dominio de unión y el dominio coestimulador Novel5 (SEQ ID NO: 7), o una variante

35 activa del mismo. El casete de expresión puede codificar un constructo regulador inducible que comprende un dominio de unión y el dominio coestimulador Novel6 (SEQ ID NO: 8), o una variante activa del mismo.

También se proporcionan aquí vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican los novedosos dominios coestimuladores de la presente divulgación. En algunas realizaciones, los vectores comprenden una

40 molécula de ácido nucleico que codifica los novedosos dominios coestimuladores o un casete de expresión como se divulga en el presente documento. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos que codifican los dominios coestimuladores aquí divulgados se clavan en varios tipos de vectores. Por ejemplo, en algunas realizaciones el ácido nucleico se clava en un vector que incluye, entre otros, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de especial interés son los de expresión, los vectores de replicación, los vectores de generación de sondas y los vectores de secuenciación.

45 En realizaciones específicas, las moléculas de ácido nucleico que codifican un dominio coestimulante se proporcionan en vectores virales, tales como vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales y vectores virales adenoasociados (AAV). La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus útiles como vectores incluyen, entre otros, los retrovirus,

50 los adenovirus, los virus adenoasociados, los virus del herpes y los lentivirus. En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasas de restricción convenientes, y uno o más marcadores seleccionables, (por ejemplo, WO 01/96584 WO 01/29058y U.S. Pat. N° 6.326.193).

### **2.3 Receptores químicos de antígenos (CAR) y constructos reguladores inducibles**

55 En el presente documento se proporcionan células modificadas genéticamente que expresan un receptor de antígeno químico (CAR) de superficie celular. Generalmente, un CAR de la presente divulgación comprenderá al menos un dominio extracelular y un dominio intracelular. En algunas realizaciones, el dominio extracelular comprende un elemento de unión específico de la diana, también denominado dominio o fracción de unión al ligando. En algunas realizaciones, el dominio intracelular, o dominio citoplasmático, comprende al menos un dominio coestimulador, o una

variante activa del mismo, como se divulga en el presente documento, y uno o más dominios de señalización como, por ejemplo, CD3  $\zeta$ . Por ejemplo, los CAR divulgados en el presente documento pueden comprender un dominio intracelular que comprenda al menos un dominio coestimulador, como los proporcionados en las SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa del mismo. Los CARs divulgados en el presente documento pueden comprender al menos dos dominios coestimuladores, en los que al menos uno de los dominios coestimuladores se establece en las SEQ ID NOs: 5-8, o un fragmento activo o una variante divulgada en el presente documento.

En algunas realizaciones, un CAR de la presente divulgación comprende un elemento de unión extracelular, específico de la diana, denominado de otro modo como dominio o fracción de unión al ligando. La elección del dominio de unión al ligando depende del tipo y número de ligandos que definen la superficie de una célula objetivo. Por ejemplo, el dominio de unión al ligando puede elegirse para reconocer un ligando que actúe como marcador de la superficie celular en las células diana asociadas a un estado de enfermedad concreto. Por lo tanto, los ejemplos de marcadores de superficie celular que pueden actuar como ligandos para el dominio de unión a ligando en el CAR de la presente divulgación pueden incluir aquellos asociados con infecciones virales, bacterianas y parasitarias, enfermedades autoinmunes y células cancerosas. En algunas realizaciones, el CAR de la presente divulgación se diseña para dirigirse a un antígeno tumoral de interés mediante la ingeniería de una fracción de unión al ligando deseada que se une específicamente a un antígeno en una célula tumoral. En el contexto de la presente divulgación, "antígeno tumoral" se refiere a antígenos comunes a trastornos hiperproliferativos específicos como el cáncer.

En algunas realizaciones, el dominio de unión al ligando extracelular es específico para cualquier antígeno o epítopo de interés. Como ejemplos no limitativos, en algunas realizaciones el antígeno de la diana es un antígeno de superficie asociado a un tumor, como ErbB2 (HER2/neu), antígeno carcinoembrionario (CEA), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante III de EGFR (EGFRvIII), CD19, CD20, CD30, CD40, disialogangliósido GD2, mucina ductal-epitelial, gp36, TAG-72, glucoesfingolípidos, antígeno asociado a glioma, gonadotropina coriónica humana B, alfafetoproteína (AFP), AFP reactivo con lectina, tiroglobulina, RAGE-1, MN-CA IX, transcriptasa inversa de telomerasa humana, RU1, RU2 (AS), carboxil esterase intestinal, mut hsp70-2, M-CSF, prostasa, antígeno prostático específico (PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGA-1a, p53, prostein, PSMA, supervivencia y telomerasa, antígeno tumoral de carcinoma de próstata-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, elastasa de neutrófilos, efrina B2, CD22, factor de crecimiento de insulina (IGF)-I, IGF-II, receptor IGF, mesotelina, una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que presenta un epítope peptídico específico del tumor pe, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, antígenos del estroma tumoral, el dominio extra A (EDA) y el dominio extra B (EDB) de fibronectina y el dominio A1 de tenascina-C (TnC A1) y proteína asociada a fibroblastos (fap); un antígeno específico de linaje o específico de tejido como CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD33, CD133, CD138, CTLA-4, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), endoglin, un importante molécula del complejo de histocompatibilidad (MHC), BCMA (CD269, TNFRSF 17), CS1 o un antígeno de superficie específico del virus, como un antígeno específico del VIH (como la gpl20 del VIH); un antígeno específico de EBV, un antígeno específico de CMV, un antígeno específico de HPV como las oncoproteínas E6 o E7, un antígeno específico del virus de Lasse, un antígeno específico del virus de la influenza, así como cualquier derivado o variante de estos marcadores de superficie. En una realización particular de la invención, el dominio de unión al ligando es específico para CD19.

En algunas realizaciones, el dominio extracelular de un receptor de antígeno químérico también puede comprender un autoantígeno (véase, Payne et al. (2016) *Science*, Vol. 353 (6295): 179-184), que puede ser reconocido por los receptores de células B específicas de autoantígeno en linfocitos B, dirigiendo así a las células T al direccionamiento y la destrucción específica de los linfocitos B autorreactivos en enfermedades autoinmunes mediadas por anticuerpos. Dichos CARs pueden denominarse receptores químéricos de autoanticuerpos (CAARs), y la incorporación de uno o más dominios coestimuladores descritos en el presente documento en dichos CAARs está comprendida en la presente divulgación.

En algunas realizaciones, un CAR divulgado en el presente documento comprende además un dominio transmembrana que une el dominio de unión al ligando extracelular o al autoantígeno con los dominios de señalización intracelular y coestimuladores. En algunas realizaciones, el dominio transmembrana es un polipéptido transmembrana CD8a.

El dominio de señalización intracelular de un CAR de la presente divulgación es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula en la que se ha colocado el CAR y/o la activación de las vías proliferativas y de supervivencia celular. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. La función efectora de una célula T, por ejemplo, puede ser la actividad citolítica o la actividad de ayuda, incluida la secreción de citoquinas. Un dominio de señalización intracelular, como el CD3  $\zeta$ , puede proporcionar una señal de activación a la célula en respuesta a la unión del dominio extracelular. Como se ha comentado, la señal de activación puede inducir una función efectora de la célula como, por ejemplo, la actividad citolítica o la secreción de citoquinas.

En algunas realizaciones, el dominio intracelular incluye uno o más dominios coestimuladores intracelulares, como los descritos en el presente documento, que transmiten una señal coestimuladora que promueve la proliferación celular, la supervivencia celular y/o la secreción de citoquinas tras la unión del dominio extracelular. En algunas realizaciones, dichos dominios coestimuladores intracelulares incluyen, sin limitación, cualquier dominio coestimulador divulgado en

el presente documento o aquellos dominios conocidos en la técnica, como, por ejemplo, un dominio CD28, un dominio 4-1BB, un dominio OX-40, un dominio ICOS o un dominio CD27.

También se proporcionan aquí células modificadas genéticamente que expresan un constructo regulador inducible. En algunas realizaciones, un constructo regulador inducible es un constructo transmembrana o intracelular que se

5 expresa en una célula y que proporciona una señal coestimuladora inducible para promover la proliferación celular, la supervivencia celular y/o la secreción de citoquinas. En algunas realizaciones, los constructos reguladores inducibles comprenden uno o más dominios coestimuladores, como los descritos en el presente documento y/u otros conocidos en la técnica, que proporcionan una señal coestimuladora tras la activación. Generalmente, una señal coestimuladora puede ser inducida, por ejemplo, por la homodimerización de dos polipéptidos de construcción reguladora inducible.

10 Un constructo regulador inducible comprende típicamente un dominio de unión que permite la homodimerización tras la unión de una pequeña molécula, un anticuerpo u otra molécula que permite la homodimerización de dos polipéptidos de la construcción. La dimerización puede iniciar la señal coestimuladora a la célula para promover la proliferación, la supervivencia y/o la secreción de citoquinas. En algunas realizaciones, en las que el dominio de unión se une a una pequeña molécula, el dominio de unión comprende un análogo de FKBP12 (por ejemplo, que comprende una

15 sustitución F36V) y la pequeña molécula es rimiducid (es decir, AP1903). En la presente divulgación se contempla cualquier dominio de unión conocido en la técnica que sea útil en dichos constructos reguladoras inducibles, como los interruptores de seguridad de células CAR-T y similares.

20 El dominio de señalización intracelular de un CAR de la presente divulgación puede comprender un dominio de señalización derivado de CD3  $\zeta$  y al menos un dominio coestimulador novedoso, como SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa del mismo.

Los constructos reguladores inducibles aquí divulgados pueden comprender un dominio de unión, que permite la dimerización de dos constructos, y al menos un novedoso dominio coestimulador, como la SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa de la misma.

#### **2.4 Procedimientos para producir vectores virales recombinantes**

25 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona vectores AAV recombinantes para su uso en los procedimientos de la presente divulgación. Los vectores de AAV recombinantes se producen típicamente en líneas celulares de mamíferos tales como HEK-293. Dado que los genes virales *cap* y *rep* se eliminan del vector para evitar su autorreplicación y para dejar espacio a los genes terapéuticos que se van a suministrar (por ejemplo, el gen de la endonucleasa), es necesario proporcionarlos *en trans* en la línea celular de empaquetamiento. Además, es necesario proporcionar los componentes "ayudantes" (por ejemplo, adenovirales) necesarios para apoyar la replicación (Cots et al. 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 interviniante que se empaquetará en el virus. Las partículas virales que

30 comprenden un genoma (ITR y genes intervinientes 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 a los genes de interés en células, tejidos u organismo, tal como un paciente humano. En consecuencia, se proporcionan procedimientos en el presente

35 documento para producir vectores AAV recombinantes que comprenden al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador descrito en el presente documento, como las SEQ ID NO: 5-8, o sus variantes activas. Asimismo, se proporcionan procedimientos en el presente documento para producir vectores AAV recombinantes que codifican CARs o constructos reguladores inducibles que incluyen al menos un dominio coestimulador descrito en el presente documento, como las SEQ ID NOs: 5-8, o sus variantes activas.

40 45 En algunas realizaciones, la transferencia genética se lleva a cabo mediante vectores lentivirales. Los lentivirus, a diferencia de otros retrovirus, pueden utilizarse en algunos contextos para transducir ciertas células que no se dividen. Entre los ejemplos no limitantes de vectores lentivirales se incluyen los derivados de un lentivirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), el VIH-2, el virus de la inmunodeficiencia simia (VIS), el virus linfotrópico T humano 1 (HTLV-1), el HTLV-2 o el virus de la anemia por infección equina (E1AV). Por ejemplo, se han generado vectores lentivirales mediante la atenuación múltiple de los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, se eliminan los genes *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*, lo que hace que el vector sea más seguro para fines terapéuticos. Los vectores lentivirales son conocidos en la técnica, véase Naldini et al, (1996 y 1998); Zufferey et al, (1997); Dull et al, 1998, Pat. de EE.UU. Números 6.013.516 y 5.994.136). En algunas realizaciones, estos vectores virales están basados en plásmidos o en virus, y están configurados para llevar las secuencias esenciales para incorporar ácido nucleico extraño, para la selección y para la transferencia del ácido nucleico a una célula huésped. Los lentivirus conocidos pueden obtenerse fácilmente de depósitos o colecciones como la American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209), o aislarse de fuentes conocidas mediante técnicas comúnmente disponibles.

50 55 60 En realizaciones específicas, los vectores lentivirales se preparan utilizando un plásmido que codifica los genes *gag*, *pol*, *tat* y *rev* clonados a partir del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y un segundo plásmido que codifica la

proteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) utilizado para pseudotipificar las partículas virales. Puede utilizarse un vector de transferencia, como el vector pCDH-EF1-MCS, con un promotor adecuado, como el promotor JeT o el promotor EF1. Los dominios de señalización de CAR, como los dominios coestimuladores aquí divulgados, y las variantes activas de los mismos, pueden insertarse a continuación del promotor, seguidos de un IRES y GFP. A continuación, los tres plásmidos pueden transfectarse en células lentivirus, como las células Lenti-X-293T, y los lentivirus pueden cosecharse, concentrarse y cribarse tras un tiempo de incubación adecuado. En consecuencia, se proporcionan procedimientos en el presente documento para producir vectores lentivirales recombinantes que comprenden al menos una secuencia de ácido nucleico un dominio coestimulador descrito en el presente documento, como SEQ ID NOs: 5-8, o sus variantes activas. Asimismo, se proporcionan procedimientos en el presente documento para producir vectores lentivirales recombinantes que codifican un CAR o un constructo regulador inducible que incluye al menos un dominio coestimulador descrito en el presente documento, como las SEQ ID NO: 5-8, o sus variantes activas.

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

En el presente documento se proporcionan células modificadas genéticamente para que contengan al menos un novedoso dominio coestimulador, como la SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa de las mismas, tal y como se describe en el presente documento. La célula modificada genéticamente puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR o un constructo regulador inducible que incorpora al menos un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento, como la SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa de la misma. En diferentes variaciones de la presente divulgación, una molécula de ácido nucleico o un casete de expresión que codifica un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento está presente dentro del genoma de la célula modificada genéticamente o, alternativamente, no está integrado en el genoma de la célula. En algunas realizaciones en las que la molécula de ácido nucleico o el casete de expresión no está integrado en el genoma, la molécula de ácido nucleico o el casete de expresión está presente en la célula modificada genéticamente en un constructo de ADN recombinante, en un ARNm, en un genoma viral o en otro ácido nucleico que no está integrado en el genoma de la célula. En realizaciones particulares, la célula modificada genéticamente puede comprender una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador descrito en el presente documento y comprender además al menos un casete de expresión divulgado en el presente documento que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un CAR que no comprende un dominio coestimulador divulgado en el presente documento y/o una secuencia de nucleótidos que codifica un constructo regulador inducible.

En algunas células modificadas genéticamente incluidas en el presente documento, la molécula de ácido nucleico que codifica un CAR o un constructo regulador inducible que incorpora al menos un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento, se posiciona con el gen del receptor de células T alfa endógeno de la célula. En algunas de estas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se posiciona dentro del gen de la región constante del receptor de células T alfa endógeno, como por ejemplo dentro del exón 1 del gen de la región constante del receptor de células T alfa.

Las células que comprenden los novedosos dominios coestimuladores, o sus variantes activas, pueden ser células eucariotas. Las células que comprenden los novedosos dominios coestimuladores, o variantes activas de los mismos, pueden ser células T o células NK, particularmente células T o NK humanas. Las células pueden ser células T primarias o células NK primarias.

Las células T y las células NK pueden obtenerse de varias fuentes, incluyendo las células mononucleares de la sangre periférica, la médula ósea, el tejido de los ganglios linfáticos, la sangre del cordón umbilical, el tejido de un sitio de infección, la ascitis, el derrame pleural, el tejido del bazo y los tumores. Se puede utilizar cualquier número de líneas de células T y NK disponibles en la técnica. Las células T y las células NK pueden obtenerse a partir de una unidad de sangre recogida de un sujeto utilizando cualquier técnica conocida por el artesano experto. Las células de la sangre circulante de un individuo pueden obtenerse por aféresis.

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

La presente divulgación proporciona además una población de células modificadas genéticamente que comprende una pluralidad de células modificadas genéticamente descritas en el presente documento, que comprenden en su genoma una molécula de ácido nucleico que codifica un CAR o un constructo regulador inducible que incorpora al

menos un dominio coestimulador novedoso descrito en el presente documento, como SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa del mismo. Así, en diversas realizaciones de la invención, se proporciona una población de células modificadas genéticamente en la que al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o hasta el 100%, de las células de la población son una célula modificada genéticamente que comprende un novedoso dominio coestimulador divulgado en el presente documento. En ciertas realizaciones, se proporciona una población de células modificadas genéticamente en la que al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o hasta el 100%, de las células de la población expresan un CAR que comprende un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento. En otras realizaciones, se proporciona una población de células modificadas genéticamente en la que al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o hasta el 100%, de las células de la población expresan un constructo regulador inducible que comprende un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento y un CAR que no comprende un dominio coestimulador descrito en el presente documento.

## **2.6 Procedimientos para producir células genéticamente modificadas**

La presente divulgación proporciona procedimientos para producir células modificadas genéticamente que comprenden los novedosos dominios coestimuladores divulgados en el presente documento, o variantes activas de los mismos. Se proporcionan procedimientos para modificar la célula a fin de que comprenda una molécula de secuencia de ácido nucleico que codifique un CAR que incorpore al menos un dominio coestimulador novedoso, como la SEQ ID NOS: 5-8, o una variante activa del mismo. También se proporcionan procedimientos para modificar la célula para que comprenda una molécula de ácido nucleico que codifique un constructo regulador inducible que incorpore al menos un dominio coestimulador novedoso, como las SEQ ID NO: 5-8, o una variante activa del mismo. En diferentes aspectos de la presente divulgación, una molécula de ácido nucleico o casete de expresión que codifica un novedoso dominio coestimulador divulgado en el presente documento, o una variante activa del mismo, se integra en el genoma de la célula o, alternativamente, no se integra en el genoma de la célula.

En algunas realizaciones, el ADN o el ARN que codifica los novedosos dominios coestimuladores (o CARs o constructos reguladores inducibles) divulgados aquí se introduce en una célula utilizando cualquier tecnología conocida en el arte. En realizaciones específicas, los vectores o casetes de expresión que comprenden los ácidos nucleicos que codifican los novedosos dominios coestimuladores (o CARs o constructos reguladores inducibles) divulgados aquí se introducen en una célula utilizando un vector viral. Tales vectores son conocidos en la técnica e incluyen vectores lentivíricos, vectores adenovíricos y vectores de virus adenoasociados (AAV) (revisados en Vannucci, et al. (2013) *New Microbiol.* 36:1-22). Los vectores de AAV recombinantes útiles en la presente divulgación pueden tener cualquier serotipo que permita la transducción del virus en la célula y la inserción del gen de la nucleasa en el genoma celular. Los vectores AAV recombinantes útiles en la divulgación pueden tener cualquier serotipo que permita la transducción del virus en la célula y la inserción del gen de la nucleasa en el genoma celular. En realizaciones particulares, los vectores AAV recombinantes tienen un serotipo de AAV2 o AAV6. Los vectores AAV recombinantes 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).

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico o los casetes de expresión aquí divulgados se entregan en una célula en forma de ADN (*por ejemplo*, ADN plasmídico circular o linealizado o productos de PCR) o ARN. En algunas realizaciones en las que los genes de las nucleasas de ingeniería se entregan en forma de ADN (*por ejemplo*, plásmido) y/o a través de un vector viral (*por ejemplo*, AAV o vector lentiviral), están operablemente enlazados a un promotor o se encuentran en un casete de expresión divulgado en el presente documento. En algunas realizaciones, este puede ser un promotor vírico tal como promotores endógenos del vector vírico (*por ejemplo*, el LTR de un vector lentivírico) o los promotores tempranos conocidos de citomegalovirus o virus SV40. En otras realizaciones, el promotor es un promotor sintético, como el promotor JeT. En ciertas realizaciones, los genes que codifican los novedosos dominios coestimuladores o CARs divulgados en el presente documento están operablemente enlazados a un promotor que impulsa la expresión del gen preferentemente en la célula diana (*por ejemplo*, una célula T humana).

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico o los casetes de expresión que codifican dominios coestimuladores (o CARs o constructos reguladores inducibles) divulgados en el presente documento, se acoplan de forma covalente o no covalente a una nanopartícula o se encapsulan 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 nanos escala cuya escala de longitud es <1 µm, preferentemente <100 nm. Dichas nanopartículas se pueden diseñar utilizando un núcleo compuesto de metal, lípido, polímero, o macromolécula biológica, y se pueden unir o encapsular múltiples copias de las proteínas, ARNm o ADN de la meganucleasa recombinante con el núcleo de nanopartículas. Esto aumenta el número de copias de la proteína/ARN/ADN que se entrega a cada célula y, por lo

tanto, aumenta la expresión intracelular de cada nucleasa de ingeniería para maximizar la probabilidad de que se expresen los dominios coestimuladores (o CARs o constructos reguladores inducibles). La superficie de tales nanopartículas se puede modificar adicionalmente con polímeros o lípidos (por ejemplo, quitosán, polímeros catiónicos, o lípidos catiónicos) para formar una nanopartícula de núcleo cubierto cuya superficie confiere 5 funcionalidades adicionales para mejorar el suministro celular y la absorción de la carga útil (Jian et al. (2012) Biomaterials. 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. Los ejemplos de tales moléculas de dirección incluyen anticuerpos específicos para los receptores de la 10 superficie celular y los ligandos naturales (o porciones de los ligandos naturales) para los receptores de la superficie celular.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico o los casetes de expresión que codifican dominios coestimuladores (o CARs o constructos reguladores inducibles) divulgados en el presente documento, se encapsulan dentro de liposomas o se complejan utilizando lípidos catiónicos (véase, por ejemplo, LIPOFECTAMINE, Life 15 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 y facilitar la absorción celular y la eficiencia de la administración a través de la fusión y/o la alteración de las membranas celulares de las células.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico o los casetes de expresión que codifican dominios coestimuladores (o CARs o constructos reguladores inducibles) divulgados en el presente documento, se encapsulan dentro de andamios poliméricos (por ejemplo, PLGA) o se complejan utilizando polímeros catiónicos (por ejemplo, PEI, PLL) (Tamboli et al. (2011) Ther Deliv. 2(4): 523-536). En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico o los casetes de expresión que codifican dominios coestimuladores (o CARs o constructos reguladores inducibles) divulgados aquí, se combinan con moléculas anfifílicas que se autoensamblan en micelas (Tong et al. (2007) J Gene 25 Med. 9(11): 956-66). Las micelas poliméricas pueden incluir una cubierta micelar formada con un polímero hidrofílico (por ejemplo, polietilenglicol) que puede prevenir la agregación, enmascarar las interacciones de carga y reducir las interacciones inespecíficas fuera de la célula.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico o los casetes de expresión que codifican dominios coestimuladores (o CARs o constructos reguladores inducibles) divulgados aquí, se formulan como emulsiones para su entrega a la célula. El término "emulsión" se refiere, sin limitación, a cualquier dispersión o gota de aceite en agua, 30 de agua en aceite, de agua en aceite o de aceite en agua en aceite, incluyendo 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, pero no se limitan a, vesículas lipídicas unilamelares, 35 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 de EE.UU. No. 2002/0045667 y 2004/0043041y Pat. de EE.UU. Nos. 6,015,832, 6,506,803, 6,635,676, y 6,559,189.

En algunas realizaciones, moléculas de ácido nucleico o casetes de expresión que codifican dominios coestimuladores (o CAR o constructos reguladores inducibles) divulgadas en el presente documento, se unen covalentemente a, o se 40 asocian no covalentemente con, conjugados poliméricos multifuncionales, dendrímeros de ADN y dendrímeros poliméricos (Mastorakos et al. (2015) Nanoscale. 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 45 capacidad de carga útil. Además, la presentación de múltiples grupos de superficie se puede aprovechar para mejorar la estabilidad y reducir las interacciones inespecíficas.

Los procedimientos de introducción y expresión de genes en una célula son conocidos en la técnica. En el contexto de un vector de expresión, el vector puede introducirse fácilmente en una célula huésped, por ejemplo, una célula de mamífero, de bacteria, de levadura o de insecto por cualquier procedimiento de la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión puede transferirse a una célula huésped por medios físicos, químicos o biológicos. Los procedimientos físicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen la precipitación de fosfato de calcio, la lipofección, el bombardeo de partículas, la microinyección, la electroporación y otros similares. Los procedimientos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Un procedimiento preferido para la introducción de un polinucleótido en una célula huésped es la 50 transfección con fosfato de calcio. Los procedimientos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula huésped incluyen el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los retrovirales, se han convertido en el procedimiento más utilizado para insertar genes en células de mamíferos, por ejemplo, humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, poxvirus, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adeno- 55 asociados, y similares. Véase, por ejemplo, la Pat. de los EE.UU. Números 5.350.674 y 5.585.362. Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula huésped incluyen sistemas de dispersión coloidal, como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo 60

emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ejemplar para su uso como vehículo de administración *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (por ejemplo, una vesícula de membrana artificial).

En algunas realizaciones, la invención proporciona además la introducción de las moléculas de ácido nucleico o los cassetes de expresión aquí divulgados en el gen del receptor de células T alfa. En ciertas realizaciones, la molécula

5 nucleica o los cassetes de expresión se introducen en una secuencia de reconocimiento presente en el gen de la región constante del receptor de células T alfa, que comprende las secuencias de codificación de la subunidad del receptor de células T alfa. Como tal, la introducción de las moléculas de ácido nucleico o de los cassetes de expresión interrumpe la expresión de la subunidad alfa del receptor endógeno de células T y, en consecuencia, interrumpe la expresión del receptor endógeno de células T. En realizaciones particulares, dichas secuencias de reconocimiento pueden estar presentes dentro del exón 1 del gen de la región constante del receptor de células T alfa.

10 En realizaciones particulares, la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador divulgado en el presente documento en una célula, como una célula T o una célula NK, puede aumentar la activación, la proliferación y/o la secreción de citoquinas de la célula en comparación con una célula de control sin el dominio coestimulador divulgado en el presente documento. En algunas realizaciones, la activación, la proliferación y/o la secreción de citoquinas de una célula pueden aumentarse *in vitro* o *in vivo* mediante la introducción de una molécula

15 de ácido nucleico que codifica un dominio coestimulador divulgado en el presente documento.

20 En algunas realizaciones, la introducción de al menos un dominio coestimulador novedoso, o un fragmento activo o una variante del mismo, en una célula, como una célula T o una célula NK, prolonga el periodo de proliferación celular y/o la expansión de la población celular, y/o retrasa el agotamiento celular, en comparación con las células de control sin el dominio coestimulador novedoso divulgado en el presente documento. Los procedimientos para medir la expansión y el agotamiento de las células (como la expansión y el agotamiento de las células T o NK) son conocidos en la técnica y se divulan en el presente documento.

## **2.7 Composiciones farmacéuticas**

25 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula modificada genéticamente, o una población de células modificadas genéticamente, de la divulgación y un portador farmacéutico. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden preparar 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 divulgación, las células se mezclan típicamente con un portador farmacéuticamente aceptable y la composición resultante se administra a un sujeto. El vehículo debe, por supuesto, ser aceptable en el

30 sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente en la formulación y no debe ser perjudicial para el sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender además uno o más agentes adicionales útiles en el tratamiento de una enfermedad en el sujeto. En otras realizaciones, cuando la célula genéticamente modificada es una célula T humana genéticamente modificada (o una célula derivada de ella), las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden incluir además moléculas biológicas, como citoquinas (por

35 *ejemplo*, IL-2, IL-7, IL-15, y/o IL-21), que promueven la proliferación celular *in vivo* y el injerto. Las composiciones farmacéuticas que comprenden células genéticamente modificadas de la presente divulgación se pueden administrar en la misma composición que un agente adicional o molécula biológica o, como alternativa, se pueden coadministrar en composiciones separadas.

40 La presente divulgación también proporciona células modificadas genéticamente, o poblaciones de las mismas, descritas en el presente documento para su uso como medicamento. Se divulga además el uso de un vector viral descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en un sujeto que lo necesite. En un aspecto de este tipo, el medicamento es útil para la inmunoterapia del cáncer en sujetos que lo necesitan.

45 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente divulgación son útiles para el tratamiento de cualquier estado de enfermedad al que se dirige la inmunoterapia adoptiva de células T. En una realización particular, las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente divulgación son útiles como inmunoterapia en el tratamiento del cáncer. Ejemplos no limitantes de cáncer que pueden tratarse con las

50 composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente divulgación son carcinomas, linfomas, sarcomas, melanomas, blastomas, leucemias y tumores de células germinales, incluyendo pero sin limitarse a los cánceres de origen de células B, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, rhabdiosarcoma, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de riñón, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del

55 endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje

60 espinal, glioma del tronco cerebral, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células

escamosas, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por el amianto, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, linfoma mieloide agudo leucemia mielógena crónica, leucemia linfóide crónica, linfoma inmunoblástico de células grandes, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes y linfoma de células T, y cualquier combinación de dichos cánceres. En ciertas realizaciones, los 5 cánceres de origen de células B incluyen, sin limitación, la leucemia linfoblástica aguda de linaje B, la leucemia linfocítica crónica de células B, el linfoma difuso de células B grandes, la ALL pre-B (indicación pediátrica), el linfoma de células del manto, el linfoma folicular, el linfoma de zona marginal, el linfoma de Burkitt y el linfoma no Hodgkin de células B.

## **2.8 Procedimientos para administrar células genéticamente modificadas**

10 Otro aspecto divulgado en el presente documento es la administración de las células modificadas genéticamente de la presente divulgación a un sujeto que las necesite. Las composiciones farmacéuticas aquí descritas pueden administrarse a un sujeto que las necesite. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una población de células que comprende un novedoso dominio coestimulador descrito en el presente documento, o una variante activa del mismo, puede administrarse a un sujeto que tenga una enfermedad. La enfermedad puede ser un cáncer, como un cáncer de 15 origen de células B. Así, la presente divulgación también proporciona un procedimiento para proporcionar una respuesta inmunitaria mediada por células T a una población celular o tejido diana en un mamífero, que comprende el paso de administrar al mamífero una célula CAR-T, en el que la CAR comprende un dominio de unión a ligando extracelular que interactúa específicamente con una diana predeterminada, tal como un antígeno tumoral, y un dominio intracelular que comprende al menos un dominio de señalización, tal como CD3ζ, y al menos un novedoso dominio de 20 señalización coestimulador descrito en el presente documento, o una variante activa del mismo. El CAR puede no comprender un dominio coestimulador novedoso descrito en el presente documento, pero la célula puede comprender además un constructo regulador inducible que comprende al menos un dominio coestimulador novedoso descrito en el presente documento, en el que la dimerización de del constructo regulador inducible inicia una señal coestimuladora para la célula. El procedimiento puede comprender además la administración de una pequeña molécula, un anticuerpo 25 u otra molécula que induzca la dimerización del constructo regulador inducible para inducir una señal proliferativa y/o de supervivencia en la célula CAR-T con el fin de promover la proliferación celular y la expansión de la población de células CAR-T *in vivo*. Las células CAR-T administradas son capaces de reducir la proliferación, reducir el número o eliminar las células diana en el receptor. A diferencia de las terapias con anticuerpos, las células modificadas genéticamente de la presente divulgación son capaces de replicarse y expandirse *in vivo*, lo que da lugar a una 30 persistencia a largo plazo que puede conducir al control sostenido de una enfermedad.

Ejemplos de posibles vías de administración incluyen la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutánea (SC) o por infusión). Además, la administración puede ser por infusión continua o por bolos únicos o múltiples. Uno o ambos agentes pueden infundirse durante un periodo inferior a unas 35 12 horas, 6 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas o 1 hora. La infusión puede producirse lentamente al principio y luego se incrementa con el tiempo.

Una célula genéticamente modificada de la presente divulgación puede dirigirse a un antígeno tumoral con el fin de tratar el cáncer. Dichos cánceres pueden incluir, sin limitación, carcinomas, adenocarcinomas, linfomas, sarcomas, melanomas, blastomas, leucemias y tumores de células germinales, incluyendo pero no limitándose a los cánceres de 40 origen de células B, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, rabbdomiosarcoma, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer renal, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, linfoma no Hodgkin, cáncer del esófago, 45 cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje 50 espinal, glioma del tronco cerebral, adenoma hipofisario, Sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por el amianto, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, linfoma mieloide agudo, leucemia mielógena crónica, leucemia linfóide crónica, linfoma inmunoblástico de células grandes, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes y linfoma de células T, y cualquier combinación de dichos cánceres. Los cánceres de origen de 55 células B incluyen, sin limitación, la leucemia linfoblástica aguda de linaje B, la leucemia linfocítica crónica de células B, el linfoma difuso de células B grandes, la ALL pre-B (indicación pediátrica), el linfoma de células del manto, el linfoma folicular, el linfoma de la zona marginal, el linfoma de Burkitt y el linfoma no Hodgkin de células B.

Cuando se trata el cáncer con las células genéticamente modificadas divulgadas actualmente, al sujeto al que se le administran las células genéticamente modificadas se le administra además una terapia adicional, como radiación, cirugía o un agente quimioterapéutico.

60 Cuando se indica una "cantidad efectiva" o una "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente divulgación que debe administrarse puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias

- individuales en cuanto a la edad, el peso, el tamaño del tumor (si está presente), la extensión de la infección o la metástasis y el estado del paciente (sujeto). Una composición farmacéutica que comprende las células modificadas genéticamente descritas en el presente documento puede administrarse a una dosis de  $10^4$  a  $10^9$  células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. La dosis puede ser de  $10^5$  a  $10^6$  células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones celulares pueden administrarse varias veces a estas dosis. Las células pueden administrarse mediante técnicas de infusión comúnmente conocidas en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676-1988). Un experto en medicina puede determinar fácilmente la dosis y el régimen de tratamiento óptimos para un paciente en particular, controlando al paciente en busca de signos de la enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.
- La administración de células genéticamente modificadas de la presente divulgación puede reducir al menos un síntoma de una enfermedad o condición objetivo. Por ejemplo, la administración de células modificadas genéticamente de la presente divulgación puede reducir al menos un síntoma de un cáncer, como los cánceres de origen de células B. Los síntomas de los cánceres, como los de origen de células B, son bien conocidos en la técnica y pueden determinarse mediante técnicas conocidas.

## 15 **EXPERIMENTAL**

La presente divulgación se ilustra además con los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos. Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de averiguar, utilizando únicamente la experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a las sustancias y procedimientos específicos descritos en el presente documento. Los ejemplos que no están comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones son únicamente ilustrativos.

## 20 **EJEMPLO 1**

### **Producción de vectores lentivirales para la expresión de CARs con novedosos dominios coestimuladores**

El propósito de este estudio fue evaluar y caracterizar novedosos dominios coestimuladores que fueron desarrollados para promover la expansión de las células CAR-T y la secreción de citoquinas tras la estimulación del antígeno.

Como se muestra en la Figura 1, se diseñaron cuatro novedosos dominios coestimuladores que comprenden dos motivos de unión a TRAF. Estos dominios se denominan Novell (N1; SEQ ID NO: 5), Novel5 (N3 (SEQ ID NO: 6), Novel5 (N5 (SEQ ID NO: 7), y Novel6 (N6 (SEQ ID NO: 8). Para evaluar cada uno de los novedosos dominios coestimuladores, se utilizaron vectores lentivirales para preparar células CAR-T anti-CD19. Cada CAR comprendía, de 5' a 3', un péptido señal (SEQ ID NO: 16), un anti-CD19 (SEQ ID NO: 17) que tiene las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo FMC63 unidas por un enlazador polipeptídico (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>, una región bisagra CD8 y un dominio transmembrana (SEQ ID NO: 18), y una región intracelular que comprende dos dominios de señalización intracelular. Una secuencia de poliadenilación (poliA) del SV40 (SEQ ID NO: 22) se situó 3' corriente abajo de la secuencia CAR. Algunos vectores lentivirales codificaron un CAR anti-CD19 cuya región intracelular comprendía: (i) un novedoso dominio coestimulador, y (ii) un dominio de señalización CD3- $\zeta$  (SEQ ID NO: 19). Se preparó un vector de control negativo que codificaba un CAR que carecía de un dominio coestimulador (Null), y se prepararon vectores adicionales que codificaban CARs que tienen CD28 (SEQ ID NO: 20), o 4-1BB (SEQ ID NO: 21) dominios coestimuladores y un dominio de señalización CD3- $\zeta$ . Los vectores lentivirales preparados para este estudio se resumen en la Tabla 1. Cada CAR se ilustra en la Figura 2, y sus respectivas secuencias se exponen en las SEQ ID NOs: 22-28.

**Tabla 1.**

Vector lentiviral	Dominio coestimulador	Dominio de activación	SEQ ID NO:
1	-	CD3 $\zeta$	22
2	CD28 $\zeta$	CD3 $\zeta$	23
3	4-1BB	CD3 $\zeta$	24
4	Novell	CD3 $\zeta$	25
5	Novel3	CD3 $\zeta$	26
6	Novel5	CD3 $\zeta$	27
7	Novel6	CD3 $\zeta$	28

Los vectores lentivirales se prepararon con un enfoque de 2da generación, utilizando un plásmido que codifica gag, pol, tat y rev clonado a partir del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se utilizó un segundo plásmido, que codifica la proteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), para pseudotipificar las partículas virales. El vector de transferencia pCDH-EF1-MCS (adquirido a System Biosciences) fue modificado para contener el promotor JeT (SEQ ID NO: 32) en lugar del promotor de EF1, y las variantes de señalización de CAR se clonaron corriente abajo del promotor, seguidas de un IRES y GFP. Los tres plásmidos se transfecaron en células Lenti-X-

293T (compradas a ClonTech/Takara), y el lentivirus se cosechó de los sobrenadantes 3d después. Las partículas virales se concentraron utilizando el concentrador Lenti-X (ClonTech/Takara) y se cuantificaron, utilizando el kit Lenti-X qRT-PCR Titration (ClonTech/Takeda) para determinar el número de genomas virales/ml, así como la titulación en células 293T (ATCC) para determinar las unidades transducibles/ml.

5 **Ejemplo 2**

**Expresión de receptores antigenicos quiméricos que comprenden novedosos dominios coestimuladores en células T humanas y caracterización en la prueba de estrés inducida por antígenos**

**1. Preparación de células CAR-T y prueba de estrés inducida por antígeno**

El propósito de este estudio fue evaluar los novedosos dominios coestimuladores en un estrés inducido por antígenos. 10 En resumen, los vectores lentivirales se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Para preparar las células T humanas del donante para la transducción lentiviral, se estimularon las células T en ImmunoCult anti-CD2/CD3/CD28 multimers (StemCell Technologies) y 20ng/ml de IL-2 durante 4 días. A continuación, se recogieron las células y se depositaron en pocillos separados para la transducción con vectores lentivirales individuales. se añadieron a los cultivos 5 unidades transducibles por célula T. La transducción se realizó en el medio X-VIVO 15 (Lonza) 15 complementado únicamente con IL-2 (20ng/ml) y 8µg/ml de polibreño (Sigma). La coincubación del vector y las células T se llevó a cabo durante la noche antes de la sustitución del medio (X-Vivo 15 + 20ng/ml de IL-2 + 5% de suero humano normal).

A partir de los 4 días siguientes a la transducción lentiviral, se confirmó la expresión de CAR mediante el análisis de GFP (Figura 3). Se obtuvo una muestra de cada cultivo de células T transducidas por lentivirus y se midió la señal de GFP en un citómetro de flujo Becton-Dickinson LSR:Fortessa. La población de células T GFP<sup>+</sup> en cada cultivo está identificada por la región titulada CAR-GFP+ en la Figura 3, y la frecuencia de los eventos GFP+ aparece en cada gráfico de puntos.

Posteriormente, se cultivaron  $5 \times 10^4$  células CAR-T con un número equivalente de células Raji. En los momentos indicados en la Figura 4 (d3, 6, 10, 14, 17 y 20), se midió el número de células y la viabilidad mediante recuento celular automatizado y exclusión de azul tripán. Las células CAR-T se identificaron como CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> utilizando anticuerpos contra CD4 y CD8 humanos, así como la señal GFP mediante citometría de flujo. Se calculó el número de CAR-T y se volvieron a cultivar  $1 \times 10^5$  células CAR-T con  $5 \times 10^4$  células Raji adicionales (relación efector:objetivo 2:1). Se realizó un seguimiento de las células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y del número total de células CAR-T y se representó en el tiempo. En cada punto de tiempo, se recogieron 50µl de sobrenadantes de cultivo y se almacenaron a -20°C para un ensayo de secreción de citoquinas de tres tipos. Los niveles de citoquinas en los sobrenadantes se midieron utilizando kits de microesferas magnéticas Ultrasensibles de IL-2, TNF $\alpha$  e IFNy (Life Technologies) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los datos se adquirieron utilizando un instrumento Luminex MagPix.

En un segundo estudio, se construyeron células CAR-T que contenían nuestros novedosos dominios coestimuladores como se ha descrito anteriormente y se cultivaron  $1 \times 10^5$  células CAR-T con  $1 \times 10^5$  células tumorales Raji. A los tiempos indicados en los ejes X de la Figura 6, se midió el número de células y la viabilidad mediante recuento celular automatizado y exclusión de azul tripán. Las células CAR-T se identificaron utilizando anticuerpos contra CD4 y CD8 humanos, así como la señal GFP mediante citometría de flujo. Se calculó el número de CAR-T y se volvieron a cultivar  $1 \times 10^5$  células CAR-T con  $1 \times 10^5$  células Raji adicionales. Obsérvese que en la Figura 6, las relaciones objetivo: efector se ajustaron a 1:1 y las células Raji se añadieron al cultivo con mayor frecuencia, en los d3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 24, 26, 28 y 31. Se realizó un seguimiento de las células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y del número total de células CAR-T y se representó en el tiempo.

4 días después de la transducción, pero antes del co-cultivo con células Raji, se evaluaron los cultivos de células T para la expresión de CAR-GFP por citometría de flujo como se describió previamente. Las células T fueron transducidas a una MOI de 5 unidades transducibles por célula y se observaron eficiencias aproximadamente similares para todas las muestras lentivirales.

**2. Resultados del experimento nº 1**

El número de células CAR-T se midió a lo largo del tiempo y se representó en la Figura 4. Las diferencias en el número de CAR-T fueron evidentes a partir del día 10. Las células CAR-T con dominios de señalización 41BBz mostraron una proliferación más sostenida que las que tenían dominios CD28z. El control nulo de BB mostró los niveles más bajos de expansión de CAR-T en este experimento. Los novedosos dominios N5 y N6 mostraron altos niveles de proliferación sostenida. No se observó ninguna preferencia por la expansión de células T CD4 (Figura 4B) o CD8 (Figura 4C), ya que cada subconjunto proliferó a tasas similares. En orden de rendimiento descendente en este ensayo de proliferación, los resultados son los siguientes: N6>N5>41BBz>N1>>BBnull=CD28z>N3

La secreción de IFNy, TNF $\alpha$  e IL-2 se midió mediante un ensayo multiplex Luminex y aparece en la Figura 5A, 5B y 5C, respectivamente. En general, los niveles de secreción de todas las citocinas disminuyeron con el tiempo. La clasificación de los dominios en términos de secreción de IFNy en d3 es la siguiente: 41BBz=CD28z>N1>N5>BBnull=N3>N6. Los niveles de IFNy disminuyeron en un 50% o más en todos los grupos

experimentales en el punto de tiempo d7 y continuaron disminuyendo durante el resto del experimento. La clasificación de los dominios en términos de secreción de TNF $\alpha$  produce la siguiente lista: CD28z N5 41BBz.BBnull N3 Entre los días 3 y 7 de cultivo, el nivel de producción de TNF $\alpha$  disminuye aproximadamente un 50% en los cultivos CD28z, BBnull, N3 y N5, mientras que los cultivos 41BBz, N1 y N6 mantienen los niveles de producción de TNF $\alpha$  hasta el día 5 7. Por otro lado, la producción de IL-2 fue baja en todos los co-cultivos de dominios novedosos, en comparación con 41BBz y CD28z. Las mediciones de la IL-2 pueden verse confundidas por las altas tasas de consumo de IL-2 por parte de las células T de rápida proliferación presentes en algunos cultivos (véase la figura 4).

### **3. Resultados del experimento nº 2**

10 En el segundo experimento (Figura 6), utilizando un encuentro más frecuente con el antígeno y una mayor relación de objetivo: efector, los resultados fueron los siguientes, en orden de rendimiento descendente: N3>N5>CD28z>N1>N6>41BBz>BB null. En este experimento, las células CAR-T se expandieron continuamente durante todo el periodo de cultivo. Las células CAR-T CD4 dejaron de expandirse después de aproximadamente 12 días en el co-cultivo Raji (Figura 6B), mientras que las células CAR-T CD8 continuaron expandiéndose (Figura 6C).

### **4. Conclusiones**

15 Varios dominios de señalización novedosos se desempeñan tan bien o mejor que 41BBz y/o CD28z bajo una carga de antígeno relativamente menor (Figura 4) o mayor (Figura 6). Los CAR que llevan el dominio de señalización N5 superaron a 41BBz y CD28z en ambas condiciones. N5 parece tener el mismo rendimiento que 41BBz en el compartimento CD4 en ambos experimentos, mientras que N5 supera a 41BBz en el compartimento CD8 en ambos experimentos.

### **20 Ejemplo 3**

#### **Prueba de estrés utilizando AAV para la inserción dirigida de CAR con dominios coestimuladores 41BB, N1 o N6**

##### **1. Preparación de células CAR-T y prueba de estrés inducida por antígeno**

25 Para evaluar los novedosos dominios de señalización intracelular, se produjeron células CAR-T y se midieron sus respuestas al encuentro del antígeno. Para producir células CAR-T, se aislaron células T a partir de una muestra de aféresis recogida de donantes humanos sanos utilizando el kit de selección positiva CD3 de Stem Cell Technologies. En este ensayo se utilizaron dos donantes diferentes, designados K799 y z4100. Las células T se activaron y expandieron durante 3 días utilizando Immunocult anti-CD2/3/28 (StemCell Tech) antes de la nucleofección (Lonza 4D nucleofector) con TRC1-2x87EE. Inmediatamente después de la nucleofección, las células fueron transducidas 30 con vectores AAV6 que codificaban CARs anti-CD 19 con diferentes dominios de señalización intracelular. Las variantes de CAR incluidas en este experimento incluían dominios coestimuladores 4-1BB, N1 o N6. En todos los vectores, la expresión de la CAR estaba dirigida por el promotor JeT. Cada plantilla donante de CAR estaba flanqueada por brazos de homología 5' y 3', que tienen homología con las regiones corriente arriba y corriente abajo de la secuencia de reconocimiento TRC 1-2x.87EE. Las plantillas de los donantes de CAR estaban además flanqueadas 35 por repeticiones terminales invertidas en 5' y 3'. Las plantillas de donantes para cada CAR se ilustran en la Figura 7, y las secuencias de los vectores utilizados para generar los AAV que codifican el CAR CD19-4-1BB, el CAR CD19-N1 y el CAR CD19-N6, se proporcionan en las SEQ ID NO: 29-31, respectivamente.

40 La multiplicidad de la infección fue de 50.000. 5 días después de la nucleofección/transducción, se eliminaron las células CD3+ no editadas mediante depleción magnética (kit de selección positiva de CD3 de StemCell Tech). A continuación, se evaluó la pureza de la fracción CD3- y la expresión de CAR mediante citometría de flujo, utilizando anti-CD3-BrilliantViolet-711 (Biolegend), y CD19-Fc-biotina (Acro) seguido de estreptavidina-PE (BioLegend). Al día siguiente, se montaron cocultivos que contenían células T y K562 modificadas para expresar CD19 (células "K19"). Las frecuencias de CD19-Fc+ determinadas en el ensayo de citometría de flujo anterior se utilizaron para calcular el 45 número de entrada de células CAR-T y establecer una relación efecto:objetivo (E:T) de 2:1. A los días 3, 6, 8 y 10 del cocultivo, se tomaron muestras para la evaluación por citometría de flujo del número de células tumorales y de células CAR-T en el cocultivo. El número de células CAR-T en cada momento se representa en la Figura 8 como demostración de la expansión de las CAR-T tras el encuentro con el antígeno. Utilizando el número calculado de células CAR-T, así como las células tumorales restantes detectadas en cada punto de tiempo, se añadió el número necesario de células K19 frescas al co-cultivo para restablecer el E:T de 2:1. Además, se preparó una placa de cocultivo paralela con 50 relaciones variables de E:T (2:1, 1:1 y 1:2). Se tomaron muestras de estos cocultivos a las 24 y 72 horas y se determinó el número de células CD19+ mediante citometría de flujo. Los resultados aparecen en la figura 9. El número de células CD19+ que sobreviven al cocultivo con las células CAR-T sirve como indicador de la eliminación de las células diana.

##### **2. Resultados de la prueba de estrés inducida por antígenos**

55 Las poblaciones de células T de entrada se normalizaron con respecto a la frecuencia de células CAR+ y se desafilaron números equivalentes de células CAR-T con objetivos K19 a una E:T de 2. Se evaluó la proliferación de las células CAR-T para las células T producidas a partir del donante K799 (Figura 8A) y del donante z4100 (Figura 8B). Las células que contienen ediciones TRAC, pero sin inserción CAR (TRC KO) no proliferaron en respuesta al encuentro

con el antígeno. Por el contrario, las células CAR-T producidas utilizando el dominio de señalización 4-1BB proliferaron de forma robusta durante la primera semana de cocultivo antes de contraerse en el d12. Las células CAR-T producidas con las variantes N1 o N6 mostraron tasas de proliferación que no resultaron ser sustancialmente diferentes de la tasa soportada por el 4-1BB. También se evaluó la eliminación de las células diana CD19+ en varias relaciones E:T a las 5 24 y 72 horas del cocultivo, momento en el que se analizaron las muestras de cultivo para determinar el número de células CD 19+ restantes y los resultados se compararon con un pocillo de control que contenía el mismo número de células K19, pero sin células CAR-T. Las cifras de K19 inferiores al control de no células T se interpretan como muerte 10 celular. Las células CAR-T producidas con material del donante K799 mostraron un escaso potencial citolítico en el punto de tiempo de 24 horas, demostrando una matanza notable sólo en la relación E:T menos estricta de 2:1 (Figura 15 9, Panel A). Sin embargo, a las 72 horas, se observó una amplia destrucción en todas las relaciones E:T. N1 y N6 eran comparables o superiores a 4-1BB. N1 parecía ser superior en la actividad citolítica en comparación con 4-1BB. Se observó una matanza extensiva tanto a las 24 como a las 72 horas en los cocultivos que contenían células CAR-T producidas a partir del donante z4100 (Figura 9B). Como en el caso anterior, N1 y N6 fueron comparables o superiores en términos de actividad citolítica cuando se compararon con 4-1BB. En general, se observó una mayor destrucción 20 de las células CAR-T producidas a partir del donante z4100. Es importante señalar que la relación CD4: CD8 en el donante K799 es de casi 3:1, mientras que la relación en z4100 es de 1:1. Por lo tanto, una muestra que contenga un número fijo de células CAR-T totales (como es el caso de estos experimentos) diferirá en sus respectivos números de células T CD8+ citotóxicas, con z4100 conteniendo casi el doble de células T CD8+, proporcionando una explicación para la mayor actividad de eliminación observada en las células derivadas de este donante.

### 3. Conclusiones

Se encontró que los novedosos dominios de señalización costimulatoria apoyan los niveles de proliferación y muerte de las células objetivo que son iguales o mejores que los niveles apoyados por la señalización 4-1BB. Es importante destacar que aquí demostramos esta característica de N1 y N6 en las células CAR-T producidas con nuestra estrategia de inserción dirigida, además de otros datos en los que la CAR fue entregada por vectores lentivirales de inserción aleatoria. Este procedimiento reduce la probabilidad de que las diferencias en las respuestas CAR-T al antígeno puedan atribuirse a las diferencias en el número de copias integradas entre las distintas preparaciones CAR-T. Es importante destacar que tanto las estrategias de inserción aleatoria como las dirigidas indicaron que N6, especialmente, es una alternativa viable al apoyo costimulatorio proporcionado por el 4-1BB nativo.

#### Ejemplo 4

##### 30 Ensayo de proliferación en células CAR-T que tienen 41BB, N1 o N6 como dominio coestimulador.

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

Los elementos CAR con novedosos dominios costimuladores se clonaron a partir de vectores de transferencia lentivirales y se ligaron al vector pDI. La expresión del elemento CAR está controlada por el promotor JeT y el elemento 35 está flanqueado por brazos de homología TRAC para permitir la inserción de genes dirigidos. Esta plantilla donante está flanqueada por secuencias de repetición terminal invertida para permitir el empaquetamiento en partículas AAV6. Estos plásmidos se linealizaron primero mediante digestión con endonucleasas de restricción y precipitación con etanol. A continuación, las células T cebadas se nucleofectaron con TRC1-2x87EE, un plásmido CAR linealizado, y 40 siRNA STING para reducir la toxicidad mediada por los sensores de ácidos nucleicos intracelulares. El suministro de ácido nucleico se llevó a cabo utilizando un nucleofector Lonza 4D. Las células T editadas se cultivaron en un medio XVIVO-15 (Lonza) complementado con un 5% de suero humano combinado y 30ng/ml de IL-2 (Gibco). Los cultivos 45 se realizaron durante 7 días antes de la deplección magnética de las células CD3+ no editadas utilizando un kit de selección positiva de CD3 humano (StemCell Technologies). Las células se dejaron reposar toda la noche en 2ng/ml de IL-2 antes de etiquetarlas con 2 $\mu$ M de CellTrace Violet (Life Technologies) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El CellTrace Violet (CTV) es un sustrato para las esterasas intracelulares y funciona de forma muy similar al carboxifluorosceína-succinimidil éster (CFSE). El CTV se difunde a través de las membranas hacia el 50 citoplasma, donde es escindido por las enzimas esterasas, que son abundantes en el citoplasma de las células vivas. El producto de escisión no se difunde a través de las membranas celulares, reacciona muy fuertemente con los grupos aminos libres que se encuentran en las proteínas citoplasmáticas y es fluorescente. Cuando las células marcadas se dividen, las proteínas citoplasmáticas fluorescentes se reparten uniformemente entre las células hijas, lo que da lugar 55 a dos células que son cada una la mitad de brillantes que la generación parental. Comparando la fluorescencia del CTV con controles temporales (como un control de día 0) o biológicos (por ejemplo, células no estimuladas), se pueden medir las tasas de proliferación de diversas poblaciones celulares mediante citometría de flujo, comparando las 60 frecuencias de los eventos de atenuación del CTV. Fracciones de células T marcadas con CTV y CD3 que no expresan CAR, CAR-4-1BB, CAR-N1 o CAR-N6 fueron desafiadas con células tumorales portadoras de antígeno. Para este ensayo, se utilizaron células K562 que expresaban de forma estable CD19 en dos relaciones diferentes de efector a objetivo (E:T), 2:1 y 1:1. Es importante destacar que la frecuencia de CAR+ se determinó para cada co-cultivo utilizando CD19-Fc biotinilado y estreptavidina-PE. Los números de entrada de las células T se normalizaron en base a sus frecuencias CAR+. Se realizaron cocultivos de células T y K562 CD19+ durante 5 días antes del análisis de citometría de flujo. Se utilizaron anticuerpos CD4-PE y CD8-APC (BioLegend) para identificar positivamente las células T. Los datos se adquirieron y analizaron con el software FlowJo (TreeStar) y la proliferación se evaluó por dilución de colorantes.

## **2. Resultados del ensayo de proliferación**

Los resultados del ensayo de proliferación aparecen en la Figura 10. Los histogramas superpuestos en la Figura 10A representan la proliferación de las células CAR-4-1BB CAR-T y la falta de proliferación en las células T TRC KO de control negativo en dos relaciones E:T diferentes. Algo más de la mitad de las células T CAR-4-1BB proliferaron en

5 respuesta a las células diana CD19+, mientras que el 13% se dividió en las muestras de control. Los histogramas superpuestos de la Figura 10B muestran las tasas de proliferación de las células CAR-4-1BB frente a las células CAR-N1. En cada cultivo aparecen frecuencias aproximadamente iguales de células divididas. Los histogramas superpuestos en la Figura 10C muestran las tasas de proliferación de las células T CAR-4-1BB en comparación con las células T CAR-N6. El N6 favorece la proliferación en el 77% de las células, mientras que el 4-1BB lo hace en el 10 56%. A continuación aparece una tabla con las frecuencias de las células divididas en cada cultivo.

**Tabla 2. Frecuencia de división de las células CAR-T en cocultivo con células tumorales portadoras de antígeno.**

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

## **3. Conclusiones**

15 Las pantallas lentivirales identificaron a N6 como un candidato principal en un esfuerzo por identificar dominios de señalización alternativos y/o superiores para incorporar en un constructo CAR. Este experimento demostró la capacidad de los novedosos dominios de señalización para funcionar en un escenario de inserción dirigida de una sola copia en lugar del escenario de inserción aleatoria/número de copias variable típico de la entrega lentiviral. Este soporte de datos demuestra que se pueden diseñar y suministrar variantes funcionales de señalización. Es importante 20 destacar que se encontró que N6 superaba a 4-1BB como transductor de señales coestimuladoras junto con CD3z tras el encuentro con el antígeno.

### **Ejemplo 5**

#### **Eficacia de células T CAR que portan dominios coestimuladores 4-1BB y N6 en un modelo murino de xenoinjerto de linfoma de células B diseminado.**

##### **1. Preparación de células CAR-T e inyección en ratones portadores de tumores**

25 El propósito de este estudio fue evaluar la eficacia de las células T CAR de ingeniería para expresar constructos CAR anti-CD 19 que contienen el dominio coestimulador N6 y comparar estas células con las células T CAR con un dominio coestimulador 4-1BB incorporado en el CAR.

30 Las secuencias CAR anti-CD 19 con dominios coestimuladores 4-1BB o N6 se clonaron en el plásmido pDI y se utilizaron para producir vectores virales AAV6. La expresión del elemento CAR estaba controlada por el promotor JeT y el transgén estaba flanqueado por brazos de homología TRAC para permitir la inserción genética dirigida en el locus TRAC cuando esta plantilla donante se entregaba junto con la endonucleasa específica del sitio TRC1-2x.87EE. Esta plantilla donante de transgenes CAR estaba flanqueada por secuencias de repetición terminal invertida para permitir el empaquetamiento en partículas AAV6.

35 Para el dominio coestimulador N6, se produjeron dos transgenes CAR diferentes y se empaquetaron en diferentes vectores AAV para la prueba. Estos dos elementos CAR que contienen N6 contenían diferentes secuencias de poliadenilación (PoliA) utilizadas en el extremo 3' del transgén CAR para evaluar si estas secuencias PoliA afectaban a la función de las células T CAR. La secuencia de poliA utilizada en los constructos 7241 (4-1BB) y 7205 (N6) fue una secuencia de poliA de SV40 que comprende la SEQ ID NO: 33. La secuencia poliA utilizada en el constructo 7206 (N6) es una secuencia SV40 bi-poliA que tiene una primera secuencia que comprende SEQ ID NO: 34 y una segunda secuencia que comprende SEQ ID NO: 35. La Tabla 3 describe las características de los constructos CAR utilizados en este estudio, que se ilustran en la figura 11. Las secuencias de los vectores utilizados para generar los AAV que codifican el constructo 7241 (4-1BB), el constructo 7205 (N6) y el constructo 7206 (N6), se proporcionan en las SEQ ID NO: 36-38, respectivamente.

**Tabla 3. Vectores AAV**

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

Las células T cebadas fueron electroporadas con ARNm de TRC1-2x87EE. El suministro de ácido nucleico se llevó a cabo utilizando un Nucleofector 4D de Lonza. Tras la electroporación, las células fueron transducidas de forma simulada o con vectores AAV6 que portaban plantillas de donantes con transgenes CAR anti-CD 19 que incluían dominios coestimuladores 4-1BB o N6.

Las células T editadas se cultivaron en un medio XIVO-15 (Lonza) complementado con un 5% de suero humano combinado y 30ng/ml de IL-2 (Gibco). Las células se cultivaron durante 5 días antes de la deplección magnética de las células CD3+ no editadas utilizando un kit de selección positiva de CD3 humano (StemCell Technologies). Las células se cultivaron durante 3 días más.

Los ratones NSG (n=5 por grupo) fueron inyectados con 2e5 células Raji que expresaban luciferasa de luciérnaga (Raji-ffluc). Tres días después, los ratones fueron inyectados con 1e6 células TCR KO de control cada uno, o con 1e6 células T CAR producidas utilizando los vectores 7205 (N6), 7206 (N6) o 7241 (4-1BB). En los días indicados, los ratones vivos fueron inyectados por vía i.p. con sustrato de Luciferina (150 mg/kg en solución salina), anestesiados, y la actividad de luciferasa se midió después de 7 minutos usando IVIS SpectrumCT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Los datos se analizaron y se exportaron con el programa informático Living Image 4.5.2 (Perkin Elmer, Waltham, MA). La intensidad de la señal de luminiscencia está representada por la radiación en p/seg/ cm<sup>2</sup>/sr. El flujo total también se calculó con el software Living Image 4.5.2 (Perkin Elmer, Waltham, MA) utilizando todo el animal como región de interés. Los ratones fueron monitorizados para detectar síntomas de progresión de la enfermedad y se les aplicó la eutanasia cuando fue necesario según criterios predefinidos.

## **2. Resultados del modelo de xenoinjerto murino**

El resultado del modelo de xenoinjerto murino de linfoma de células B diseminado que evalúa la eficacia de los constructos CAR descritos en la Tabla 3 se muestra en las Figuras 12-14.

El injerto y el crecimiento de las células Raji-ffluc en los ratones de control que recibieron células TCR KO fue visible mediante imágenes ventrales y dorsales de los ratones en el día 7 después de la inyección de Raji-ffluc, y se observó un rápido crecimiento de las células Raji en estos ratones como se indica por el aumento de la señal de luminiscencia en el día 10 y el día 16 (Figura 12, Figura 13A y Figura 13C). Por el contrario, el tratamiento de ratones con células T CAR portadoras de los constructos 7205 (N6), 7206 (N6) y 7241 (4-1BB) produjo un retraso en el crecimiento del tumor (Figura 12 y Figura 13). El crecimiento de Raji se detectó aproximadamente a partir del día 20 en un subgrupo de ratones de los grupos 7205 (N6) y 7241 (4-1BB) de CAR T, tal y como se evidenció en las imágenes dorsales y ventrales de los animales. Sin embargo, en el grupo de tratamiento 7206 (N6) CAR T, no se observó un crecimiento apreciable del tumor durante los 40 días del estudio.

Como se muestra en la Figura 14, los 5 ratones del grupo de control TRC KO fueron eutanaseados en el día 19 debido a la rápida aparición de los síntomas relacionados con la enfermedad, incluyendo la parálisis completa de las extremidades posteriores. Sin embargo, el tratamiento con células T CAR producidas con los vectores 7205 (N6) y 7206 (N6) mejoró la supervivencia de los ratones, y todos los ratones de estos grupos seguían vivos en el día 40 (un ratón del grupo 7206 fue retirado del estudio debido a una muerte no relacionada con el crecimiento del tumor o la infusión de CAR T). Los ratones tratados con el constructo CAR 7241 que contiene 4-1BB también prolongaron este tiempo de supervivencia de los ratones de este grupo de tratamiento, con un ratón que requirió la eutanasia en el día 38, y los otros cuatro ratones permanecieron vivos hasta el día 40 del estudio.

## **3. Conclusiones**

El tratamiento de ratones injertados con células Raji-ffluc CD19<sup>+</sup> con células T CAR anti-CD 19 que expresan CARs de segunda generación que llevan el dominio coestimulador N6 (en las configuraciones 7205 y 7206) dio como resultado una supervivencia prolongada de los ratones y una reducción dramática de la carga tumoral en comparación con los ratones que recibieron células TCR KO. Es importante destacar que, hasta el día 40 del estudio, el constructo 7205 (N6) parecía tener un rendimiento comparable al del 7241 4-1BB que contenía CAR, y el constructo 7206 (N6) parecía superar tanto a las configuraciones 7205 (N6) como al 7241 (4-1BB) en términos de supresión duradera del crecimiento de las células Raji. En general, estos datos confirman los hallazgos *in vitro* de que el dominio coestimulador N6 es funcional como dominio coestimulador y apoya la capacidad de las células T CAR para matar a objetivos CD19<sup>+</sup> *in vivo*, de acuerdo con los experimentos que evalúan la actividad *in vitro* de los constructos. Además, los constructos que llevan el dominio coestimulador N6 igualaron o superaron la actividad de un constructo CAR T con el dominio coestimulador 4-1BB.

**Ejemplo 6****Caracterización de un CAR de tercera generación que comprende múltiples dominios coestimuladores****1. Producción de células T CAR que expresan un CAR de tercera generación**

Se prepararon otros constructos para evaluar los novedosos dominios coestimuladores abarcados por la invención como parte de un CAR de tercera generación, en el que los dominios de señalización intracelular incluyen dos dominios coestimuladores y un dominio de señalización CD3- $\zeta$ .

En ciertos ejemplos, se preparó un CAR anti-CD 19 de tercera generación que comprendía, de 5' a 3', la secuencia señal (SEQ ID NO: 16), scFv específico de CD19 basado en FMC63 (SEQ ID NO: 17), y los dominios bisagra y transmembrana de CD8 (SEQ ID NO: 18) descrito anteriormente, seguido de un dominio coestimulador MyD88 (SEQ ID NO: 39; secuencia obtenida de WO 2016/036746), un dominio coestimulador N6 (SEQ ID NO: 8) y un dominio de señalización CD3- $\zeta$  (SEQ ID NO: 19). La secuencia de señales SV40 bi-polIA que comprende la SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35 se situó 3' corriente abajo de la secuencia CAR. Como se ha descrito en los ejemplos anteriores, la secuencia que codifica este constructo se clonó en el plásmido pDI, y la expresión de la CAR fue controlada por el promotor JeT. Además, el transgén estaba flanqueado por brazos de homología TRAC para permitir la inserción génica dirigida en el locus TRAC cuando esta plantilla donante se entregaba junto con la endonucleasa específica del sitio TRC1-2x.87EE. Esta plantilla donante de transgenes CAR estaba además flanqueada por secuencias de repetición terminal invertida. En la Figura 15 se ilustra una plantilla donante de MyD88/N6 CAR, y la secuencia de un vector que comprende la plantilla donante se proporciona como SEQ ID NO: 40.

En algunos experimentos, la plantilla donante de CAR se entregará como ADN linealizado tras la linealización del plásmido pDI. En otros casos, la plantilla del donante se empaquetará en partículas AAV6 para su administración viral.

**2. Evaluación de las células T CAR MyD88/N6 para la eliminación de células, la proliferación y la secreción de citoquinas**

En algunos experimentos, las células T CAR MyD88/N6 se producen como se describió anteriormente en el Ejemplo 4 mediante nucleofección de células T cebadas con un plásmido plantilla CAR linealizado, la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y el ARNsi STING para reducir la toxicidad mediada por los sensores de ácidos nucleicos intracelulares. Las células T CAR MyD88/N6 se cultivan y expanden como se describe.

Las células T CAR MyD88/N6 se caracterizan por su capacidad de eliminación de células, proliferación y secreción de citoquinas. Para evaluar la capacidad de eliminación de células y la proliferación, las células T CAR MyD88/N6 se someten a una prueba de estrés inducida por antígeno como se describe en el Ejemplo 3 anterior, en la que las células T CAR MyD88/N6 se co-cultivan con células K562 de ingeniería para expresar CD19 (células "K19") en varias relaciones efectoras:objetivo. La proliferación también se evalúa como se describe en el Ejemplo 4, etiquetando las células con CellTrace Violet y co-cultando con células K19 portadoras de antígeno en varias relaciones efectoras:objetivo. La secreción de citoquinas (por ejemplo, IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  humanos) se determina como se describe en el Ejemplo 2 anterior tras el cocultivo con células K19 en varias relaciones efectoras:objetivo.

Se llevan a cabo experimentos similares que examinan la matanza de células, la proliferación y la secreción de citoquinas utilizando la transducción de partículas AAV recombinantes para la entrega de la plantilla del donante CAR a las células T cebadas, que se nucleofectan además con ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87EE.

**3. Proliferación de células T CAR MyD88/N6**

Para comparar la función de los dominios coestimuladores N6 y MyD88/N6 en las células T CAR, se nucleofectó ADN plasmídico linealizado que expresaba el dominio coestimulador N6 o el novedoso CAR de tercera generación que contenía el dominio coestimulador MyD88/N6 en células T humanas junto con la endonucleasa específica del sitio TRC1-2x.87EE y el ARNsi STING. El constructo de codificación MyD88/N6 CAR se ilustra en la Figura 15. v que codifica el N6 CAR se denomina 7206 y se proporciona como SEQ ID NO: 38. El constructo que codifica el CAR MyD88/N6 se denomina 7240 y se proporciona como SEQ ID NO: 40.

Tras la nucleofección, las células se cultivaron en medios X-Vivo (Lonza) suplementados con 5% de FBS y 30 ng/ml de IL-2 (Gibco) durante 5 días. El día 5, las células T CD3 $^+$  restantes se marcaron utilizando el kit de selección positiva de CD3 humano II (StemCell Technologies) y se eliminaron magnéticamente según las recomendaciones del fabricante. Las fracciones restantes de CD3 agotadas se volvieron a suspender en medios X-Vivo suplementados con 10 ng/ml de IL-15 y 3 ng/ml de IL-21 (Gibco) y se cultivaron durante 2 días más. Para preparar las muestras para el ensayo, las células T 2e $^6$  de las condiciones N6 y MyD88/N6, así como las células T de control tratadas únicamente con TRC1-2x.87EE, se marcaron *in vitro* con una solución de 2  $\mu$ M de solución de Cell-trace Violet (CTV). Tras la incubación, se evaluó la consistencia del etiquetado del CTV y las frecuencias de las células T CAR en el citómetro de flujo Becton-Dickinson LSR:Fortessa tras la tinción con CD19-Biotin Fc (Acro Biosystems) y Streptavidin PE (BD). Para el ensayo de proliferación, las frecuencias de células T CAR se normalizaron al 1% de la población total de células T añadidas, con 2e $^5$  células T totales (2e $^3$  células T CAR) añadidas a pocillos duplicados en una placa de fondo redondo de 96 pocillos en medio X-Vivo sin suplemento de citoquinas. Para evaluar la proliferación de células T CAR específicas de antígeno, se añadieron 4e $^3$  células K19 a un pocillo con 4e $^3$  células K562 añadidas al segundo para calcular la proliferación no específica de fondo. Las células se mezclaron y se incubaron durante un total de 6 días.

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

#### **4. Resultados de los estudios de proliferación**

Los resultados del ensayo de proliferación comparando los dominios coestimuladores N6 y MyD88/N6 se muestran en la Figura 16. Para medir la proliferación de fondo de las poblaciones negativas de CAR, se comparó la dilución del CTV en las células T derivadas de la muestra de control sólo nucleofectada con TRC en pocillos co-cultivados con células K19 o K562. Es importante destacar que ambos subconjuntos de células T mostraron niveles similares de proliferación no específica en presencia de K19 (sombreado claro) y de células K562 (sombreado oscuro), lo que sugiere que cualquier proliferación era independiente de CD19 (Figura 16A y 16B). En comparación, tanto las células T CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup> nucleofectadas con ADN plasmídico linealizado que expresa el dominio coestimulador N6 mostraron una mayor dilución del CTV en presencia de células K19 en comparación con los controles K562, lo que indica una proliferación sustancial específica del antígeno (Figura 16C y 16D). En particular, la misma evaluación realizada en las células T que expresan el dominio coestimulador MyD88/N6 también mostró una mayor proliferación de las células T CAR en respuesta a las células K19 (Figura 16E y 16F). La dilución global del CTV fue menor en las células T que expresaban MyD88/N6 en comparación con las células T CAR que expresaban el dominio coestimulador N6 solo; sin embargo, la expresión de cualquiera de los dos dominios coestimuladores dio lugar a una mayor dilución del CTV en comparación con las células T de control solo TRC.

#### **5. Conclusiones**

La nucleofeción de células T cebadas con ADN plasmídico linealizado que expresa el dominio coestimulador N6 o el MyD88/N6 de tercera generación dio lugar a células T CAR que fueron capaces de proliferar, según lo indicado por la dilución del CTV, de una manera específica al antígeno. Además, la proliferación se produjo en los subconjuntos de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y por encima del fondo observado en las células de control que no expresan CAR. En conjunto, este estudio demostró que tanto N6 como MyD88/N6 pueden funcionar como dominios coestimuladores en las células T CAR.

#### **Ejemplo 7**

##### **Caracterización de novedosos dominios coestimuladores en un constructo inducible**

###### **1. Producción de células T CAR que expresan un CAR de primera generación y un constructo inducible que comprende un novedoso dominio coestimulador**

Se prepararon otros constructos para evaluar los novedosos dominios coestimuladores abarcados por la invención como parte de un constructo coestimulador inducible, que se coexpresa con un CAR anti-CD19 de primera generación que comprende un dominio de señalización CD3- $\zeta$ .

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

La primera generación de CAR anti-CD 19 codificada por el casete de expresión de CAR incluía, de 5' a 3', la secuencia señal (SEQ ID NO: 16), el scFv específico de CD19 basado en FMC63 (SEQ ID NO: 17), y los dominios bisagra y transmembrana de CD8 (SEQ ID NO: 18) descrito anteriormente, con una región intracelular que comprende un dominio de señalización CD3- $\zeta$  (SEQ ID NO: 19). La secuencia de señales SV40 bi-polIa que comprende la SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 34 se situó 3' corriente abajo de la secuencia CAR.

El constructo coestimulador inducible incluía, de 5' a 3', un dominio coestimulador N6 solo (SEQ ID NO: 8), o un intrón T grande de MyD88 (SEQ ID NO: 39), y ORF N6.64 (SEQ ID NO: 8) en tandem, seguido de un dominio Fv que comprende dos dominios FKBP12v36 de unión a ligando en tandem (SEQ ID NO: 41; secuencias obtenidas de WO 2015/123527), que se unen a la pequeña molécula rimiducid para inducir la dimerización del constructo y la activación de la señalización coestimuladora.

Como se ha descrito en los ejemplos anteriores, estos constructos se clonaron en el plásmido pDI, y la expresión tanto del constructo coestimulador inducible como del CAR anti-CD 19 se controló mediante el promotor JeT. Además, estos constructos estaban flanqueados por brazos de homología TRAC para permitir la inserción de genes dirigidos en el locus TRAC cuando se administran junto con la endonucleasa específica del sitio TRC1-2x.87EE. Estos constructos estaban además flanqueados por secuencias de repetición terminal invertida.

En algunos experimentos, la plantilla donante se entregará como ADN linealizado tras la linealización del plásmido pDI. En otros casos, la plantilla del donante se empaquetará en partículas AAV6 para su administración viral.

Las células que expresan la CAR anti-CD19 junto con un constructo coestimulador inducible que tiene sólo el dominio coestimulador N6 se denominan células T CAR iN6. Las células que expresan el CAR anti-CD19 junto con un constructo coestimulador inducible que tiene los dominios coestimuladores MyD88 y N6 se denominan células T CAR iMyD88/N6.

5 **2. Evaluación de células T CAR con constructos inducibles para la eliminación de células, la proliferación y la secreción de citoquinas**

En algunos experimentos, las células T CAR iN6 o las células T CAR iMyD88/N6 se producen como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 4 mediante nucleofección de células T cebadas con un plásmido plantilla linealizado, la meganucleasa TRC 1-2x.87EE y el ARNsi STING para reducir la toxicidad mediada por los sensores de ácidos nucleicos intracelulares. Las células T CAR iN6 o las células T CAR iMyD88/N6 se cultivan y expanden posteriormente como se ha descrito.

10 Las células T CAR iN6 y las células T CAR iMyD88/N6 se caracterizan por su capacidad de eliminación de células, proliferación y secreción de citoquinas tanto en presencia como en ausencia de la pequeña molécula rimiducid, que induce la dimerización del constructo inducible e inicia la señalización costimuladora en la célula. Para evaluar la 15 competencia de eliminar células y la proliferación, las células T CAR se someten a una prueba de estrés inducida por antígeno como se describe en el Ejemplo 3 anterior, en la que las células T CAR se co-cultivan con células K562 diseñadas para expresar CD19 (células "K19") en varias relaciones efectoras:objetivo. La proliferación también se evalúa como se describe en el Ejemplo 4, etiquetando las células con CellTrace Violet y co-cultando con células K19 portadoras de antígeno en varias relaciones efectoras:objetivo. La secreción de citoquinas (por ejemplo, IL-2, TNF $\alpha$  e 20 IFNy humanos) se determina como se describe en el Ejemplo 2 anterior tras el cocultivo con células K19 en varias relaciones efectoras:objetivo.

Experiments similares que examinan la matanza de células, la proliferación y la secreción de citoquinas se llevan a cabo utilizando la transducción de partículas AAV recombinantes para la entrega de la plantilla del donante a las células T cebadas, que se nucleofectan además con ARNm que codifica la meganucleasa TRC 1-2x.87EE.

25 **3. Proliferación de células T CAR iMyD88/N6**

Para caracterizar la funcionalidad de los novedosos dominios coestimuladores en un constructo inducible, se nucleofectaron células T cebadas con ADN plasmídico linealizado que expresaba un constructo coestimulador inducible iMyD88/N6 o, como control, el dominio coestimulador N6 expresado como parte del CAR. Las células se nucleofectaron además con la endonucleasa específica del sitio TRC1-2x.87EE y el siRNA de STING como se ha 30 descrito anteriormente. Como control negativo, una muestra separada fue nucleofectada con la endonucleasa específica del sitio TRC1-2x.87EE y el siRNA STING solamente. El constructo de la plantilla del donante CAR se ilustra en la Figura 17. Como se ha descrito anteriormente, el constructo que codifica el N6 CAR se denomina 7206 y se proporciona como SEQ ID NO: 38. El constructo que codifica el dominio coestimulador iMyD88/N6 se denomina 7235 y se proporciona como SEQ ID NO: 42.

35 Después de la nucleofección, las muestras de células T descansaron durante 6 horas en un medio X-Vivo (Lonza) suplementado con 5% de FBS y 30 ng/ml de IL-2 (Gibco). A continuación, las muestras se dividieron por la mitad en pocillos separados, uno de los cuales recibió rimiducid a una concentración final de 5 nanomolar y el otro se dejó sin tratar. Las células se incubaron posteriormente durante 5 días. El día 5, las células T CD3 $^{+}$  restantes se marcaron 40 utilizando el kit de selección positiva de CD3 humano II (StemCell Technologies) y se eliminaron magnéticamente según las recomendaciones del fabricante. Las fracciones restantes de CD3 se volvieron a suspender en medio X-Vivo suplementado con 10 ng/ml de IL-15 y 3 ng/ml de IL-21 (Gibco). Las muestras que habían recibido rimiducid en el día 0 después de la nucleofección se enriquecieron con rimiducid fresco a una concentración final de 5 nanomolar, mientras que las muestras no tratadas se resuspendieron en X-Vivo suplementado con citoquinas solamente. A continuación, las células se incubaron durante 2 días más.

45 Para preparar las muestras para el ensayo, las células T 2e<sup>6</sup> de las condiciones iMyD88/N6 y N6 que habían recibido o no rimiducid, así como las células T de control tratadas sólo con TRC1-2x.87EE, se marcaron *in vitro* con una solución de 2  $\mu$ M de solución de Cell-trace Violet (CTV). Tras la incubación, se evaluó la consistencia del etiquetado del CTV y las frecuencias de las células T CAR en el citómetro de flujo Becton-Dickinson LSR:Fortessa tras la tinción con CD19-Biotin Fc (Acro Biosystems) y Streptavidin PE (BD). Las frecuencias de células T CAR se normalizaron al 50 1% de la población total de células T añadidas, con 2e<sup>5</sup> células T totales (2e<sup>3</sup> células T CAR) añadidas a dos pocillos separados en una placa de fondo redondo de 96 pocillos en medio X-Vivo sin suplemento de citoquinas. Un pocillo recibió entonces 4e<sup>3</sup> células K19 objetivo, mientras que el otro recibió 4e<sup>3</sup> células K562 como control. A continuación, se añadió rimiducid a las muestras que habían recibido rimiducid el día 0 y el día 5 post-nucleofección, respectivamente. Las células se mezclaron y se incubaron durante un total de 6 días.

55 El día 6 después del co-cultivo, las muestras se tiñeron para el análisis de citometría de flujo. Para cuantificar la proliferación de subconjuntos individuales de células T, las muestras se tiñeron con los anticuerpos CD4 BV711 y CD8 BV785 (Biolegend), y la exclusión de las células muertas durante el análisis se produjo mediante la adición del

colorante fantasma BV510 (TONBO biosciences) al cóctel de tinción. Después de la tinción, se ejecutaron las muestras y se recogieron los datos en el citómetro de flujo Becton-Dickinson LSR:Fortessa.

#### **4. Resultados de los estudios de proliferación**

Los resultados del ensayo de proliferación comparando el novedoso constructo coestimulador inducible iMyD88/N6 con el CAR N6 se muestran en las Figuras 18-20. Las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> procedentes de células nucleofectadas que no expresan TRC mostraron niveles similares de proliferación no específica cuando se co-cultivaron con células K19 (sombreado claro) o K562 (sombreado oscuro) (Figura 18A y 18B).

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

En el caso del constructo coestimulador inducible, la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que expresan iMyD88/N6 fue mayor cuando se co-cultivaron con células K19 (sombreado claro) en comparación con las células de control K562 (sombreado oscuro) (Figura 20A y 20C). Es importante destacar que el aumento de la dilución del CTV dependía de rimiducid (sombreado oscuro) en comparación con las muestras no tratadas con rimiducid (sombreado claro) cuando se cultivaban con células K19 para ambos subconjuntos de células T analizados, lo que apoya la función inducible del interruptor iMyD88/N6 (Figura 20B y 20D).

#### **5. Conclusiones**

La expresión del novedoso constructo coestimulador inducible iMyD88/N6 en las células T CAR dio lugar a la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que fue dependiente del antígeno. Sorprendentemente, la dilución del CTV en las células T cultivadas fue mayor en presencia de rimiducid, lo que demuestra la naturaleza inducible de los constructos de dominios coestimuladores cuando se expresan en células T CAR. Como el rimiducid no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de células T CAR cuando el dominio coestimulador se expresa como parte de la CAR, estos datos apoyan la funcionalidad de los novedosos dominios coestimuladores del interruptor en la función de las células T CAR.

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Precision Biosciences, Inc.
- 30 <120> DOMINIOS COESTIMULADORES PARA SU USO EN CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE
- <130> 229-017T1
- <140>
- <141> 2017-10-04
- <150> EP 17 800 638.3
- 35 <151> 2017-10-04
- <150> PCT/US2017/055133
- <151> 2017-10-04
- <150> US 62/403,880
- <151> 2016-10-04
- 40 <150> US 62/501,475
- <151> 2017-05-04
- <150> US 62/556,199
- <151> 2017-09-08
- <160> 42
- 45 <170> PatentIn version 3.5

# ES 2 925 644 T3

	<210> 1	
	<211> 126	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Sintetizado	
	<400> 1	
	aaacatagcc gcaaaaaatt tgtgcacatctg ctgaaacgcc cgtttattaa aaccaccggc	60
	gcggcgccaga tggaagatgc gagcagctgc cgctgcccgc aggaagaaga aggcgaaatgc	120
	gatctg	126
	<210> 2	
10	<211> 126	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado	
15	<400> 2	
	aaatggggcc gcaaaaaact gctgtatctg tttaaacgcc cgtttgcgca gccgattcgc	60
	accgcgcagg aagaagatgc gagcagctgc cgcttccgg aagaagaaga aggcaactgc	120
	gaactg	126
	<210> 3	
	<211> 126	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado	
	<400> 3	
	aaacatagcc gcaaaaaat tattttctg tataaaaacc cgtttatgaa accgaccaac	60
	agcgcgcagg aagaagatgc gagcagctgc cgcttccgc aggaagaaga aggcgattgc	120
	gatctg	126
25	<210> 4	
	<211> 126	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Sintetizado	

ES 2 925 644 T3

<400> 4

aaagcgagcc gcaaaaaagc ggcggccgcg gcgaaaagcc cgtttgcgag cccggcgagc 60

agcgcgcagg aagaagatgc gagcagctgc cgcgccgca gcgaagaaga aggcaagctgc 120

gaactg 126

<210> 5

<211> 42

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 5

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

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

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

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Sintetizado

<400> 6

Lys Trp Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Leu Phe Lys Arg Pro Phe Ala  
1 5 10 15

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

20 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Asn Cys Glu Leu  
35 40

<210> 7

20 <211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

25 <400> 7

ES 2 925 644 T3

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

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

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

<210> 8

<211> 42

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 8

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

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

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

10 <210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintetizado

<400> 9

Gln Met Glu Asp  
1

<210> 10

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 10

Gln Glu Glu Asp  
1

<210> 11

<211> 4

<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Sintetizado  
5 <400> 11  
    **Glu Glu Glu Gly**  
    1  
<210> 12  
<211> 8  
<212> PRT  
10 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Sintetizado  
<400> 12  
    **Ala Ser Ser Cys Arg Cys Pro Gln**  
    1                   5  
15 <210> 13  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
20 <223> Sintetizado  
<400> 13  
    **Ala Ser Ser Cys Arg Phe Pro Glu**  
    1                   5  
<210> **14**  
<211> 8  
25 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Sintetizado  
<400> **14**  
30      **Ala Ser Ser Cys Arg Phe Pro Gln**  
    1                   5  
<210> 15  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial  
35 <220>

ES 2 925 644 T3

<223> Sintetizado

<400> 15

Ala Ser Ser Cys Arg Ala Pro Ser  
1 5

<210> 16

5 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

10 <400> 16

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro  
20

<210> 17

<211> 242

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
20 25 30

20

# ES 2 925 644 T3

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Gly Gly Ser  
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Gln Glu  
115 120 125

Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys  
130 135 140

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 18

<211> 69

<212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 18

# ES 2 925 644 T3

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile  
35 40 45

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

Ile Thr Leu Tyr Cys  
65

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 20

<211> 41

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Sintetizado

# ES 2 925 644 T3

<400> 20

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
35 40

<210> 21

<211> 42

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 21

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
20 25 30

10 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
35 40

<210> 22

<211> 444

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Sintetizado

<400> 22

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

ES 2 925 644 T3

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
50 55 60

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

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly  
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys  
210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys  
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp

# ES 2 925 644 T3

290

295

300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23

<211> 485

<212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 23

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
50 55 60

ES 2 925 644 T3

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

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Glu  
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys  
210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys  
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly

# ES 2 925 644 T3

305	310	315	320
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Ser Lys Arg			
325	330	335	
Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro			
340	345	350	
Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe			
355	360	365	
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro			
370	375	380	
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly			
385	390	395	400
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro			
405	410	415	
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr			
420	425	430	
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly			
435	440	445	
Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln			
450	455	460	
Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln			
465	470	475	480
Ala Leu Pro Pro Arg			
485			
<210> 24			
<211> 486			
<212> PRT			
5	<213> Secuencia Artificial		
<220>			
<223> Sintetizado			
<400> 24			
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu			
1	5	10	15
His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu			
20	25	30	

# ES 2 925 644 T3

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
50 55 60

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

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu  
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys  
210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys  
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu

# ES 2 925 644 T3

275

280

285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
305 310 315 320

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

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln  
340 345 350

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

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
370 375 380

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

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

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

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

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

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

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485

<210> 25

<211> 486

<212> PRT

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 25

# ES 2 925 644 T3

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
50 55 60

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

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu  
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys  
210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys  
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

# ES 2 925 644 T3

245

250

255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
305 310 315 320

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

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

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

Glu Gly Glu Cys Asp Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
370 375 380

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

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

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

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

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

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

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485

<210> 26

<211> 486

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

# ES 2 925 644 T3

<400> 26

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
50 55 60

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

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu  
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly  
180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
195 200 205

Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys

# ES 2 925 644 T3

210

215

220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys  
225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
305 310 315 320

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

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

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

Glu Gly Asn Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
370 375 380

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

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

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

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

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

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

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485

<210> 27

# ES 2 925 644 T3

<211> 486

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Sintetizado

<400> 27

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
50 55 60

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

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser  
145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly  
165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly

# ES 2 925 644 T3

180	185	190
Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser		
195	200	205
Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys		
210	215	220
Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys		
225	230	235
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
245	250	255
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro		
260	265	270
Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu		
275	280	285
Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp		
290	295	300
Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly		
305	310	315
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys His Ser Arg		
325	330	335
Lys Lys Ile Ile Phe Leu Tyr Lys Asn Pro Phe Met Lys Pro Thr Asn		
340	345	350
Ser Ala Gln Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Arg Phe Pro Gln Glu Glu		
355	360	365
Glu Gly Asp Cys Asp Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala		
370	375	380
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu		
385	390	395
Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp		
405	410	415
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu		
420	425	430

# ES 2 925 644 T3

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

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

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

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485

<210> 28

<211> 486

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 28

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln  
35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr  
50 55 60

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

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile  
85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly  
100 105 110

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu  
130 135 140

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser

# ES 2 925 644 T3

145	150	155	160
Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly			
165	170	175	
Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly			
180	185	190	
Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser			
195	200	205	
Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys			
210	215	220	
Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys			
225	230	235	240
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
245	250	255	
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro			
260	265	270	
Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu			
275	280	285	
Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp			
290	295	300	
Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly			
305	310	315	320
Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Ala Ser Arg			
325	330	335	
Lys Lys Ala Ala Ala Ala Lys Ser Pro Phe Ala Ser Pro Ala Ser			
340	345	350	
Ser Ala Gln Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Arg Ala Pro Ser Glu Glu			
355	360	365	
Glu Gly Ser Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala			
370	375	380	
Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu			
385	390	395	400

# ES 2 925 644 T3

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

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

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

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

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

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 485

<210> 29

<211> 7464

<212> ADN

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 29

cagcagctgg	cgtaatagcg	aagaggcccg	caccgatcgc	cttcccaac	agttgcgcag	60
cctgaatggc	aatggaaatt	ccagacgatt	gagcgtcaaa	atgttaggtat	ttccatgagc	120
gttttcctg	ttgcaatggc	tggcgtaat	attgttctgg	atattaccag	caaggccgat	180
agttttagtt	cttctactca	ggcaagtat	gttattacta	atcaaagaag	tattgcgaca	240
acggtaatt	tgcgtatgg	acagactctt	ttactcggtg	gcctcactga	ttataaaaac	300
acttctcagg	attctggcgt	accgttcctg	tctaaaatcc	ctttaatcgg	cctctgttt	360
agctcccgct	ctgattctaa	cgagggaaagc	acgttatacg	tgctcgtcaa	agcaaccata	420
gtacgcgccc	tgtagcggcg	cattaagcgc	ggcgggtgtg	gtggttacgc	gcagcgtgac	480
cgctacactt	gccagcgccc	tagcggccgc	tccttcgct	ttcttcctt	ccttctcgc	540
cacgttcgcc	ggctttcccc	gtcaagctct	aaatcgaaaa	ctccctttag	ggttccgatt	600
tagtgcttta	cggcacctcg	acccaaaaaa	acttgattag	ggtgatggtt	cacgtatgg	660
gccatcgccc	tgatagacgg	ttttcgccc	tttgacgttg	gagtccacgt	tcttaatag	720
tggactcttg	ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	tcggtctatt	ctttgattt	780
ataaggattt	ttgccgattt	cggcctattg	gtaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	840
taacgcgaat	tttaacaaaa	tattaacgtt	tacaattaa	atatttgctt	atacaatctt	900

# ES 2 925 644 T3

cctgttttg gggctttct gattatcaac cgggtacat atgattgaca tgcttagttt	960
acggcgccgccc gggttggcca ctcccctctc ggcgcgtcgc tgcgtcactg aggccggcg	1020
accaaaggcgc ccccgacgccc cgggcttgc cgggcccgc tcagtgagcg agcgagcgcg	1080
cagagaggggatggccaact ccatcaactag gggttctac gcgtagatct catattctgg	1140
cagggtcagt ggctccaact aacatttgtt tggtaacttta cagtttattttt aatagatgtt	1200
tatattggaga agctctcatt tcttctcag aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca	1260
ccatattcat tttgcagggtt aaattccctga gatgttggaa gtcgtgtga cttgtcaag	1320
gccttatatc gagtaaacgg tagcgctggg gcttagacgc aggtgttctg atttatagtt	1380
caaaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagatttc ccaacttaat	1440
gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgcccagc ctaagttggg gagaccactc	1500
cagattccaa gatgtacagt ttgtttgtt gggcctttt cccatgcctg cctttactct	1560
gccagagtttattgtggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataaggagta	1620
ttatataagta gcccgcatt tcaggttcc ttgagtggca ggccaggcct ggccgtgaac	1680
gttcaactgaa atcatggcctt cttggccaaag attgatagtt tgcgtgtc cctgagttccc	1740
agtccatcac gagcagctgg tttctaaagat gctatttccc gtataaagca tgagaccgtg	1800
acttgccagc cccacagagc cccgccttg tccatcaactg gcatctggac tccagcctgg	1860
gttggggcaa agagggaaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgc cccacagata	1920
tccagaaccc tgaccctgccc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg	1980
tctgcctatt caccgattttt gattctaaaaaaatgtgtc acaaagtaag gattctgtat	2040
tgtatatac agacaaaaact gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg	2100
ctgtggcctg gagcaactag tggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgcgcgttc	2160
cgaaagttgc cttttatggc tggcggaga atggcgggtg aacgcccgtg attatataag	2220
gacgcgcggg gtgtggcaca gctagttccg tgcagccgg gattttggtc gcggttcttgc	2280
tttggccgg aaagccacca tggcgctccc agtgcacagcc ttacttttac ctctggcggtt	2340
attattgcac gcggtcgtc ctgacataca gatgactcag actaccttcc ccttatctgc	2400
ttcttttaggc gaccgagtaa caaatcttgc cggggccagc caggacatct caaaatactt	2460
aaactggtat cagcagaagc cggacggaaac agttaagtttgc ctcatttacc acacgtcgag	2520
attacactca ggcgttccta gcccatttc ggggtccgggt tccggtaacgg actacagcc	2580
gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cggccacctac ttctgtcagc agggcaacac	2640
gctcccgatc acattcgggttgc gggaaactaa gctggagatt acggggggcg gtggcagcgg	2700
tggcggcggc agcgggggttgc ggggtcgga ggtcaagtttca caggagagcg gaccgggtt	2760
ggtcgcaccc agccagagcc tctcagtcac gtgcactgtt tctggagtc gtcgtccaga	2820

ES 2 925 644 T3

tcacggggta tcatggatac gacagccgcc tagaaagggc tttagtggc tgggggtt 2880  
ctggggaaagt gaaaccacat actacaactc agctctcaag agccgcctca ccatcattaa 2940  
ggacaacagt aagtccgagg ttttcttaaa gatgaactct ctccagactg acgacaccgc 3000  
tatTTactac tgccgcaagc actactacta cggcgggagt tacgcaatgg actactgggg 3060  
tcagggcact tctgtgaccg tatccagcac tactacccca gccccacgtc ccccccacgccc 3120  
agctccaacg atagcaagtc agcccttatac tcttcgcct gaggcttgca ggcccgccgc 3180  
ggcgccgccc gttcacacgc gaggactaga cttcgcctgc gacatctaca tctgggcacc 3240  
actagccggg acttgcggag tggtgttggt gagcttgta ataacgctct actgcaagcg 3300  
tgggagaaag aagctcttgt acatTTcaa gcagccattc atgcgtcccg ttcagacgac 3360  
tcaggaggag gacggctgct cgtgccgatt cccggaggag gaggaggcgc gttgcgaact 3420  
cagagtgaag ttctctcgct ccgcggacgc acccgcttac cagcagggtc agaaccagct 3480  
ataacaacgag ttaaacctgg ggccggggga ggagtagcgc gtgttagaca agcgttagagg 3540  
tagggacccg gagatgggag gcaaggctcg gagaaagaac ccccaggagg gcctgtacaa 3600  
cgaactccag aaggacaaga tggctgaggc gtactcggag attgttatga agggcgagag 3660  
acgtcgcgga aaggacacg acggcttata ccaggggctt tccaccgcga ccaaggacac 3720  
atacgacgcg ctgcacatgc aagccttacc acctcgatga ggtaccagcg gccgcttcga 3780  
gcagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa 3840  
aaatgctta tttgtgaaat ttgtgtgct attgctttat ttgttaaccat tataagctgc 3900  
aataaacaag ttaacaacaa caattcgaat ttaaatcgga tccgcacaa atctgacttt 3960  
gcatgtgcaa acgcctcaa caacagcatt attccagaag acacccttcc ccccaagccca 4020  
ggtaaggcga gctttggcgc ctgcgcaggc tgtttccttgc ttccaggaat ggccaggttc 4080  
tgcccagagc tctggtaat gatgtctaaa actcctctga ttgggtggct cggccttatac 4140  
cattgccacc aaaacccctct ttttactaag aaacagttag ccttgcgttgc gcagtccaga 4200  
gaatgacacg ggaaaaaaagc agatgaagag aaggtagcag gagagggcac gtggcccagc 4260  
ctcagtcctc ccaactgagt tccgcctgc ctgccttgc tcagactgtt tgccccttac 4320  
tgctcttcta ggcctcattc taagccccctt ctccaaagtttgc ccttccttata ttctccctg 4380  
tctgccaaaa aatcttcccc agctcaactaa gtcagtctca cgcagtcact cattaaacca 4440  
ccaatcactg attgtgcgg cacatgaatg caccaggtgt tgaagtggag gaattaaaaaa 4500  
gtcagatgag ggggtgtgcggc agaggaagca ccattctagt tgggggagcc catctgtcag 4560  
ctggggaaaag tccaaataac ttcaatttttgc aatgtgtttt aactcagggt tgagaaaaaca 4620  
gccacccatca ggacaaaaagt cagggaaaggg ctctctgaag aaatgtact tgaagatacc 4680

# ES 2 925 644 T3

agccctacca	agggcaggga	gaggaccaat	tatggagtt	ggccactccc	tctctgcg	4740
ctcgctcg	cactgaggcc	gccccggcaa	agcccgccg	tcgggcgacc	tttggtcg	4800
cggcctcagt	gagcgagcga	gcgcgcagag	agggagtggc	caacggcg	cctgcagg	4860
tcaaaaatag	ctaccctctc	cgccatgaat	ttatcagcta	gaacgg	ttga	4920
gatggt	gatt	tgactgtctc	cgcccttct	caccgc	tttgcacc	4980
tcaggcattg	cattt	aaaat	atatgagg	gt	ttatccttgc	5040
aaggcttctc	ccgcaaaagt	attacagg	gttata	at	ttggtacaac	5100
ttatgctctg	aggcttattt	gcttaatttt	gctaattctt	tgc	cttgcct	5160
ttggatgtt	gaattcctga	tgccgtt	tttgccttac	catctgt	gcgttac	5220
ccgcata	atgg	tgactctca	gtacaatct	ctctgat	gcata	5280
acacccgcca	acacccgctg	acgcgc	ccctg	acgggctt	gttgc	5340
cagacaagct	gtgaccgt	ccggag	ctg	catgtgt	tcac	5400
gaaacgcgc	agacgaaagg	gcctcgt	gtat	ccatttt	ttatagg	5460
aataatgg	ttttagacgt	cagg	tttgcac	tttgcgg	aatgtgc	5520
ttgtt	ttaata	attcaat	gtatcc	ctc	atgaga	5580
aatgcttca	taatattgaa	aaaggaa	agat	tgat	ttcc	5640
tat	tttgcgg	cat	tttgcct	tttgc	tttgc	5700
agtaaaagat	gtc	aaagatc	atgtgg	gttgc	tttgc	5760
cagcgttaag	atc	tttg	tttgc	tttgc	tttgc	5820
taaagtctg	ctatgtgg	cggt	tattatc	ccgt	tatttgc	5880
tcggcata	cactatt	ctc	agaatgact	gtt	tttgc	5940
tcttacggat	ggc	atgac	tttgc	tttgc	tttgc	6000
cactgcggcc	aactt	acttc	tgaca	tttgc	tttgc	6060
gcacaacatg	ggg	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	6120
cataccaaac	gac	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	6180
actattaact	ggc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	6240
ggcggataaa	gtt	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	6300
tgataaaatct	ggag	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	6360
tggtaagccc	tcc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	6420
acgaaataga	cag	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	6480
ccaagtttac	tc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	6540
ctaggtgaag	atc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	6600

# ES 2 925 644 T3

ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct	6660
gccccgtataatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg ttttttgcc	6720
ggatcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggttaactggc ttccagcagag cgccagataacc	6780
aaatactgtc cttctatgtt agccgtatgtt aggcaccac ttcaagaact ctgttagcacc	6840
gcctacatac ctcgctctgc taatccgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc	6900
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg	6960
aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata	7020
cctacagcgt gagctatgag aaagcgcac gcttccgaa gggagaaagg cggacaggtt	7080
tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga ggcgcacgagg gagcttccag gggaaaacgc	7140
ctggtatctt tatagtccctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttgtg	7200
atgctcgta gggggggcgga gcctatggaa aaacgcccgc aacgcggcct ttttacggtt	7260
cctggcctt tgctggcctt ttgctcacat gttcttcct gcgttatccc ctgattctgt	7320
ggataaccgtt attaccgcct ttgagtggc tgataccgct cggccgcagcc gaacgaccga	7380
gcccgcgcgag tcagtgagcg aggaagcggaa agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc	7440
cgccgcgttgg ccgattcatt aatg	7464
<210> 30	
<211> 7464	
<212> ADN	
5 <213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Sintetizado	
<400> 30	
cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc cttcccaac agttgcgcag	60
cctgaatggc gaatggaaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgttaggtat ttccatgagc	120
gttttcctg ttgcaatggc tggcgtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat	180
agttttagtt cttctactca ggcaagtgtat gtttacta atcaaagaag tattgcgaca	240
acggttaatt tgcgtgatgg acagacttctt ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac	300
acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc cttaatcggtt cttctgttt	360
agctcccgct ctgattctaa cgagggaaagc acgttatacg tgctcgtaa agcaaccata	420
gtacgcgcgc tggtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac	480
cgctacactt gccagcgcgc tagcgccgc tcctttcgct ttcttcctt cttctcgcc	540
cacgttcgccc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt	600
tagtgctta cggcacctcg accccaaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtatgg	660

ES 2 925 644 T3

ES 2 925 644 T3

gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cgccacccat ttctgtcagc agggcaacac	2640
gctcccgtag acatcggtg ggggaactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagcgg	2700
tggccggcggc agcgggggtg gccgctcgga ggtcaaggta caggagagcg gaccgggctt	2760
ggtcgcaccc agccagagcc tctcagtcac gtgcactgtg tctggagtca gtctcccaga	2820
ctacgggta tcatggatac gacagccgccc tagaaaggc tttagtggc tgggggttat	2880
ctggggaaagt gaaaccacat actacaactc agctctcaag agccgcctca ccatcattaa	2940
ggacaacagt aagtccgagg ttttcttaaa gatgaactct ctccagactg acgacaccgc	3000
tatttactac tgccgcaagc actactacta cggccggagt tacgcaatgg actactggg	3060
tcagggcact tctgtgaccg tatccagcac tactacccca gccccacgtc cccccacgccc	3120
agctccaacg atagcaagtc agcccttatac tcttcgcctt gaggcttgca ggccgcggc	3180
ggccggcgcgc gttcacacgc gaggactaga cttcgcctgc gacatctaca tctgggcacc	3240
actagccggg acttgcggag ttttgttgtt gagcttgta ataacgctct actgcaaaca	3300
tagccgcaaa aaatttgc atctgctgaa acgcccgtt attaaaacca ccggcgcggc	3360
gcagatggaa gatgcgagca gtcgcgcgtc cccgcaggaa gaagaaggcg aatgcgatct	3420
gagagtgaag ttctctcgct ccgcggacgc acccgcttac cagcagggtc agaaccagct	3480
atacaacgag ttaaacctgg ggccgcggga ggagtacgac gtgttagaca agcgttagagg	3540
tagggacccg gagatggag gcaagcctcg gagaaagaac ccccaggagg gcctgtacaa	3600
cgaactccag aaggacaaga tggctgaggc gtactcgag attggatgaa agggcgagag	3660
acgtcgccga aaggacacg acggcttata ccaggggtt tccaccgcga ccaaggacac	3720
atacgacgcg ctgcacatgc aagccttacc acctcgatga ggtaccagcg gccgcttcga	3780
gcagacatga taagatacat tgatgatgtt ggacaaacca caactagaat gcagtggaaa	3840
aaatgctta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgttaaccat tataagctgc	3900
aataaacaag ttaacaacaa caattcgaat ttaaatcgga tccgcaccaa atctgacttt	3960
gcatgtgcaa acgcctcaa caacagcatt attccagaag acaccctt ccccaagccca	4020
ggtaaggcga gctttggcctc cttcgccaggc tgtttcctt cttcaggaat ggccaggttc	4080
tgcggcggc tctggtcaat gatgtctaaa actcctctga ttgggtgtct cggccttatac	4140
cattgccacc aaaacccctct ttttactaag aaacagtggc ccttgcgtt cgcgtccaga	4200
gaatgacacg gaaaaaaagc agatgaagag aagggtggcag gagaggccac gtggcccgac	4260
ctcagtcact ccaactgagt tctcgccgtc ctgccttgc tcagactgtt tgcccttac	4320
tgctcttcta ggcctcattc taagccccctt ctccaaaggta ccttccttta ttctccctg	4380
tctgcacaaa aatcttcccc agctcaactaa gtcagtcacta cgcagtcact cattaaacca	4440

ccaatcactg	attgtgccgg	cacatgaatg	caccaggtgt	tgaagtggag	gaattaaaaaa	4500
gtcagatgag	gggtgtgcc	agaggaagca	ccattctagt	tgggggagcc	catctgtcag	4560
ctggaaaag	tccaaataac	ttcagattgg	aatgtgtttt	aactcaggg	tgagaaaaca	4620
gccacccca	ggacaaaagt	cagggaaaggg	ctctctgaag	aaatgtact	tgaagatacc	4680
agccctacca	agggcaggga	gaggaccaat	tgatggagtt	ggccactccc	tctctgcgcg	4740
ctcgctcgct	cactgaggcc	gcccccggca	agcccccggcg	tcggcgacc	tttggtcgccc	4800
cggcctcagt	gagcgagcga	gcgcgcagag	agggagtggc	caacggcgcg	cctgcaggtc	4860
tcaaaaatag	ctaccctctc	cggcatgaat	ttatcagcta	gaacgggttga	atatcatatt	4920
gatggtgatt	tgactgtctc	cggcctttct	caccgggttgc	aatctttacc	tacacattac	4980
tcaggcattg	cattaaaaat	atatgaggg	tctaaaaatt	tttattccttgc	cgttgaaata	5040
aaggcttctc	ccgcaaaaagt	attacaggg	cataatgttt	ttggtacaac	cgatttagct	5100
ttatgctctg	aggctttatt	gcttaatttt	gctaattctt	tgccctgcct	gtatgattta	5160
ttggatgttg	gaattcctga	tgccgttattt	tctccttacg	catctgtgcg	gtatttcaca	5220
ccgcataatgg	tgcactctca	gtacaatctg	ctctgatgcc	gcatagttaa	gccagccccg	5280
acacccgcca	acacccgctg	acgcgcctg	acgggcttgc	ctgctcccg	catccgctta	5340
cagacaagct	gtgaccgtct	ccgggagctg	catgtgtcag	aggttttac	cgtcatcacc	5400
gaaacgcgcg	agacgaaagg	gcctcgat	acgcctattt	ttataggtta	atgtcatgat	5460
aataatggtt	tcttagacgt	caggtggcac	ttttcgggaa	aatgtgcgcg	gaacccctat	5520
ttgtttat	ttctaaatac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	5580
aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtgcgcct	5640
tattccctt	tttgcggcat	tttgcctcc	tgttttgct	cacccagaaa	cgctggtaa	5700
agtaaaaagat	gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtggt	tacatcgaa	tggatctcaa	5760
cagcggtaag	atccttgaga	gtttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	5820
taaagttctg	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtattgac	gccgggcaag	agcaactcgg	5880
tcgcccata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagttac	tcaccagtca	cagaaaagca	5940
tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgt	gccataacca	tgagtgataa	6000
cactgccc	aacttacttc	tgacaacgt	cgaggaccg	aaggagctaa	ccgcttttt	6060
gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgct	tgatcggtgg	gaaccggagc	tgaatgaagc	6120
cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgt	gcctgttagca	atggcaacaa	cgttgcgc当地	6180
actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccgccaa	caattaatag	actggatgga	6240
ggcggataaa	gttgcaggac	cacttctgcg	ctcgccctt	ccggctggct	ggtttattgc	6300
tgataaatct	ggagccggtg	agcgtggtc	tcgcggat	attgcagcac	tggggccaga	6360

# ES 2 925 644 T3

tggttaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga	6420
acgaaataga cagatcgctg agataagggtgc ctcactgatt aagcatttggt aactgtcaga	6480
ccaaagtttac tcataatatac tttagattga tttaaaaactt catttttaat tttaaaaaggat	6540
ctaggtgaag atccttttg ataatctcat gaccaaaaatc ccttaacgtg agtttcgtt	6600
ccactgagcg tcagaccccg tagaaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct	6660
gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc	6720
ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggttaactggc ttcagcagag cgccagatacc	6780
aaatactgtc cttcttagtgt agccgttagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtacacc	6840
gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc	6900
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg	6960
aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccc aactgagata	7020
cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaaagg cggacaggt	7080
tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gccgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc	7140
ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttgtg	7200
atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgcccagc aacgcggcct ttttacggtt	7260
cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttcttcct gcgttatccc ctgattctgt	7320
ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataaccgct cgccgcagcc gaacgaccga	7380
gcccgcgag tcagtgagcg aggaagcggg agagcgccca atacgcaaac cgcctctccc	7440
cgccgcgttgg ccgattcatt aatg	7464
<210> 31	
<211> 7464	
<212> ADN	
5 <213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Sintetizado	
<400> 31	
cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc cttcccaac agttgcgcag	60
cctgaatggc gaatggaatt ccagacgatt gagcgtcaaa atgttaggtat ttccatgagc	120
gttttcctg ttgcaatggc tggcgtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat	180
agttttagtt cttctactca ggcaagtgtat gtttattacta atcaaagaag tattgcgaca	240
acggtaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcggtg gcctcaactga ttataaaaac	300
acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc cttaatcg cctcctgttt	360
agctcccgct ctgattctaa cgagggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata	420

ES 2 925 644 T3

gtacgcgc ccc tggcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480  
cgctacactt gccagcgc ccc tagcgc cccgc tccttcgct ttcttcctt ccttcgc  
cacgttcgc ccc ggcttcccc gtcaagctct aaatcgggg ctcccttag ggtccgatt 540  
tagtgctta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtg 600  
gccccatcgc ccc tgatagacgg ttttcgc ccc tttgacgtt gaggccacgt tcttaatag  
tggactcttgc ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tggctctatt ctttgattt 660  
ataaggatt ttgcccattt cggcctattt gttaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 720  
taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgtt tacaatttaa atatttgctt atacaatctt  
cctgttttgc gggctttctt gattatcaac cgggtacat atgattgaca tgctagttt 780  
acggcgc ccc ggggtggca ctccctctc gcgcgc ctc tggctactg aggccggc 840  
acccaaaggc gccccacgc cgggcttgc cggggcgc tcagtgacg agcgacgc 900  
cagagaggga gtggcaact ccatcaact ggggtcctac gctgtagatct catattctgg  
cagggtca ggttccaaact aacatttgc ttgtacttta cagtttatta aatagatgtt 960  
tatatggaga agctctcatt tcttcctcag aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca  
ccatattcat tttgcaggta aaattcctga gatgtaaagg gctgctgtga cttgctcaag  
gccttataatc gatgaaacgg tagcgc tggg gtttagacgc aggtgttctg atttataatg 1020  
caaaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagattt ccaacttaat  
gccaacatac cataaacctc ccattctc t aatgcccagc ctaagttggg gagaccactc  
cagattccaa gatgtacagt ttgcttgc gggctttt cccatgcctg ctttactct 1080  
gccagagta tattgtggg gtttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataagcagta  
ttattaagta gcccgcatt tcaggttcc ttgagtggca gggcaggct ggccgtgaac  
gttcaactgaa atcatggcct tggcgc aag attgatagct tggcctgtc cctgagtc 1140  
agtccatcac gaggcactgg tttctaagat gtttccctt ctttccatgatgaaatg  
acttgcgc cccacagac cccgccttgc tccatcaactg gcatctggac tccagcctgg  
gttggggca aagggaaat gagatcatgt ctttccatgatgaaatg  
tccagaaccc tgaccctgc gtttccatgatgaaatg  
tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaaatgt  
tgtatatac agacaaaact gtgttagaca tgaggcttatg  
ctgtggcctg gagcaactag tggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgccgc  
cgaaagttgc cttttatggc tggcggaga atggcggatg aacgccc  
gacgcgc ccc gggtggcaca gctagttccg tggcagccgg gatttgggtc  
tttggccgg aagccacca tggcgc ccc agtgcacagcc ttactttac ctctggc  
tttggccgg 2160  
2220  
2280  
2340

## ES 2 925 644 T3

attattgcac	gcggctcgtc	ctgacataca	gatgactcag	actacac	tctt	ccctatctgc	2400								
ttcttttaggc	gaccgagtaa	caatatcttgc	ccggggccagc	caggacatct	caaaaactt		2460								
aaactggtat	cagcagaagc	cgga	cgacggAAC	agttaagttg	ctcatttacc	acacgtcgag	2520								
attacactca	ggcg	tttccta	gccgat	tttgc	gggttccgg	tccggta	2580								
gacaatcagt	aac	tttgagc	aggaggacat	cgccac	cttgc	aggcaacac	2640								
gctcccgta	acattcgg	ttgt	ggggactaa	gctgg	gaggatt	accggaggcg	2700								
tggcgccgc	agcgggggt	gcggctcgga	ggta	aggta	caggagacg	gaccgggtt	2760								
ggtcgcac	cttgc	actgtc	gtgc	actgt	tctgg	gagtca	2820								
ctacgggta	tcatggata	ac	gacagccg	cc	tagaaagg	gc	tttagagtggc	2880							
ctggggagt	gaaaccacat	actacaactc	agctctca	agccgc	cctca	ccatcattaa	2940								
ggacaacagt	aagt	tcgc	cagg	tttctt	aaa	gatgaa	actct	ctccagactg	3000						
tatttactac	tg	cgca	aggc	actactacta	cg	gggg	agt	tacgcaatgg	3060						
tcagggcact	tctgt	gacc	tg	atcc	ac	gac	cc	ccccacgtc	3120						
agctccaac	at	agca	agtc	agcc	ctt	tatc	tct	gaggcttg	3180						
ggccggcgcc	gtt	cacac	gc	gaggact	aga	ctt	gac	tctggcacc	3240						
actagccgg	actt	tg	cg	ggag	tgtt	gtt	gag	ataac	cg	ct	act	gcaaa	3300		
gagccgcaaa	aa	agc	ggcg	gg	cg	gg	cgaa	aggccc	g	cg	ag	cg	3360		
gcaggaagaa	gat	gc	gag	ca	g	tgc	ccgc	g	cc	g	ac	gt	cg	3420	
gagagtgaag	tt	ct	ct	cg	ct	cc	cg	gg	ac	cc	cg	tt	ac	3480	
ataacaac	gag	tt	aa	ac	ct	gg	gg	gg	at	ac	tg	tt	ag	3540	
tagggaccc	gag	at	gg	gg	ag	g	ca	ag	c	ct	cg	tt	ac	3600	
cgaactcc	agg	aca	aga	tg	g	tc	gg	g	at	gg	tat	g	ag	3660	
acgtcg	cg	ga	ac	ac	gg	ct	tata	cc	ag	gg	gg	cc	ac	3720	
atacgac	cg	ct	gc	ac	at	cc	tacc	ac	tc	gt	ac	cg	cc	3780	
gcagacat	ga	ta	agata	ca	t	gat	gg	ac	aa	acca	ca	act	ga	3840	
aaatgctt	ta	ttt	gt	gaa	at	tt	gt	gat	gt	ttt	at	tt	gt	aa	3900
aataaaca	aa	tta	aca	aca	aa	ca	attc	ga	at	ttaa	atc	gg	aa	at	3960
gcatgt	gca	ac	gc	c	tt	ca	ac	ac	tt	c	tt	cc	ac	ca	4020
ggta	agg	gca	gtt	tt	gg	tc	tt	gg	tt	cc	tt	gg	tt	tc	4080
tgccc	agg	ag	gc	t	c	t	ct	gg	ta	cc	tt	gg	tt	tc	4140
catt	g	cc	ac	cc	aa	aa	aa	cc	cc	tt	tt	tt	tt	tc	4200

# ES 2 925 644 T3

gaatgacacg ggaaaaaaagc agatgaagag aaggtggcag gagagggcac gtggcccagc	4260
ctcagtctct ccaactgagt tcctgcctgc ctgccttgc tcagactgtt tgcccctac	4320
tgctcttcta ggcctcattc taagcccctt ctccaagttg cctctcccta tttctccctg	4380
tctgccaaaa aatcttccc agctcaactaa gtcagtctca cgcaagtca cattaaccca	4440
ccaatcactg attgtgccgg cacatgaatg caccaggtgt tgaagtgag gaattaaaaaa	4500
gtcagatgag ggggtgtgcc agaggaagca ccattctagt tgggggagcc catctgtcag	4560
ctggaaaaag tccaaataac ttcaagatgg aatgtgttt aactcagggt tgagaaaaaca	4620
gccacccctca ggacaaaagt cagggaaaggg ctctctgaag aaatgtact tgaagataacc	4680
agccctacca agggcaggga gaggaccaat tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg	4740
ctcgctcgct cactgaggcc gcccggcaa agcccgccg tcggggcacc tttggtcgcc	4800
cggcctcagt gagcgagcga gcgccagag agggagtggc caacggcgcg cctgcaggc	4860
tcaaaaatag ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta gaacgggtga atatcatatt	4920
gatggtgatt tgactgtctc cggccttctc caccctgtt aatctttacc tacacattac	4980
tcagggattt cattttaaat atatgagggt tctaaaaatt ttatccttg cgttgaaata	5040
aaggcttctc ccgcaaaaagt attacagggt cataatgttt ttggtaacaac cgatttagct	5100
ttatgctctg aggctttattt gcttaatttt gctaattctt tgccctgcct gtatgattta	5160
ttggatgttg gaattcctga tgccgttattt tctccttacg catctgtgcg gtatccaca	5220
ccgcataatgg tgcaactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagcccg	5280
acacccgcac acacccgctg acgcgcctg acgggcttgc ctgcctccgg catccgcctt	5340
cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggtttcac cgatcatcacc	5400
gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtat acgcctattt ttataggtta atgtcatgat	5460
aataatggtt tcttagacgt caggtggcac tttcggggaa aatgtgcgcg gaacccctat	5520
ttgttttattt ttctaaatac attcaaataat gtatccgctc atgagacaaat aaccctgata	5580
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacattcc gtgtgcgcct	5640
tattcccttt ttgcggcat tttgcctcc tgttttgtct cacccagaaa cgctggtgaa	5700
agtaaaaat gctgaagatc agttgggtgc acgagtggt tacatcgaac tggatctcaa	5760
cagcgtaag atccttgaga gtttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt	5820
taaagttctg ctagtggcg cggtatttac ccgtatttgc gcccggcaag agcaactcgg	5880
tcggccgcata cactattctc agaatgactt ggtttagtac tcaccagtca cagaaaagca	5940
tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtgataa	6000
cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccc aaggagctaa ccgcctttt	6060
gcacaacatg gggatcatg taactcgct tgatcggttgg gaaccggagc tgaatgaagc	6120

# ES 2 925 644 T3

	cataccaaac gacgagcgtg acaccacgt gcctgttagca atggcaacaa cgttgcgcaa	6180
	actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccgccaa caattaatag actggatgga	6240
	ggcggataaa gttgcaggac cacttctgctg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc	6300
	tgataaaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatac attgcagcac tggggccaga	6360
	tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga	6420
	acgaaataga cagatcgctg agataagggtgc ctcactgatt aagcatttgt aactgtcaga	6480
	ccaagtttac tcataatatac ttttagattga tttaaaaactt catttttaat tttaaaaaggat	6540
	ctaggtgaag atccttttttataatctcat gacccaaatc ccttaacgtg agtttcgtt	6600
	ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct	6660
	gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc	6720
	ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggttaactggc ttcaaggag cgcagataacc	6780
	aaatactgtc cttcttagtgt agccgttagtt aggccaccac ttcaagaact ctgttagcacc	6840
	gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagt	6900
	gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg	6960
	aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccc aactgagata	7020
	cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gttcccgaa gggagaaagg cggacaggt	7080
	tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga ggcacgagg gagcttccag gggaaaacgc	7140
	ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttgtg	7200
	atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgcccagc aacgcggcct tttaacggtt	7260
	cctggcctt tgctggcctt ttgctcacat gttttccct gcgttatccc ctgattctgt	7320
	ggataaccgtt attaccgcct ttgagtgagc tgataaccgtt cgccgcagcc gaacgaccga	7380
	gcgcagcgtc tcagtgagcgg aggaagcgga agagcgcaca atacgcaaac cgcctctccc	7440
	cgcgcggtgg ccgattcatt aatg	7464
	<210> 32	
	<211> 164	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado	
	<400> 32	
	ggcggagtt agggcggagc caatcagcgt gcgcgttcc gaaagttgcc ttttatggct	60
	ggcggagaa tgggcggtga acgcccgtatga ttatataagg acgcgcgggg tgtggcacag	120
	ctagttccgt cgccagccggg atttgggtcg cgttcttgt ttgt	164
10	<210> 33	
	<211> 122	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado	
	<400> 33	
	taagatacat tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa aaatgctta	60
	tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag	120
5	tt	122
	<210> 34	
	<211> 135	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Sintetizado	
	<400> 34	
	gatccagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga	60
	aaaaaatgct ttatttgta aatttgcattt gctattgctt tatttgtaac cattataagc	120
	tgcaataaac aagtt	135
	<210> 35	
15	<211> 181	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado	
20	<400> 35	
	tgagtttggcaaaaccacaa ctagaatgca gtggaaaaaaa tgctttatggtaaatttgc	60
	tgatgctatttgcattttaaccattttaaagctgcaat aaacaaggta acaacaacaa	120
	ttgcattcat ttatgtttc agttcaggg ggaggtgtgg gaggtttttt aaagcaagta	180
	a	181
	<210> 36	
	<211> 7521	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintetizado	
	<400> 36	
	cagcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc cttcccaac agttgcgcag	60
	cctgaatggc gaatggaattt ccagacgattt gagcgtcaaa atgttaggtat ttccatgagc	120

# ES 2 925 644 T3

gtttttcctg ttgcaatggc tggcggttaat attgttctgg atattaccag caaggccgat	180
agttttagtt ctctactca ggcaagtatgtat gttattacta atcaaagaag tattgcgaca	240
acggtaatt tgcgtatgg acagactctt ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac	300
acttctcagg attctggcgat accgttccctg tctaaaatcc cttaatcggtt cctcctgttt	360
agctcccgct ctgattctaa cgagggaaagc acgttatacg tgctcgtcaa agcaaccata	420
gtacgcgccc ttagcgccgat cattaagcgc ggcgggtgtg tggttacgc gcagcgtgac	480
cgctacactt gccagcgcgc tagcgccgc tccttcgct ttcttcctt ccttctcgc	540
cacgttgcgc ggtttccccgtcaagctt aaatcggtttt cttcccttag ggttccgatt	600
tagtgctta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatgggtt cacgtatgg	660
gccatcgccc tgatagacgg ttttcgcgc ttgacgttg gagtccacgt tcttaatag	720
tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggcttattt ctttgattt	780
ataaggatt ttgcccattt cggccttattt gttttttttt gagctgattt aacaaaaatt	840
taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgct tacaattttaa atatttgctt atacaatctt	900
cctgttttg gggctttctt gattatcaac cgggttacat atgattgaca tgcttagttt	960
acggcgcgc gggttggcca ctccctcttgcgc tcgcttactg aggccggcg	1020
acccaaaggcgc cccgcacgc cgggcttgc ccggcggcc tcagtgagcg agcgagcgc	1080
cagagaggga gtggccaact ccatcaactt gggttcttac gcttagatctt catattctgg	1140
cagggtcagt ggctccaact aacattttttt tggacttttta cagtttattt aatagatgtt	1200
tatatggaga agctctcattt tctttcttcaag aagagcttgg cttaggaaggtt ggatgaggca	1260
ccatatttcat ttgcaggtt aaatttcttga gatgttggg gctgctgttga ctgttcaag	1320
gccttataatc gatgttggg tagcgcttggg gcttagacgc aggtgttctt atttataat	1380
caaaaaccttctt atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgtt gatgttggg gagaccactc	1440
gcacacatac cataaaacctc ccatttcttgc aatggccacgc ctaagttggg gagaccactc	1500
cagattccaa gatgttggg gttttttttt cccatgccttgc cttttacttgc	1560
gcacacatac cataaaacctc ccatttcttgc aatggccacgc ctaagttggg gagaccactc	1620
ttttaatgtt gcccctgcattt tcagggttcc ttgagttggca ggcggcgttgc ggcgttgc	1680
gttcaacttgc atcatggccctt cttggccaag attgttggt gttttttttt gttttttttt	1740
agttccatcac gagcagctgg tttcttcaatgtt gttttttttt gttttttttt gttttttttt	1800
acttgcacgc cccacacacgc cccgccttgc tccatcaactg gcatctggac tccagccgttgg	1860
gttggggcaaa agagggaaat gagatcatgtt cttttttttt gttttttttt gttttttttt	1920
tccagaaaccc tgacccttgcgttaccacgc tgagagactc taaatccatgtt gacaagtctt	1980

## ES 2 925 644 T3

tctgcctatt caccgatttt gattctcaa acaaatgtgtc acaaaggtaag gattctgatg	2040
tgtatatac agacaaaact gtgtctagaca tgagggtctat ggacttcaag agcaacagt	2100
ctgtggcctg gagcaactag tgggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgcgccgtc	2160
cgaaagttgc ctttatggc tgggcggaga atggcgggtg aacgcccgtg attatataag	2220
gacgcgcgg gtgtggcaca gctagttcg tcgcagccgg gatttgggtc gcgggttctt	2280
tttggccgg aaagccacat ggcgtccca gtgacagcct tacttttacc tctggcgat	2340
ttatgcacg cggctcgatc tgacatacag atgactcaga ctacacttcc cctatctgt	2400
tcttttagccg accgagtaac aatatcttgc cggccagcc aggacatctc aaaatactt	2460
aactggtacg acgagaagcc ggacggaaaca gttaagttgc tcatttacca cacgtcgaga	2520
ttacacttag cgcgttccat ccgattttcg gttccgggtt cccgtacggc ctacagccgt	2580
acaatcagta acctttagca ggaggacatc gccacactt tctgtcagca gggcaacacg	2640
ctcccgatata cattcgggtt gggactaag ctggagatta cccggaggccg tggcagcggt	2700
ggccggccgca gccccgggtgg cggctcgag gtcaagttac aggagagccg accgggctt	2760
gtcgacacca gccagagccct ctcaatcactc tgactgtgt ctggagtcag tctcccgac	2820
tacgggtat catggatacg acagccgcct agaaagggt tagagtggct ggggttatac	2880
tggggaaatgtt aaaccacata ctacaactca gctctcaaga gcccgcctac catcattaa	2940
gacaacagta agtcgcaggt ttctttaaag atgaactctc tccagactga cgacaccgt	3000
atttactact ggcgaaagca ctactactac ggcgggagtt acgcaatggc ctactgggt	3060
cagggactt ctgtgaccgt atccagact actacccag ccccacgtcc ccccacgcca	3120
gctccaaacga tagcaagtca gcccattatct cttcgccctg aggcttgcag gcccgcggcg	3180
ggccggccg ttcacacgcg aggactagac ttgcctgcg acatctacat ctgggaccca	3240
ctagccggaa ctttgcggagt gttgttggtaa taacgtctta ctgcaagcgt	3300
gggagaaaaga agctcttgcata catttcaag cagccattca tgcgtcccgat tcagacgact	3360
caggaggagg acggctgctc gtgccgattc ccggaggagg aggagggccg ttgcgaactc	3420
agagtgaagt tctctcgctc cgcggacgca cccgcttacc agcagggtca gaaccagcta	3480
tacaacgagt taaacctggg ggcggggag gactacgacg tggtagacaa gctgtacgg	3540
aggacccgg agatggagg caagcctcg agaaagaacc cccaggaggg cctgtacaac	3600
gaactccaga aggacaagat ggctgaggcg tactcgaga ttggatgaa gggcgagaga	3660
cgtcgccggaa agggacacga cggcttatac cagggcttt ccacccgcac caaggacaca	3720
tacgacgcgc tgcacatgca agccttacca cctcgatgag gtaccagccg cccgcgttca	3780
gacatgataa gatacattga tggatggaa caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa	3840
tgctttatgtt tgaaatttg tgatgttattt gctttatgtt taaccattat aagctgcaat	3900

## ES 2 925 644 T3

aaacaaggta acaacaacaa ttgcattcat tttatgttgc aggttcaggg ggaggtgtgg	3960
gaggtttttt aaagcaagta aactggtaact agtacggatc cgcaacaaat ctgactttgc	4020
atgtgcaaac gccttcaaca acagcattat tccagaagac accttcttcc ccagcccagg	4080
taagggcagc tttgggtgcct tcgcaggctg tttccttgc tcaggaatgg ccaggttctg	4140
cccagagctc tggtaatga tgtctaaaac tcctctgatt ggtggtctcg gccttatcca	4200
ttgccaccaa aaccctcttt ttactaagaa acagtgagcc ttgttctggc agtccagaga	4260
atgacacggg aaaaaagcag atgaagagaa ggtggcagga gagggcacgt ggcccagcct	4320
cagtctctcc aactgagttc ctgcctgcct gccttgcctc agactgtttg ccccttactg	4380
ctcttcttagg cctcattcta agcccccattt ccaagttgcc tctccttatt tctccctgtc	4440
tgccaaaaaaaaa tctttcccaag ctcactaagt cagtctcacg cagtcactca ttaacccacc	4500
aatcactgat tgtgcccggca catgaatgca ccaggtgttg aagtggagga attaaaaaagt	4560
cagatgaggg gtgtgcccag aggaagcacc attctagttg ggggagccca tctgtcagct	4620
ggggaaaagtc caaataactt cagattggaa tgtgtttaa ctcagggttg agaaaacagc	4680
caccccccagg acaaaaagtca gggaaaggct ctctgaagaa atgctacttg aagataaccag	4740
ccctaccaag ggcagggaga ggaccaattt atggagttgg ccactccctc tctgcgcgt	4800
cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaaag cccgggcgtc gggcgcaccc ttggtcgcgg	4860
gcctcagtga gcgagcgagc ggcagagag ggagtggcca acggcgcgcc tgcaggttca	4920
aaaatagcta ccctctccgg catgaattta tcagctagaa cggttgaata tcataattgat	4980
ggtagttga ctgtctccgg cctttctcac ccgtttgaat ctttacctac acattactca	5040
ggcattgcat ttaaaatata tgagggttct aaaaattttt atccttgcgt tgaaataaaag	5100
gcttctccgg caaaaagtatt acagggtcat aatgttttg gtacaaccga tttagcttta	5160
tgctctgagg ctttattgtc taatttgtc aattcttgc cttgcctgtc tgatttattg	5220
gatgttggaa ttccctgatgc ggtattttct ctttacgcac ctgtgcggta tttcacaccg	5280
catatggtgc actctcgatca caatctgcac tgatgccca tagttaagcc agccccgaca	5340
cccgcccaaca cccgctgacg cggccctgacg ggcttgcgtc ctccggcat ccgccttacag	5400
acaagctgtg accgtctccg ggagctgcac gtgtcagagg ttttcaccgt catcaccgaa	5460
acgcgcgaga cggaaaggccc tcgtgatacg cctattttta taggttaatg tcatgataat	5520
aatggtttct tagacgtcag gtggcacattt tcggggaaat gtgcgcggaa ccccttatttgc	5580
tttatttttc taaatacatt caaatatgtc tccgctcatg agacaataac cctgataaaat	5640
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagatg gaggattcaa catttccgtc tcgcccattat	5700
tccctttttt gcggcattttt gccttctgt ttttgcac ccagaaacgc tggtaaaagt	5760

aaaaagatgct	gaagatca	gtgggcacg	agtgggtac	atcgaactgg	atctcaacag	5820
cggtaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgtga	gcactttaa	5880
agttctgcta	tgtggcgcgg	tattatcccg	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggtcg	5940
ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggt	ttagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	6000
tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	cagtgcgtcc	ataaccatga	gtgataaacac	6060
tgccggcaac	ttacttctga	caacgatcg	aggaccgaag	gagctaaccg	ctttttgca	6120
caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccctga	tcgttggaa	ccggagctga	atgaagccat	6180
accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgttagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	6240
attnaactggc	gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	6300
ggataaaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttccg	gctggcttgtt	ttattgctga	6360
taaatctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	cgttacatt	gcagcactgg	ggccagatgg	6420
taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	6480
aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	6540
agtttactca	tatataacttt	agattgattt	aaaacttcat	tttaattta	aaaggatcta	6600
ggtaagatc	ctttttgata	atctcatgac	caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	6660
ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	ttttctgctg	6720
cgtatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	accgctacca	gcgggtggttt	gtttgccgga	6780
tcaagagcta	ccaaacttctt	ttccgaaggt	aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	6840
tactgtcctt	ctagtgttagc	cgtagttagg	ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	6900
tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	6960
tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	accggataag	gcmcagcgg	cgggctgaac	7020
gggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttgg	gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagataacct	7080
acagcgtgag	ctatgagaaa	gcgcacgct	tcccgaaggg	agaaaggcgg	acaggatacc	7140
ggtaagcggc	agggtcgaa	caggagagcg	cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	7200
gtatctttat	agtccctgtcg	ggtttcgcca	cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	7260
ctcgtcaggg	gggcggagcc	tatggaaaaa	cgcgcacaa	gcggcctttt	tacggttccct	7320
ggcctttgc	tggccttttgc	ctcacatgtt	cttcctgct	ttatcccctg	attctgtgga	7380
taaccgtatt	accgcctttg	agtgagctga	taccgctcgc	cgcagccaa	cgaccgagcg	7440
cagcgtca	gtgagcgagg	aagcggaaaga	gcgcacaata	cgcaaaccgc	ctctccccgc	7500
gcgttggccg	attcatataat	g				7521

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 7464

&lt;212&gt; ADN

5

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sintetizado

## ES 2 925 644 T3

&lt;400&gt; 37

cagcagctgg	cgtaatacg	aagaggcccg	caccgatcg	ccttcccaac	agttgcgcag	60
cctgaatggc	gaatgaaatt	ccagacgatt	gagcgtcaaa	atgttaggtat	ttccatgagc	120
gttttcctg	ttgcaatg	gc tggcgtaat	attgttctgg	atattaccag	caaggccgat	180
agttttagtt	cttctactca	ggcaagtgtat	gttattacta	atcaaagaag	tattgcgaca	240
acggttaatt	tgcgtgatgg	acagactctt	ttactcggtg	gcctcactga	ttataaaaac	300
acttctcagg	attctggcgt	accgttcctg	tctaaaatcc	ctttaatcg	cctcctgttt	360
agctcccgct	ctgattctaa	cgagggaaagc	acgttatacg	tgctcgtaa	agcaaccata	420
gtacgcgccc	tgttagcggcg	cattaagcgc	ggcgggtgt	gtggttacgc	gcagcgtgac	480
cgctacactt	gccagcgccc	tagcggccgc	tccttcgct	ttcttccctt	ccttctcgc	540
cacgttcgccc	ggctttcccc	gtcaagctct	aaatcggggg	ctccctttag	ggtccgatt	600
tagtgctta	cggcacctcg	acccaaaaaa	acttgattag	ggtgatggtt	cacgttagtgg	660
gccatcgccc	tgatagacgg	ttttcgccc	tttgacgtt	gagtccacgt	tcttaatag	720
tggactctt	ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	tcggtctatt	ctttgattt	780
ataagggatt	ttgcccattt	cggcctattt	gtaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	840
taacgcgaat	tttaacaaaa	tattaacgtt	tacaattaa	atatttgctt	atacaatctt	900
cctgttttg	gggctttct	gattatcaac	cgggtacat	atgattgaca	tgctagttt	960
acggcgcgccc	gggttggcca	ctccctctct	gcgcgcgtgc	tcgctactg	aggccggcg	1020
accaaaggtc	gcccgcacgc	cgggccttgc	ccgggcccgc	tcagtgagcg	agcgagcgc	1080
cagagaggga	gtggccaact	ccatcaactag	gggttcctac	gcgttagatct	catattctgg	1140
cagggtcagt	ggctccaact	aacattgtt	tgtacttta	cagtttatta	aatagatgtt	1200
tatatggaga	agctctcatt	tctttctcag	aagagcctgg	ctaggaaggt	ggatgaggca	1260
ccatattcat	tttgcaggtt	aaattcctga	gatgtaaagg	gctgctgtga	cttgctcaag	1320
gccttatatc	gagtaaacgg	tagcgtggg	gcttagacgc	aggtgttctg	atttatagtt	1380
caaaaacctct	atcaatgaga	gagcaatctc	ctggtaatgt	gatagatttc	ccaacttaat	1440
gccaacatac	cataaacctc	ccattctgct	aatgcccagc	ctaagttggg	gagaccactc	1500
cagattccaa	gatgtacagt	ttgcttgct	gggcctttt	cccatgcctg	ccttactct	1560
gccagagtta	tattgctggg	gttttgaaga	agatcctatt	aaataaaaaga	ataaggcagta	1620
ttattaagta	gccctgcatt	tcaggttcc	ttgagtgac	ggccaggcct	ggccgtgaac	1680

# ES 2 925 644 T3

gttcactgaa atcatggcct cttggccaag attgatacg tgcgtgtc cctgagtccc	1740
agtccatcac gagcagctgg tttctaagat gctatttccc gtataaagca tgagaccgtg	1800
acttgcgcagc cccacagagc cccgccttg tccatcaactg gcatctggac tccagcctgg	1860
gttggggcaa agagggaaat gagatcatgt cctaaccctg atccctttgt cccacagata	1920
tccagaaccc tgaccctgccc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg	1980
tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgtat	2040
tgtatatac acacaaaact gtgttagaca tgaggctat ggacttcaag agcaacagtg	2100
ctgtggcctg gagcaactag tgggcccgggt tagggcggag ccaatcagcg tgcgccttc	2160
cgaaagttgc ctttatggc tgggcccggaa atggcgggtg aacgcccgtg attatataag	2220
gacgcgcggg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc gcgggttctt	2280
tttggccggg aaagccacca tggcgctccc agtgacagcc ttacttttac ctctggcggt	2340
attattgcac gcggctcgtc ctgacataca gatgactcag actaccttcc ccstatctgc	2400
ttcttttaggc gaccgagtaa caatatcttgc cggggccagc caggacatct caaaatactt	2460
aaactggtat cagcagaagc cggacggaaac agttaagtttgc ctcatttacc acacgtcgag	2520
attacactca ggcgttccata gcccattttc gggttccgggt tccggtacgg actacagcct	2580
gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cggccacccat ttctgtcagc agggcaacac	2640
gctcccgtaac acattcggtt ggggaaactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagccgg	2700
tggcgccggc agcgggggttgc ggggctcgga ggtcaagtttca caggagagcg gaccgggtt	2760
ggtcgcaccc acggcagagcc tctcagtcac gtgcactgtg tctggagtca gtctccaga	2820
ctacggggta tcatggatac gacagccgcc tagaaaggc tttaggtggc tggggttat	2880
ctggggaaat gaaaccacat actacaactc agtctcaag agccgcctca ccatcattaa	2940
ggacaacagt aagtgcagg ttttcttaaa gatgaactct ctccagactg acgacaccgc	3000
tatttactac tgcgcgaagc actactacta cggccggagt taacgtatgg actactgggg	3060
tcagggcact tctgtgaccg tatccagcac tactacccca gccccacgtc ccccccacgcc	3120
agctccaacg atagcaagtc agcccttatac tcttcgcctt gaggcttgca ggcccgcggc	3180
ggccggccggc gttcacacgc gaggactaga cttgcctgc gacatctaca tctgggcacc	3240
actagccggg acttgcggag tttttttttt gacgttggta ataacgtct actgcggaa	3300
gagccgcggaa aaagcggcgg cggccggcggaa aagccgttt gcgagccgg cgagcagcgc	3360
gcagggaaat gatgcgagca gctgcccgc gcccggcggaa gaagaaggca gctgcgaact	3420
gagagtgaag ttctctcgct ccgcggacgc acccgcttac cagcagggtc agaaccagct	3480
atacaacgag ttaaacctgg ggccggggaa ggagttacgac gtgttagaca agcgttagagg	3540
tagggacccg gagatggggag gcaaggctcg gagaagaac ccccaggagg gcctgtacaa	3600

# ES 2 925 644 T3

cgaactccag aaggacaaga tggctgaggc gtactcgag attggtatga agggcgagag	3660
acgtcgccga aaggcacacg acggcttata ccaggggctt tccaccgcga ccaaggacac	3720
atacgacgcg ctgcacatgc aagccttacc acctcgatga ggtaccagcg gccgcttcga	3780
gcagacatga taagatacat ttagttagttt ggacaaacca caactagaat gcagtgaaaa	3840
aaatgcttta ttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat ttgttaaccat tataagctgc	3900
aataaacaag ttaacaacaa caattcgaat ttaatcgga tccgcaacaa atctgacttt	3960
gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcattt attccagaag acacccctt ccccgccca	4020
ggtaaggcga gcttggtgc cttegcaggc tgtttccttg cttcaggaat gcccaggttc	4080
tgcccagagc tctggtcaat gatgtctaaa actcctctga ttgggtggctt cgcccttatac	4140
cattgccacc aaaaccctct tttaactaag aaacagttag ccttggttctg gcagtcaga	4200
gaatgacacg gaaaaaaagc agatgaagag aagggtggcag gagagggcac gtggcccgac	4260
ctcagtctct ccaactgagt tcctgcctgc ctgccttgc tcagactgtt tgccccttac	4320
tgctcttcta ggcctcattt taagccctt ctccaagttt cctctccctta ttctccctg	4380
tctgccaaaa aatctttccc agtcactaa gtcagtctca cgcagtcact cattaaccca	4440
ccaatcactg attgtgccgg cacatgaatg caccagggtgt tgaagtggag gaattaaaaa	4500
gtcagatgag ggggtgccc agaggaagca ccattctagt tgggggagcc catctgtcag	4560
ctggaaaaag tccaaataac ttcagattgg aatgtttttt aactcaggggt tgagaaaaca	4620
gccacccctca ggacaaaagt cagggaaaggc ctctctgaag aaatgctact tgaagatacc	4680
agcccttacca agggcagggc gaggaccaat tggatggatggt ggccactccc tctctgcgeg	4740
ctcgctcgct cactgaggccc gccccggcaa agccccggcgtcggcacc ttgggtcgcc	4800
cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc caacggcgcg cctgcaggc	4860
tcaaaaatag ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta gaacgggttga atatcatatt	4920
gatggtgatt tgactgtctc cggccttctt caccggttt aatctttacc tacacattac	4980
tcagggattt cattttaaat atatgagggt tctaaaaattt ttatccttg cggttggaaata	5040
aaggcttctc ccgcaaaaagt attacagggt cataatgttt ttggtacaac cgatggatgt	5100
ttatgctctg aggctttattt gcttaattttt gcttaattctt tgccttgccct gtatgattta	5160
ttggatgttg gaattcctga tgcggatattt tctccttacg catctgtgcgt gtatggatca	5220
ccgcataatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgtatgcc gcatagttaa gcccggcc	5280
acacccggcca acacccgctg acgcgcctg acgggcttgcgt ctgcctccgg catccgctta	5340
cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggtttcac cgtcatcacc	5400
gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgat acgccttattt ttataggta atgtcatgat	5460

# ES 2 925 644 T3

aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggaa aatgtgcgcg gaaccctat	5520
ttgttttattt ttctaaatac attcaaataat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata	5580
aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcg gtgtgcgcct	5640
tattcccttt tttgcggcat tttgccttcg tggttttgct cacccagaaa cgctggtgaa	5700
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtggt tacatcgaa tggatctcaa	5760
cagcggtaag atccttgaga gtttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcactt	5820
taaagtctg ctatgtggcg cggttattatc cctgttgcg gcccggcaag agcaactcgg	5880
tcgcccata cactattctc agaatgactt ggtttagtac tcaccagtca cagaaaagca	5940
tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgtc ggcataacca tgagtgataa	6000
cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgtttttt	6060
gcacaacatg gggatcatg taactcgct tgatcggttgg gaaccggagc tgaatgaagc	6120
cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgttagca atggcaacaa cggtgcgaa	6180
actattaact ggcgaactac ttactctage ttcccgccaa caattaatag actggatgga	6240
ggcggataaa gttgcaggac cacttctgct ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc	6300
tgataaaatct ggagccggtg agcgtggtc tcgcggatc attgcagcac tggggccaga	6360
tggttaagccc tcccgatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga	6420
acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcaactgatt aagcattggt aactgtcaga	6480
ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat	6540
ctaggtgaag atccttttttataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agtttcttt	6600
ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct	6660
gcgcgtaatc tgctgcttcg aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc	6720
ggatcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggttaactggc ttcaagcagag cgccagataacc	6780
aaatactgtc ttcttagtgcg agccgttagtt aggccaccac ttcaagaact ctgttagcacc	6840
gcctacatac ctgcgtctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtgc ggcataagtc	6900
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcggctg	6960
aacgggggt tcgtgcacac agccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata	7020
cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttccgaa gggagaaagg cggacaggta	7080
tcccgtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag gggaaacgc	7140
ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacactctga cttgagcgtc gatTTTGTG	7200
atgctcgatca gggggcgga gcctatggaa aaacgcccgc aacgccccct ttttacggtt	7260
cctggcttt tgctggctt ttgctcacat gttctttctt gctttatccc ctgattctgt	7320
ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataaccgt cgccgcagcc gaacgaccga	7380
 gcgacgagcag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac cgccctctccc	7440
cgcgcggtgg ccgattcatt aatg	7464

<210> 38

<211> 7523

<212> ADN

# ES 2 925 644 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 38

cagcagctgg	cgtaatagcg	aagaggcccg	caccgatcgc	ccttcccaac	agttgcgcag	60
cctgaatggc	aatggaaatt	ccagacgatt	gagcgtcaaa	atgttaggtat	ttccatgagc	120
gttttcctg	ttgcaatggc	tggcgtaat	attgttctgg	atattaccag	caaggccgat	180
agttttagtt	tttctactca	ggcaagtgtat	gttattacta	atcaaagaag	tattgcgaca	240
acggttaatt	tgcgtgatgg	acagacttctt	ttactcggtg	gcctcaactga	ttataaaaac	300
acttctcagg	attctggcgt	accgttcctg	tctaaaatcc	ctttaatcgg	cctcctgttt	360
agctcccgct	ctgattctaa	cgagggaaagc	acgttatacgt	tgctcgtcaa	agcaaccata	420
gtacgcgccc	tgtagcggcg	cattaagcgc	ggcgggtgtg	gtggttacgc	gcagcgtgac	480
cgctacactt	gccagcgc	cc tagcgcgc	tcctttcgct	ttcttccctt	ccttctcgc	540
cacgttcgcc	ggctttcccc	gtcaagctct	aaatcgaaaa	ctccctttag	ggttccgatt	600
tagtgcttta	cggcacctcg	acccaaaaaa	acttgattag	ggtgatggtt	cacgtagtgg	660
gccatcgccc	tgatagacgg	ttttcgccc	tttgacgttg	gagtccacgt	tcttaatag	720
tggactcttgc	ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	tcggtctatt	ctttgattt	780
ataagggatt	ttgcccattt	cggcctattt	gtaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaattt	840
taacgcgaat	tttaacaaaa	tattaacgtt	tacaattaa	atatttgcctt	atacaatctt	900
cctgttttg	gggctttctt	gattatcaac	cgggttacat	atgattgaca	tgctagtttt	960
acggcgcgc	gggttggcca	ctccctctct	gcgcgctcgc	tcgctactg	aggccggcg	1020
acccaaagggtc	gcccgcgc	cgggtttgc	ccgggccc	tcagtgagcg	agcgagcgc	1080
cagagaggga	gtggccaact	ccatcaact	gggttctac	gcgttagatct	catattctgg	1140
cagggtcagt	ggctccaact	aacatttgc	tgtacttta	cagtttatttta	aatagatgtt	1200
tatatggaga	agctctcatt	tctttctcag	aagagcctgg	ctaggaaggt	ggatgaggca	1260
ccatattcat	tttgcaggtt	aaattcctga	gatgtaaagg	gctgctgtga	cttgctcaag	1320
gccttatatc	gagtaaacgg	tagcgctggg	gcttagacgc	aggtgttctg	atttatagtt	1380
caaaacctct	atcaatgaga	gagcaatctc	ctggtaatgt	gatagatttcc	ccaacttaat	1440

gccaacatac cataaacctc ccattctgt aatgcccagc ctaagttggg gagaccactc	1500
cagattccaa gatgtacagt ttgtttgt gggcctttt cccatgcctg cctttactct	1560
gccagagttt tattgctggg gtttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataagcagta	1620
ttattaagta gcccgcatt tcaggttcc ttgagtggca ggccaggcct ggccgtgaac	1680
gttcaactgaa atcatggcct cttggccaag attgatagct tgcgtgtc cctgagtccc	1740
agtccatcac gagcagctgg tttctaagat gctatttccc gtataaagca tgagaccgtg	1800
acttgcac cccacagagc cccgccttg tccatcaactg gcatctggac tccagcctgg	1860
gttggggcaa agagggaaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata	1920
tccagaaccc tgaccctgccc gtgtaccaggc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg	1980
tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgtat	2040
tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg	2100
ctgtggcctg gagcaactag tggcggagg tagggcggag ccaatcagcg tgcggccgttc	2160
cgaaagttgc cttttatggc tggcggaga atggcgggtg aacgcccgtg attatataag	2220
gacgcgcgg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc gcgggttcttg	2280
tttgcgttccgg aaagccacca tggcgctccc agtgcacagcc ttactttac ctctggcggt	2340
attattgcac gcggtcgctc ctgacataca gatgcactcg actacctctt ccctatctgc	2400
ttcttttaggc gaccgagtaa caatatcttgc cggggccagc caggacatct caaaatactt	2460
aaactggtat cagcagaagc cggacggaaac agttaagttg ctcatttacc acacgtcgag	2520
attacactca ggcgttccata gccgattttc ggggtccgggt tccggtaacgg actacagcct	2580
gacaatcagt aaccttggcgc aggaggacat cgccacctac ttctgtcagc agggcaacac	2640
gctcccgtaac acattcgggtg ggggaactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagcgg	2700
tggcggcggc agcgggggtg cgggctcgga ggtcaagttt caggagagcg gaccgggtt	2760
ggtcgcaccc acggcagagcc tctcgtcactc gtgcactgtg tctggagtca gtctccaga	2820
ctacgggtat tcatggatac gacagccgc tagaaaggc ttagagtggc tgggggttat	2880
ctggggaaat gaaaccacat actacaactc agctctcaag agccgcctca ccatcattaa	2940
ggacaacagt aagtgcgagg ttttcttaaa gatgaactct ctccagactg acgacaccgc	3000
tatttactac tgcgcgaagc actactacta cggcggaggat tacgcaatgg actactgggg	3060
tcagggcaact tctgtgaccg tatccagcac tactacccca gccccacgtc ccccccacgcc	3120
agctccaaacg atagcaagtc agcccttatac tcttcgcctt gaggcttgca ggcccgccgc	3180
ggcggcggc gttcacacgc gaggactaga cttcgcctgc gacatctaca tctgggcacc	3240
actagccggg acttgcggag tttttttttt gagcttgta ataacgctct actgcaaagc	3300
gagccgcaaa aaagcggcgg cggcggcga aagcccggtt gcgagcccg cgagcagcgc	3360

gcaggaagaa gatgcgagca gctgccgcgc gccgagcgaa gaagaaggca gctgcgaact	3420
gagagtgaag ttctctcgct ccgcggacgc acccgcttac cagcagggtc agaaccagct	3480
ataacaacgag ttaaacctgg ggcgccggga ggagtacgac gtgttagaca agcgtagagg	3540
tagggacccg gagatgggag gcaagcctcg gagaagaac ccccaggagg gcctgtacaa	3600
cgaactccag aaggacaaga tggctgaggc gtactcggag attggtatga agggcgagag	3660
acgtcgccga aagggacacg acggcttata ccaggggctt tccaccgcga ccaaggacac	3720
atacgacgcg ctgcacatgc aagccttacc acctcgatga ggtaccagcg gccgcgatcc	3780
agacatgata agatacattg atgagttgg acaaaccaca actagaatgc agtaaaaaaaa	3840
atgctttatt tgtgaattt gtgatgtat tgctttattt gtaaccatta taagctgaa	3900
taaacaagtt aacaacaaca attgcattca tttatgttt caggttcagg gggaggtgt	3960
ggaggttttt taaagcaagt aaactggta tagtacggat ccgcaacaaa tctgactttg	4020
catgtgcaaa cgccttcaac aacagcatta ttccagaaga caccttcttc cccagcccag	4080
gtaagggcag ctttggtgcc ttgcaggct gttccttgc ttcaaggaatg gccaggttct	4140
gccagagct ctggtaatg atgtctaaaa ctcctctgat tgggtgtctc ggccttatcc	4200
attgccacca aaacccttctt ttactaaga aacagtgagc cttgttctgg cagtccagag	4260
aatgacacgg gaaaaaaagca gatgaagaga aggtggcagg agagggcacf tggccagcc	4320
tcagtcctc caactgagtt cctgcctgcc tgccttgct cagactgttt gccccttact	4380
gctttcttag gcctcattt aagcccttc tccaaagggtgc ctctccttat ttctccctgt	4440
ctgcaaaaaa atctttccca gtcactaag tcagtcctcac gcagtcactc attaaccac	4500
caatcactga ttgtgccggc acatgaatgc accaggtgtt gaagtggagg aattaaaaag	4560
tcagatgagg ggtgtgccc gaggaagcac cattctagtt gggggagccc atctgtcagc	4620
tggaaaaagt ccaaataact tcagattgga atgtgttttta actcagggtt gagaaaacag	4680
ccaccttcag gacaaaaagtc agggaaaggc tctctgaaga aatgctactt gaagatacca	4740
gccctaccaa gggcaggag aggaccaatt gatggagttt gccactccct ctctgcgcgc	4800
tcgctcgctc actgaggccc cccgggcaaa gcccgggcgt cgggcgaccc ttggtcgccc	4860
ggcctcagtgc agcgagcgcg cgcgcagaga gggagtgcc aacggcgcgc ctgcaggct	4920
caaaaaatagc taccctctcc ggcataattt tatcagctag aacggttgaa tatcatattt	4980
atggtgattt gactgtctcc ggccttctc acccgtttga atcttaccc acacattact	5040
caggcattgc attaaaaata tatgagggtt ctaaaaaattt ttatccttgc gttgaaataa	5100
aggcttctcc cgcaaaaagta ttacagggtc ataatgtttt tggtacaacc gatttagctt	5160
tatgctctga ggctttattt cttatattt ctaattctt gccttgcctg tatgatttat	5220

tggatgttgg aattcctgat gcggtatTTT ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac	5280
cgcatatggT gcactctcaG tacaatctgc tctgtatgcg catatgttaaG ccagccccga	5340
cacccgccaa cacccgctga cgcgcctga cgggcttgc tgcTcccggc atccgcttac	5400
agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggTTTcacc gtcatcacCG	5460
aaacgcgega gacgaaaggG cctcgatGata cgcctatTTT tataggttaa tgtcatgata	5520
ataatggTTT cttagacgtc aggtggact tttcgggaa atgtgcgcgg aacccttatt	5580
tgtttatTTT tctaaataca ttcaaatatG tatccgctca tgagacaata accctgataa	5640
atgttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgcctt	5700
atcccTTTT ttgcggcatt ttgccttctt gttttgctc acccagaaac gctggtaaa	5760
gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggt acatcgaact ggatctcaac	5820
agcggtaaGA tccttgagAG tttcggcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcacttt	5880
aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacG ccgggcaaga gcaactcggt	5940
cgcgcatac actattctca gaatgacttG gttgagtact caccagtcaC agaaaagcat	6000
cttacggatG gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtcG ccataaccat gagtgataac	6060
actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaAC cgctttttG	6120
cacaacatgg gggatcatgt aactcgctt gatcgTTggg aaccggagct gaatgaagcc	6180
ataccaaACG acgagcgtga caccacgatG cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcAAA	6240
ctattaactg gcaactact tactctagct tcccgcaac aattaataga ctggatggag	6300
gcggataaaAG ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgt	6360
gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcgttatca ttgcagcaCT ggggcccAGat	6420
ggtaagccct cccgtatgt agttatctac acgacggggA gtcaggcaac tatggatgaa	6480
cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac	6540
caagtttact catatatact tttagattgat taaaacttc attttaatt taaaaggatc	6600
taggtgaaga tccttttga taatctcatG accaaaatcc cttaacgtga gtttgcTTc	6660
cactgagcgt cagaccccgT agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctG	6720
cgcgtaatct gctgcttgcA aacaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgg ttgtttgcgg	6780
gatcaagAGt tccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagAGC gcagatacca	6840
aatactgtcc ttcttagtga gccgtatGta ggccaccact tcaagaactc tgcacccg	6900
cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgcccagtgg cgataagtG	6960
tgtcttacgg ggttggactc aagacgatAG ttaccggata aggccgcAGC gtcgggctga	7020
acggggggTT cgtgcacaca gcccagcttG gagcgaacga cctacaccGA actgagatac	7080
ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacG cttcccgaaAG ggagaaaggc ggacaggat	7140

# ES 2 925 644 T3

ccggttaagcg	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	7200
tggtatctt	atagtccctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	7260
tgctcgtcag	gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	7320
ctggcctttt	gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	7380
gataaccgta	ttaccgcctt	tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	7440
cgcagcgagt	cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	7500
gcgcggttggc	cgattcatta	atg				7523
<210> 39						
<211> 172						
<212> PRT						
5	<213> Secuencia Artificial					
<220>						
<223> Sintetizado						
<400> 39						
Met Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Ala Ala Pro Val Ser Ser						
1	5	10	15			
Thr Ser Ser Leu Pro Leu Ala Ala Leu Asn Met Arg Val Arg Arg Arg						
20	25	30				
Leu Ser Leu Phe Leu Asn Val Arg Thr Gln Val Ala Ala Asp Trp Thr						
35	40	45				
Ala Leu Ala Glu Glu Met Asp Phe Glu Tyr Leu Glu Ile Arg Gln Leu						
50	55	60				
Glu Thr Gln Ala Asp Pro Thr Gly Arg Leu Leu Asp Ala Trp Gln Gly						
65	70	75	80			
Arg Pro Gly Ala Ser Val Gly Arg Leu Leu Asp Leu Leu Thr Lys Leu						
85	90	95				
Gly Arg Asp Asp Val Leu Leu Glu Leu Gly Pro Ser Ile Glu Glu Asp						
100	105	110				
Cys Gln Lys Tyr Ile Leu Lys Gln Gln Gln Glu Ala Glu Lys Pro						
115	120	125				
Leu Gln Val Ala Ala Val Asp Ser Ser Val Pro Arg Thr Ala Glu Leu						
130	135	140				
Ala Gly Ile Thr Thr Leu Asp Asp Pro Leu Gly His Met Pro Glu Arg						

# ES 2 925 644 T3

	145	150	155	160
	Phe	Asp	Ala	Phe
	Ile	Cys	Tyr	Cys
	Pro	Ser	Asp	Ile
	165	170		
	<210> 40			
	<211> 8044			
	<212> ADN			
5	<213> Secuencia Artificial			
	<220>			
	<223> Sintetizado			
	<400> 40			
	cagcagctgg cgtaatacg aagaggcccg caccgatcg cttcccaac agttgcgcag 60			
	cctgaatggc gaatgaaatt ccagacgatt gagcgtaaa atgttaggtat ttccatgagc 120			
	gttttcctg ttgcaatggc tggcgtaat attgttctgg atattaccag caaggccgat 180			
	agttttagtt cttctactca ggcaagtgtat gtttattacta atcaaagaag tattgcgaca 240			
	acgttaatt tgcgtgatgg acagactctt ttactcggtg gcctcactga ttataaaaac 300			
	acttctcagg attctggcgt accgttcctg tctaaaatcc cttaatcg cctccgttt 360			
	agctcccgct ctgattctaa cgagggaaagc acgttatacg tgctcgtaa agcaaccata 420			
	gtacgcgccc ttagcgccg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac 480			
	cgctacactt gccagcgccc tagcgccgc tccttcgct ttctccctt ctttcgc 540			
	cacgttcgccc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt 600			
	tagtgctta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtatgg 660			
	gccatcgccc tgatagacgg ttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tcttaatag 720			
	tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggctatt ctttgattt 780			
	ataaggatt ttgccgattt cggcctattt gtaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 840			
	taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgtt tacaattaa atatttgctt atacaatctt 900			
	cctgttttg gggctttctt gattatcaac cggggatcat atgattgaca tgctatgg 960			
	acggcgcgc gggttggcca ctccctctt ggcgcgtcgc tcgtcactg aggccggcg 1020			
	acccaaaggcgc gcccgcgc cgggcttgc cggggcgcc tcagtgagcg agcgagcg 1080			
	cagagaggga gtggccact ccatcaact gggccctac gcgttagatct catattctgg 1140			
	cagggtcagt ggctccact aacattgtt tggacttta cagtttatta aatagatgtt 1200			
	tatatggaga agctctcatt tcttcgtcgg aagagcctgg ctaggaaggt ggatgaggca 1260			
	ccatattcat ttgcaggtt aaattcctga gatgtaaagg gctgctgtga cttgctcaag 1320			
	gccttatatc gagtaaacgg tagcgctggg gcttagacgc aggtgttctg atttataat 1380			
	caaaaacctct atcaatgaga gagcaatctc ctggtaatgt gatagatttc ccaacttaat 1440			

# ES 2 925 644 T3

gccaacatac cataaacctc ccattctgct aatgccagc ctaagttggg gagaccactc	1500
cagattccaa gatgtacagt ttgcttgct gggctttt cccatgcctg cctttactct	1560
gccagagtta tattgctggg gtttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataagcagta	1620
ttattaagta gccctgcatt tcaggttcc ttgagtggca ggccaggcct ggccgtgaac	1680
gttcaactgaa atcatggcct cttggccaag attgatact tgcctgtc cctgagtccc	1740
agtccatcac gagcagctgg tttctaagat gctattccc gtataaagca tgagaccgtg	1800
acttgccagc cccacagagc cccgccttg tccatcactg gcatctggac tccagcctgg	1860
gttggggcaa agagggaaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgc cccacagata	1920
tccagaaccc tgaccctgcc gtgtaccagc tgagagactc taaatccagt gacaagtctg	1980
tctgcctatt caccgatttt gattctcaaa caaatgtgtc acaaagtaag gattctgatg	2040
tgtatatcac agacaaaact gtgctagaca tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg	2100
ctgtggcctg gagcaactag tgggcggagt tagggcggag ccaatcagcg tgcgcgttc	2160
cgaaagttgc cttttatggc tgggcggaga atggcgggtg aacgcccgtg attatataag	2220
gacgcgcggg gtgtggcaca gctagttccg tcgcagccgg gatttgggtc gcggttcttg	2280
tttgcctgg aaagccacca tggcgctccc agtgcacagcc ttactttac ctctggcggtt	2340
attattgcac gcggctcgtc ctgacataca gatgactcag actaccttt ccctatctgc	2400
ttcttttaggc gaccgagtaa caatatctt ccggccagc caggacatct caaaatactt	2460
aaactggtat cagcagaagc cggacggaac agttaagtt ctcatttacc acacgtcgag	2520
attacactca ggcttccta gcccatttc gggccgggt tccggtacgg actacagct	2580
gacaatcagt aaccttgagc aggaggacat cgccacctac ttctgtcagc agggcaacac	2640
gctcccgtagt acattcggtg gggactaa gctggagatt accggaggcg gtggcagcgg	2700
tggcgccggc agcgggggtg gcccgtcgga ggtcaagtta caggagagcg gaccggctt	2760
ggtcgcacct agccagagcc tctcagtcac gtgcactgtg tctggagtca gtctccaga	2820
ctacgggtta tcatggatac gacagccgcc tagaaaggcc tttagtggc tggggttat	2880
ctggggtagt gaaaccacat actacaactc agctctcaag agccgcctca ccatcattaa	2940
ggacaacagt aagtgcagg tttcttaaa gatgaactct ctccagactg acgacaccgc	3000
tatttactac tgcgcgaagc actactacta cggcgggagt tacgcaatgg actactgggg	3060
tcagggcact tctgtgaccg tatccagcac tactacccca gccccacgtc ccccccacgcc	3120
agctccaacg atagcaagtc agcccttatac tcttcgcctt gaggcttgcg gccccgcggc	3180
ggcgccgcgc gttcacacgc gaggactaga cttcgctgc gacatctaca tctggcacc	3240
actagccggg acttgcggag tttgtgttt gagcttggta ataacgctct actgcacggc	3300

# ES 2 925 644 T3

tgcaggaggt cccggcgccg ggtctgggc cccggctctcc tccacatcct cccttccct	3360
ggctgctctc aacatgcgag tgcggcgccg cctgtctctg ttcttgaacg tgcggacaca	3420
ggtggcgccgactggaccg cgctggcgga ggagatggac tttgagttact tggagatccg	3480
gcaactggag acacaagcgg accccactgg caggctgctg gacgcctggc agggacgccc	3540
tggcgcctct gtagggccgac tgctcgatct gcttaccaag ctggggccgac acgacgtgt	3600
gctggagctg ggacccagca ttgaggagga ttgcacaaag tataatcttga agcagcagca	3660
ggagggaggct gagaaggcctt tacagggtggc cgctgttagac agcagtgccc cacggacage	3720
agagctggcg ggcacatcacca cacttgcata cccctgggg catatgcctg agcggttcga	3780
tgccttcata tgctattgccc ccagcgacat cgctcgagaaa gcgagccgca aaaaagccgc	3840
ggcggcgccg aaaagcccgat ttgcgagccc ggcgagcagc ggcgaggaag aagatgcgag	3900
cagctgcccgc ggcggcagc aagaagaagg cagctgcgaa ctgagagtga agttctctcg	3960
ctcccgccgac gcaccccgctt accagcaggc tcagaaccag ctatacacaacg agttaaacct	4020
ggggcgccgg gaggagtacg acgtgttaga caagcgtaga ggttagggacc cggagatggg	4080
aggcaagcctt cggagaaaga acccccagga gggctgtac aacgaactcc agaaggacaa	4140
gatggctgag gcgtactcgg agattggat gaagggcgag agacgtcgccg gaaagggaca	4200
cgacggctta taccaggggc tttccacccgc gaccaaggac acatacgcac cgctgcacat	4260
gcaagcctta ccacctcgat gaggtaccag cggccgcgtat ccagacatga taagatacat	4320
tgatgagttt ggacaaacca caactagaat gcagtggaaa aaatgcttta tttgtgaaat	4380
tttgatgatctt attgctttat ttgttaaccat tataagctgc aataaaacaag ttaacaacaa	4440
caattgcatt cattttatgt ttcaagggtca gggggaggtg tgggaggttt tttaaagcaa	4500
gtaaactggt actagttacgg atccgcaaca aatctgactt tgcatgtgc aacgccttca	4560
acaacagcat tattccagaa gacacccctt tcccagccc aggttaaggc agctttggtg	4620
ccttcgcagg ctgtttcctt gtttcaggaa tggccagggtt ctgcggcagag ctctggtcaa	4680
tgatgtctaa aactcctctg attgggtgtc tcggccttat ccattgccac caaaaccctc	4740
tttttactaa gaaacagtga gccttgcgtt ggcagtcag agaatgacac gggaaaaaaag	4800
cagatgaaga gaaggtggca ggagaggcga cgtggcccg cctcagtc tccaaactgag	4860
ttcctgcctg cctgccttttgc ttcagactgt ttgcacccat tgcgtcttctt aggcccttatt	4920
ctaagccctt tctccaaatgtt gcctctccctt atttctccctt gtctgcacaa aaatcttcc	4980
cagctacta agtcagtc acgcagtcac tcattaaaccc accaatcact gattgtgcgc	5040
gcacatgaat gcaccagggtt ttgaagtggaa ggaattaaaa agtcagatga ggggtgtgcc	5100
cagaggaagc accattcttag ttggggggagc ccattgtca gctggggaaa gtccaaataa	5160
cttcagattt gaatgtgttt taactcagggtt ttgagaaaaac agccacccatc aggacaaaaag	5220

# ES 2 925 644 T3

tcagggaaagg gctctctgaa gaaatgtac ttgaagatac cagccctacc aagggcaggg	5280
agaggacaa ttgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc	5340
cgcccgggca aagcccgggc gtcgggcac ctttggtcgc ccggcctcag tgagcgagcg	5400
agcgcgcaga gagggagtgg ccaacggcgc gcctgcaggt tcaaaaatag ctacccttc	5460
cgccatgaat ttatcagcta gaacgggtga atatcatatt gatggtgatt tgactgtctc	5520
cggcctttct cacccttttgc aatctttacc tacacattac tcaggcattt cattaaaat	5580
atatgagggt tctaaaaatt tttatccttgc cgttgaaata aaggcttctc ccgcaaaagt	5640
attacagggt cataatgttt ttgggtacaac cgatttagct ttatgctctg aggctttatt	5700
gcttaatttt gctaatttctt tgccttgcct gtatgattta ttggatgttgc gaatttcttgc	5760
tgcggtattt tctccttacg catctgtgcgc gtatttcaca ccgcataatgg tgcactctca	5820
gtacaatctg ctctgtatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcaca acaccgcgtg	5880
acgcgcctg acgggcttgc ctgctccgg catccgcttgc cagacaagct gtgaccgtct	5940
ccgggagctg catgtgtcag aggtttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg	6000
gcctcgtat acgccttattt ttataggtta atgtcatgtat aataatggtt tcttagacgt	6060
caggtggcac ttttcgggaa aatgtgcgcg gaacccttat ttgtttattt ttctaaatac	6120
attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa	6180
aaaggaagag tatgagtatt caacattcc gtgtccctt tattcccttt tttgcggcat	6240
tttgccttcc tttttttgtt caccctggaaa cgctggtaa agtaaaagat gctgaagatc	6300
agttgggtgc acgagttgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaaatc atccttgcgat	6360
gttttgcggcc cgaagaacgt tttccaaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg	6420
cggtattatc ccgtatttgc gcccggcaag agcaactcg tcgcccgcata cactatttctc	6480
agaatgactt gggtgagttac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatttgc	6540
taagagaatt atgcagtgttgc gcccataacca tgagtgtataa cactgcggcc aacttacttc	6600
tgacaacgt cggaggaccg aaggagctaa ccgttttttgc cacaacatg gggatcatg	6660
taactcgcct tgatcggttgc gaaaccgggc tgaatgttgc cataccaaac gacgagcggt	6720
acaccacatg ccgtgttagca atggcaacaa cgttgcgcac actattaact ggcgaactac	6780
ttactcttagc ttcccgccaa caattaatag actggatggtaa ggcggataaa gttgcaggac	6840
cacttctgcg ctggccctt ccggctggct gggttattgc tgataaaatct ggagccgggt	6900
agcgtgggtc tcgcggatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgatcg	6960
tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaat cttatggatgttgc acgaaaataga cagatcgctg	7020
agataggtgc ctcactgttgc aagcatttgc aactgtcaga ccaagtttac tcataatatac	7080

# ES 2 925 644 T3

tttagattga	tttaaaactt	cattttaaat	ttaaaaggat	ctaggtgaag	atccttttg	7140
ataatctcat	gacccaaatc	ccttaacgtg	agtttcgtt	ccactgagcg	tcagaccccg	7200
tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	cttttttct	gcgcgtaatc	tgctgcttc	7260
aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcggtgg	tttggggcc	ggatcaagag	ctaccaactc	7320
ttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	aaatactgtc	cttctagtgt	7380
agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact	ctgttagcacc	gcctacatac	ctcgctctgc	7440
taatcctgtt	accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	gtgtcttacc	gggttggact	7500
caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	aacggggggt	tcgtgcacac	7560
agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccc	aactgagata	cctacagcgt	gagctatgag	7620
aaagcgccac	gcttccgaa	gggagaaagg	cggacaggta	tccggtaagc	ggcagggtcg	7680
gaacaggaga	gcbcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	ctggtatctt	tatagtcctg	7740
tcgggtttcg	ccacctctga	ctttagcgtc	gatttttgtg	atgctcgta	ggggggcgga	7800
gcctatggaa	aaacgcccac	aacgcggcct	tttacggtt	cctggccctt	tgctggcctt	7860
ttgctcacat	gttcttcct	gcgttatccc	ctgattctgt	ggataaccgt	attaccgcct	7920
ttgagtgagc	tgataaccgt	cgcgcagcc	gaacgaccga	gcbcagcgt	tcagtgagcg	7980
aggaagcgggaa	agagcgccca	atacgcaaacc	cgcctctccc	cgcgcgttgg	ccgattcatt	8040
aatg						8044
<210> 41						
<211> 216						
<212> PRT						
5	<213> Secuencia Artificial					
<220>						
<223> Sintetizado						
<400> 41						
Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro						
1 5 10 15						
Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp						
20 25 30						
Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe						
35 40 45						
Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala						
50 55 60						
Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr						
65 70 75 80						

# ES 2 925 644 T3

Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr  
 85 90 95

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Val Glu Gly Val Gln  
 100 105 110

Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly  
 115 120 125

Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys  
 130 135 140

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

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

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

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

Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu  
 210 215

<210> 42

<211> 7760

<212> ADN

5

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado

<400> 42

cagcagctgg	cgtaatagcg	aagaggcccg	caccgatcgc	cttcccaac	agttgcgcag	60
cctgaatggc	aatggaaatt	ccagacgatt	gagcgtcaaa	atgttaggtat	ttccatgagc	120
gttttcctg	ttgcaatggc	tggcgtaat	attgttctgg	atattaccag	caaggccgat	180
agttttagtt	cttctactca	ggcaagtgtat	gttattacta	atcaaagaag	tattgcgaca	240
acggtaatt	tgcgtgatgg	acagactctt	ttactcggtg	gcctcactga	ttataaaaac	300
acttctcagg	attctggcgt	accgttcctg	tctaaaatcc	ctttaatcgg	cctcctgttt	360
agctcccgct	ctgattctaa	cgagggaaagc	acgttatacgt	tgctcgtcaa	agcaaccata	420
gtacgcgccc	tgttagcggcg	cattaagcgc	ggcgggtgtg	gtggttacgc	gcagcgtgac	480

10

# ES 2 925 644 T3

cgctacactt	gccagcgccc	tagcgcggc	tcctttcgct	ttcttcctt	cctttctcgc	540
cacgttcgcc	ggctttcccc	gtcaagctct	aaatcgaaaa	ctccctttag	ggttccgatt	600
tagtgctta	cggcacctcg	accccaaaaa	acttgattag	ggtgatggtt	cacgtatgg	660
gccatcgccc	tgatagacgg	ttttcgccc	tttgacggtt	gagtccacgt	tcttaatag	720
tggactttg	ttccaaactg	gaacaacact	caaccctatc	tcggcttatt	cttttgcatt	780
ataaggatt	ttgcccattt	cggcctattt	gtaaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	840
taacgcgaat	tttaacaaaa	tattaacgct	tacaattttaa	atatttgctt	atacaatctt	900
cctgttttg	gggctttct	gattatcaac	cggggtacat	atgattgaca	tgcttagttt	960
acggcgcggcc	gggttggcca	ctccctctct	gcccgcgtcg	tcgttcactg	aggccggcg	1020
acccaaaggc	gcccgcgc	cggccttgc	ccggcggcc	tcagtgagcg	agcgagcgcg	1080
cagagaggg	gtggccaact	ccatcaactag	gggttcttac	gcgttagatct	catcacgagc	1140
agctggttt	taagatgcta	tttccgtat	aaagcatgag	accgtgactt	gccagcccc	1200
cagagcccc	cccttgcata	tcactggcat	ctggactcca	gcctgggttg	ggcaaagag	1260
ggaaatgaga	tcatgtcata	accctgatcc	tcttgcata	cagatatacca	gaaccctgac	1320
cctgccgtgt	accagctgag	agactctaaa	tccagtgaca	agtctgtctg	cctattcacc	1380
gattttgatt	ctcaaacaaa	tgtgtcaca	agtaaggatt	ctgtatgtta	tatcacagac	1440
aaaactgtgc	tagacatgag	gtctatggac	ttcaagagca	acagtgtgt	ggcctggagc	1500
aactagtggg	cggagttagg	gcggagccaa	tcagcgtcg	ccgttccgaa	agttgcctt	1560
tatggctggg	cggagaatgg	gcggtaacg	ccgatgatta	tataaggacg	cgccgggtgt	1620
ggcacagcta	gttccgtcgc	agccgggatt	tgggtcgccg	ttcttgcagg	ttccctcgag	1680
ccaccatggc	tgcaggaggt	ccggcggcg	ggtctgcggc	cccggtctcc	tccacatct	1740
cccttccct	ggctgctctc	aacatgctg	tgcggcgccg	cctgtctctg	ttcttgaacg	1800
tgcggacaca	ggtggcgcc	gactggaccg	cgctggcgga	ggagatggac	tttgagttact	1860
tggagatccg	gcaactggag	acacaagcgg	accccaactgg	caggctgctg	gacgcctggc	1920
aggacgcggc	tggcgctct	gtaggccgac	tgctcgatct	gcttaccaag	ctggccgcgc	1980
acgacgtct	gctggagctg	ggaccacgca	ttgaggagga	ttgccaatgg	tatatacttga	2040
agcagcagca	ggaggaggct	gagaagcctt	tacaggtggc	cgctgttagac	agcagtgtcc	2100
cacggacagc	agagctggcg	ggcatcacca	cacttgcata	ccccctgggg	catatgcctg	2160
agcgtttcga	tgccttcatac	tgctattgca	ccagcgacat	cgctcgagaaa	gcgagccgca	2220
aaaaagcgcc	ggcgccggcg	aaaagccctt	ttgcgagccc	ggcgagcagc	gcgcaggaag	2280
aagatgcgag	cagctgccgc	gcgcggagcg	aagaagaagg	cagctgcgaa	ctggtcgagg	2340
gcgtccaagt	cgaaccattt	agtccggcg	atggcagaac	atttcctaaa	aggggacaaa	2400

catgtgtcgt ccattataca ggcatgttgg aggacggcaa aaaggtggac agtagtagag	2460
atcgcaataa acctttcaaa ttcatgttgg gaaaacaaga agtcattagg ggatgggagg	2520
agggcgtggc tcaaatgtcc gtcggccaac gcgctaagct caccatcagc cccgactacg	2580
catacggcgc taccggacat cccggaatta ttccccctca cgctacctt gttttgacg	2640
tcgaactgtt gaagctcgaa gtcgagggag tgcaggtgga gactatctcc ccaggagacg	2700
ggcgcacctt ccccaagcgc ggccagacct gcgtggtgca ctacaccggg atgcttgaag	2760
atgaaaagaa agttgattcc tccccggaca gaaacaagcc cttaagttt atgctaggca	2820
agcaggaggt gatccgaggc tggaaagaag gggttgccc gatgagtgtg gtcagagag	2880
ccaaactgac tatacttcca gattatgcct atgggccac tggcaccca ggcatactcc	2940
caccacatgc cactctcgtc ttcatgttgg agcttctaaa actggaaaccg cggaaaggcc	3000
gaggggacct gctgacatgt ggcgatgtgg agaaaaaccc aggaccacca tggatggcgc	3060
tcccagtgac agccttactt ttacctctgg cgttattatt gcacgcggct cgtcctgaca	3120
tacagatgac tcagactacc tttccctat ctgtttttt aggcgaccga gtaacaatat	3180
tttgcgggc cagccaggac atctaaaat acttaaactg gtatcagcag aagccggacg	3240
gaacagttaa gttgcttattt taccacacgt cgagattaca ctcaggcgtt cctagccgt	3300
tttcgggttc cgggtccggt acggactaca gcctgacaat cagtaacctt gagcaggagg	3360
acatcgccac ctacttctgt cagcaggca acacgctccc gtacacattc gttggggaa	3420
ctaaagctgga gattaccgga ggcgggtggca gcgggtggcg cggcagcggg gttggggct	3480
cggaggtcaa gttacaggag agcggacccgg gcttggtcgc acctagccag agcctctcag	3540
tcacgtgcac tttgtctggc gtcagtcctt cagactacgg ggtatcatgg atacgacagc	3600
cgcctagaaa gggcttagag tggctgggg ttatctggg aagtgaaacc acataactaca	3660
actcagctct caagagccgc ctcaccatca ttaaggacaa cagtaagtgc caggtttct	3720
taaagatgaa ctctctccag actgacgaca ccgttattta ctactgcgcg aagcactact	3780
actacggcgg gagttacgca atggactact ggggtcaggc cacttctgtg accgtatcca	3840
gcactactac cccagccccca cgtccccca cgccagctcc aacgatagca agtcagccct	3900
tatctttcg ccctgaggct tgcaggcccg cggcggggcg cggcgttac acgcgaggac	3960
tagacttcgc ctgcgacatc tacatctggg caccactagc cgggacttgc ggagtgttgt	4020
tgttgagctt ggtataaacg ctctactgca gagtgaagtt ctctcgctcc gcggacgcac	4080
ccgcttacca gcagggtcag aaccagctat acaacgagtt aaacctgggg cgccgggagg	4140
agtacgacgt gttagacaag cgtagaggtt gggacccggaa gatgggaggc aagcctcgaa	4200
gaaagaaccc ccaggaggc ctgtacaacg aactccagaa ggacaagatg gctgaggcgt	4260

# ES 2 925 644 T3

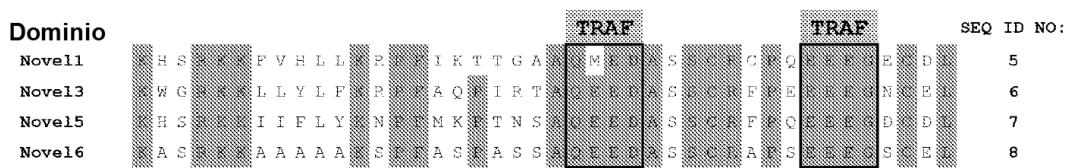
actcggagat tggtatgaag ggcgagagac gtcgcggaaa gggacacgac ggcttatacc	4320
aggggcttcc acccgcgacc aaggacacat acgacgcgct gcacatgcaa gccttaccac	4380
ctcgatgagg taccagcgcg gccgcgatcc agacatgata agatacattt atgagtttgg	4440
acaaaccaca actagaatgc agtaaaaaaaa atgcattttt tgtgaaattt gtgatgtat	4500
tgcttattt gtaaccatta taagctcaa taaaacaagtt aacaacaaca attgcattca	4560
tttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggtttt taaagcaagt aaactggtag	4620
tagtacggat ccgcaacaaa tctgactttt catgtcaaa cgccttcaac aacagcatta	4680
ttccagaaga caccttcttc cccageccag gtaagggcag ctttggtgcc ttgcgaggct	4740
gttcccttgc ttcaaggaatg gccaggttctt gcccagagct ctggtaatg atgtctaaaa	4800
ctcctctgtat tgggtgtctc ggccttatcc attgccacca aaacccttctt tttactaaga	4860
aacagtgagc cttgttctgg cagtcagag aatgacacgg gaaaaaaagca gatgaagaga	4920
agggtggcagg agagggcagc tggcccgcc tcagtccttc caactgagtt cctgcctgcc	4980
tgccttgc tcaactgtttt gccaatttga tggagttggc cactccctct ctgcgcgc	5040
gctcgctcac tgaggccgc cgggcaaaagc cggggcgtcg ggccacccctt ggtcgcccgg	5100
cctcagttagtgc ctagcgtttt gccaatttga tggagttggc cactccctct ctgcgcgc	5160
aaatagctac cttctccggc atgaattttt cagctagaac ggttgaatata catattgtat	5220
gtgatttgac tggatccggc cttcttcacc cgtttaatc tttacctaca cattactcag	5280
gcattgcatt taaaatataat gagggttcta aaaattttta tccttgcgtt gaaataaagg	5340
cttctccgc aaaagtatttta cagggtcata atgttttgg tacaaccat ttagctttat	5400
gctctgagc tttattgttttta aattttgcata attcttcacc ttgcctgtat gatttattgg	5460
atgttggat tcctgatgcgtt gtttttcacc cttacgcata tggcggtat ttcacaccgc	5520
atatggtgca ctctcgttac aatctgtctt gatgcccat agttaagcca gccccgacac	5580
ccggcaacac ccgctgacgc gcccgtacgg gtttgcgttc tccggcata cgcttacaga	5640
caagctgtga ccgtctccgg gagctgcata tggcggtat ttgcgttgc atcaccgaaa	5700
cgccgcgac gaaaggccct cgtgatacgc ctatttttt aggttaatgt catgataata	5760
atggtttctt agacgtcagg tggactttt cggggaaatg tgcgcggaaac ccctatttgc	5820
ttatttttctt aaatacatttca aatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaaatg	5880
cttcaataat attgaaaaag gaagagttatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt	5940
cccttttttgc cggcatttttgc cttccgtttt tttgcctacc cagaaacgct ggtgaaagta	6000
aaagatgtcg aagatcgtt ggggtgcacga gtgggttaca tgcgttgc tctcaacac	6060
ggtaagatcc ttgagagttt tcggccgaa gaacgttttcaatgtatgag cactttaaa	6120
gttctgtat gtggcgccgtt attatccgtt attgacgcggc ggcaagagca actcggtcg	6180

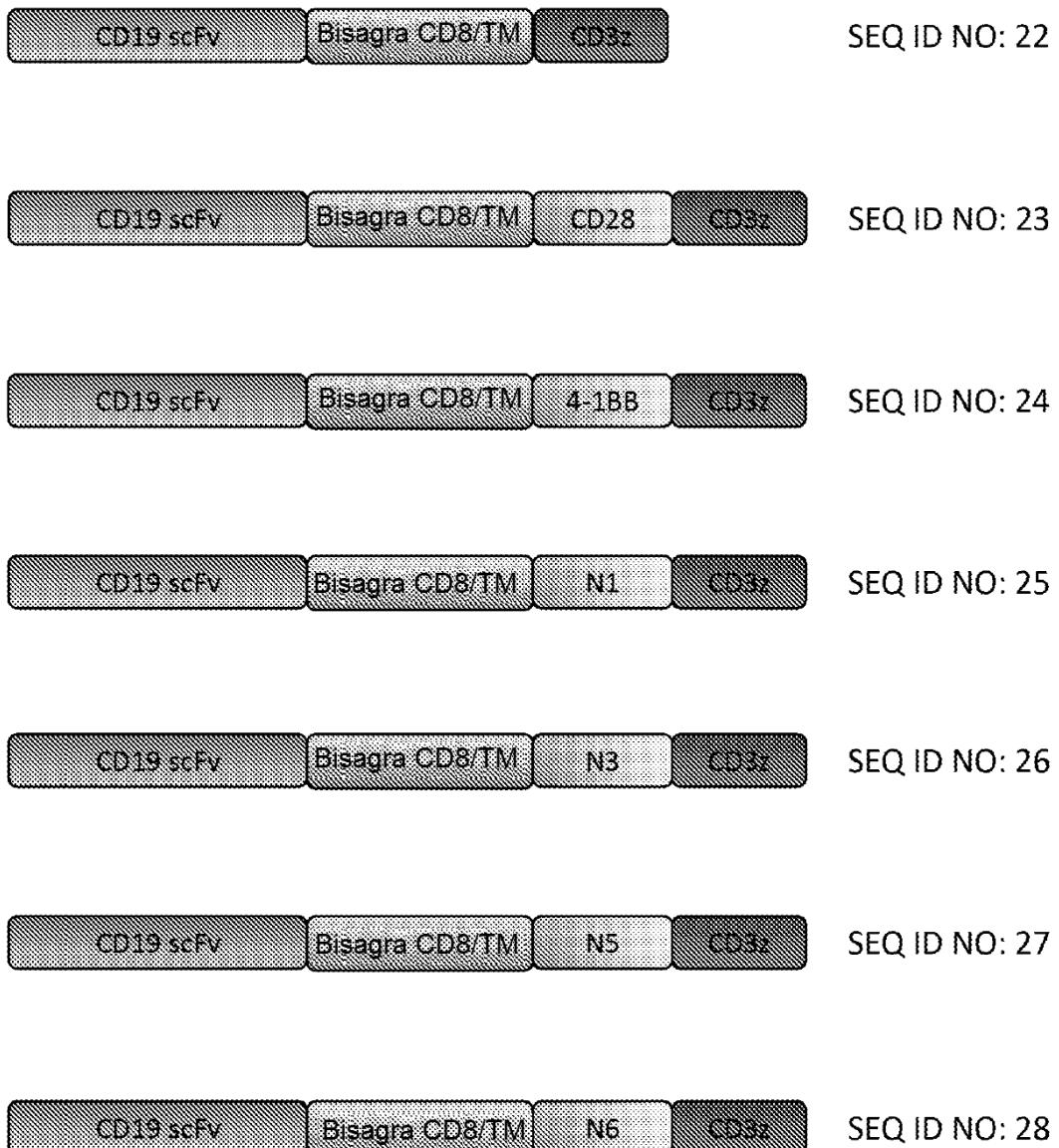
## ES 2 925 644 T3

cgccatacact atttcagaa tgacttgggt gaggactcac cagtcacaga aaagcatctt	6240
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag tgataacact	6300
gcggccaaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc tttttgcac	6360
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cgagctgaa tgaagccata	6420
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta	6480
ttaactggcg aactacttac tctagttcc cgcaacaat taatagactg gatggaggcg	6540
gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggtt tattgctgat	6600
aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatgg	6660
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga	6720
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa	6780
gttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag	6840
gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac	6900
tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatcctt tttctgcgc	6960
gtaatctgct gcttgcacaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggttt tttgccgat	7020
caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgc gataccaaat	7080
actgtccttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct	7140
acatacctcg ctctgctaatt cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt	7200
cttaccgggt tggactcaag acgatgtta ccggataagg cgcagcggc gggctgaacg	7260
gggggttcgt gcacacagcc cagctggag cgaacgaccc acaccgaact gagataccta	7320
cagcgtgagc tatgagaaag cgcacgcctt cccgaaggaa gaaaggcggc caggtatccg	7380
gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg	7440
tatctttata gtcctgtcgg gtttgcac cctctgactt agcgtcgatt tttgtatgc	7500
tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggcctttt acggttcctg	7560
gcctttgtt ggcctttgc tcacatgttc ttccctgcgt tatccctga ttctgtggat	7620
aaccgttta ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc	7680
agcgagtcag tgagcgagga agcggaaagag cgcccaatac gcaaaccgc tctccccgcg	7740
cgttggccga ttcattaatg	7760

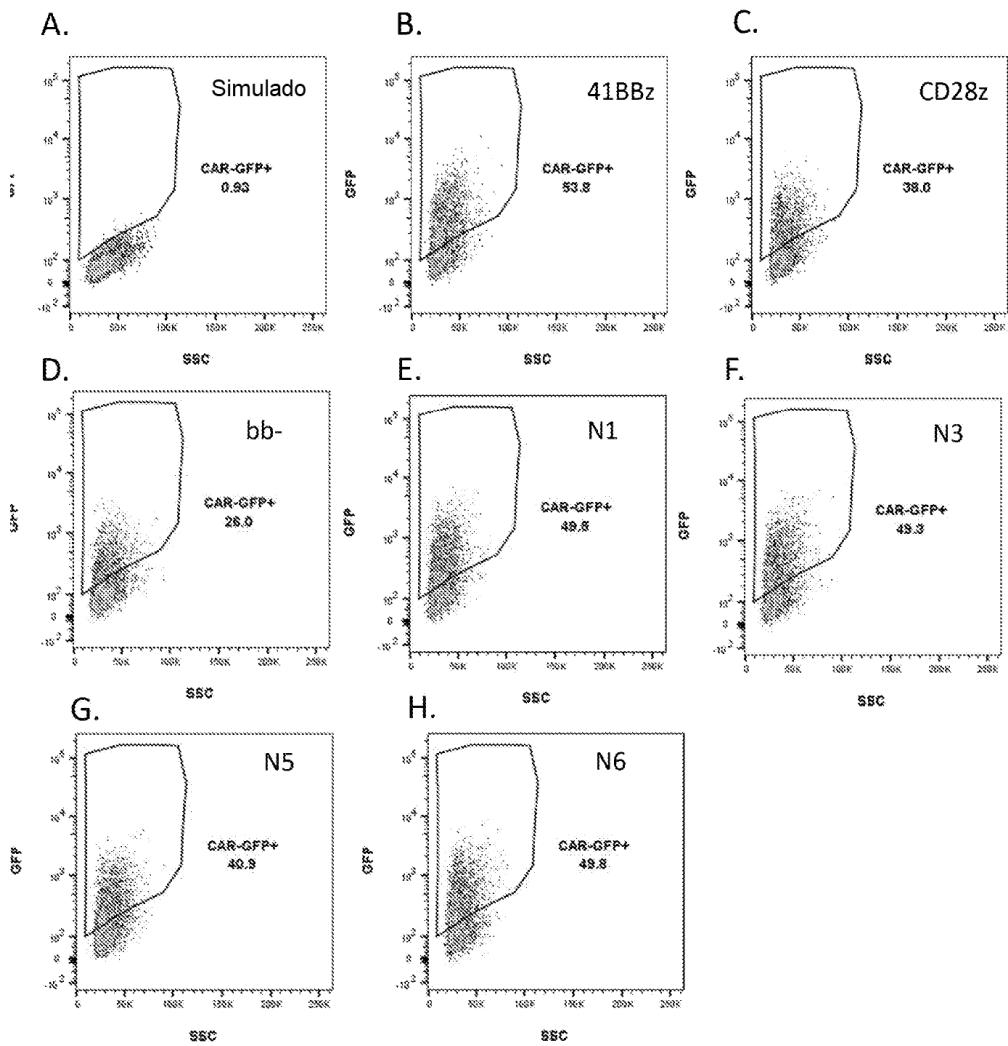
**REIVINDICACIONES**

1. Un dominio coestimulador que comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8.
2. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular, en el que dicho dominio intracelular comprende dicho dominio coestimulador de la reivindicación 1 y un dominio de señalización intracelular.
- 5 3. El CAR de la reivindicación 2, en el que dicho dominio de señalización intracelular comprende un dominio de señalización intracelular CD3  $\zeta$ .
4. El CAR de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que dicho dominio transmembrana comprende un dominio transmembrana CD8 alfa.
- 10 5. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que dicho dominio de unión al ligando extracelular comprende un fragmento variable de cadena única (scFv).
6. El CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que dicho dominio de unión al ligando extracelular tiene especificidad para un antígeno tumoral.
7. Una célula eucariota modificada genéticamente que comprende dicho dominio coestimulador de la reivindicación 1.
- 15 8. Una célula eucariota modificada genéticamente que comprende dicho CAR de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6.
9. La célula eucariota modificada genéticamente de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que dicha célula eucariota modificada genéticamente es una célula T humana modificada genéticamente.
- 20 10. La célula eucariota modificada genéticamente de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que dicha célula eucariota modificada genéticamente es una célula asesina natural (NK) humana modificada genéticamente.
11. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y dicha célula T humana genéticamente modificada de la reivindicación 9 o dicha célula NK humana genéticamente modificada de la reivindicación 10.
- 25 12. Una composición farmacéutica de la reivindicación 11 para su uso en un procedimiento de inmunoterapia para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, en el que dicho dominio extracelular de unión a antígeno tiene especificidad para un antígeno tumoral.

**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**

A.

Expansión de CAR T en cultivo de Raji

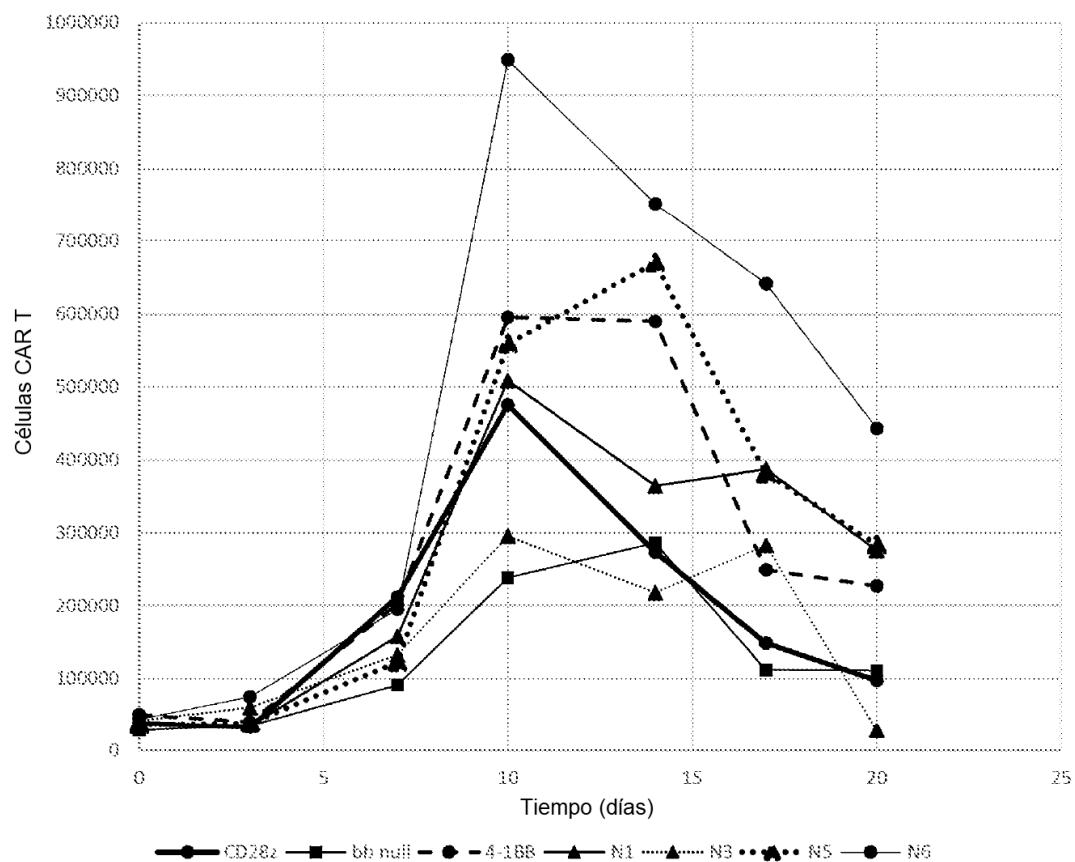
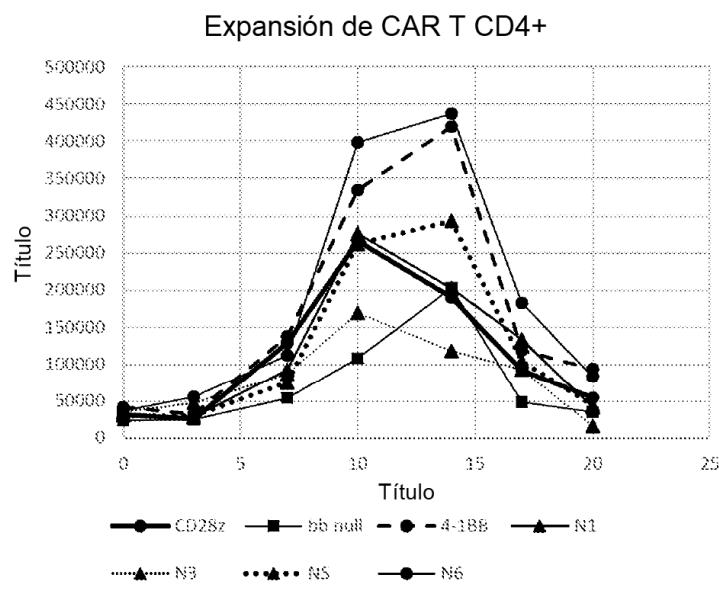
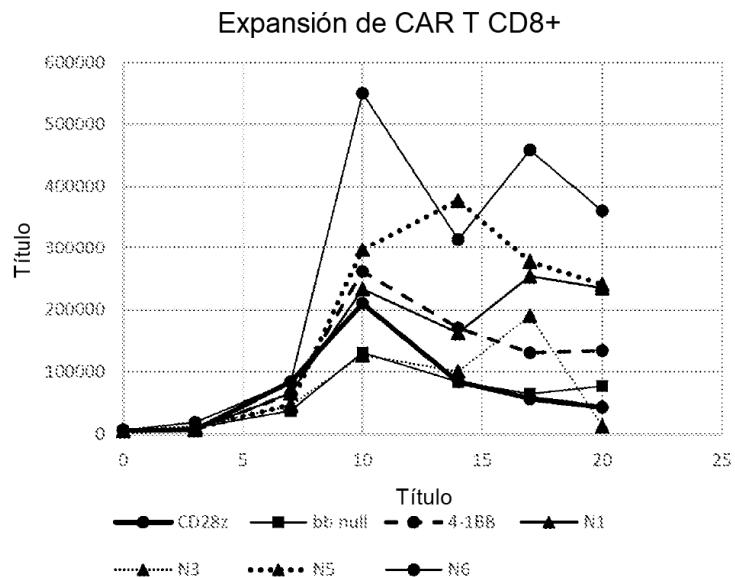


FIGURA 4

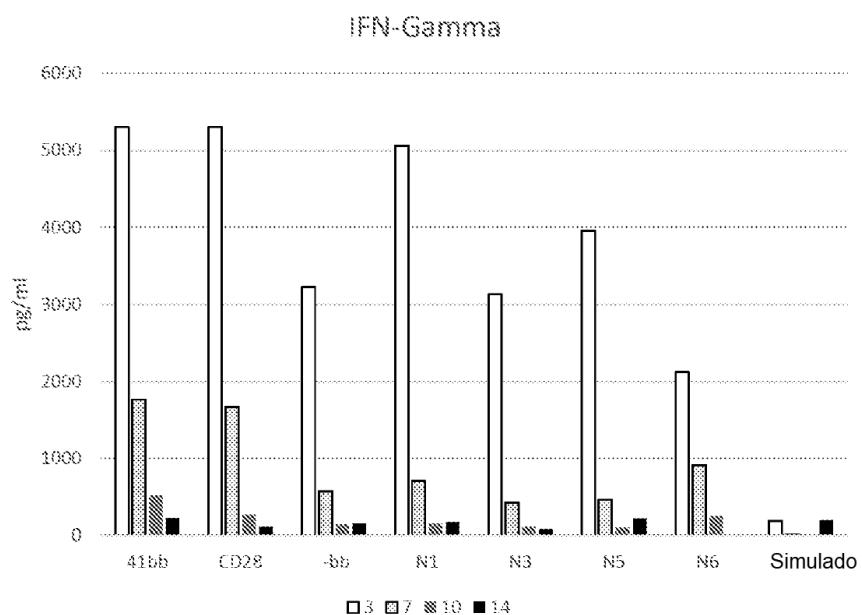
B.



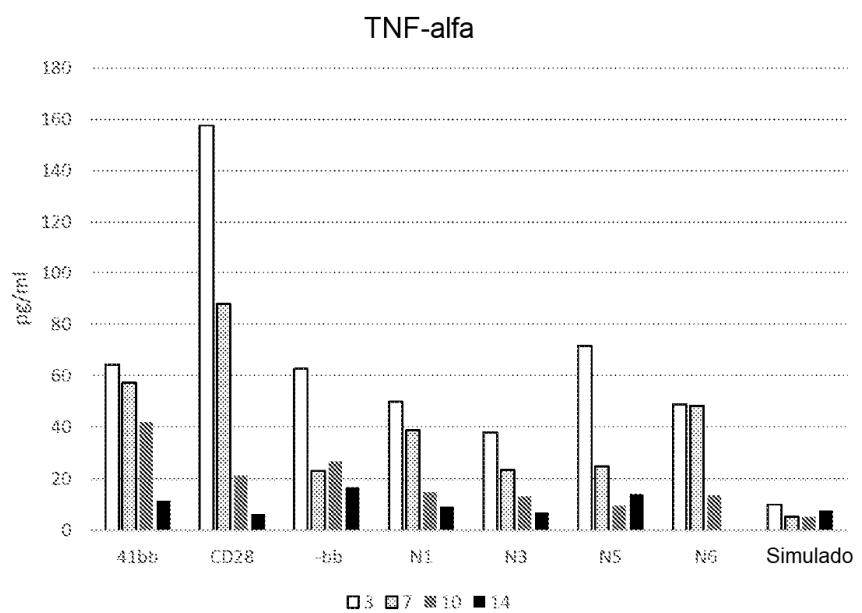
C.

**FIGURA 4 (continuación)**

A.

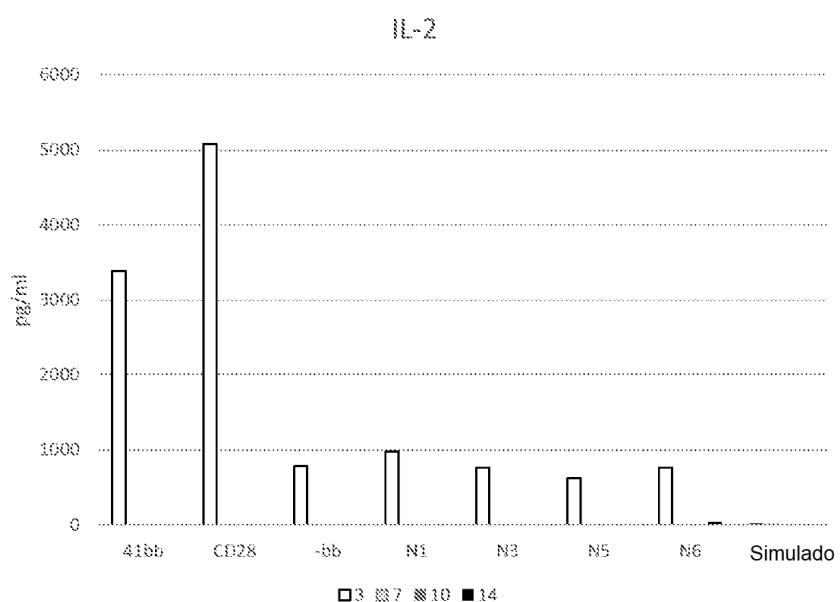


B.



**FIGURA 5**

C.



**FIGURA 5 (continuación)**

A.

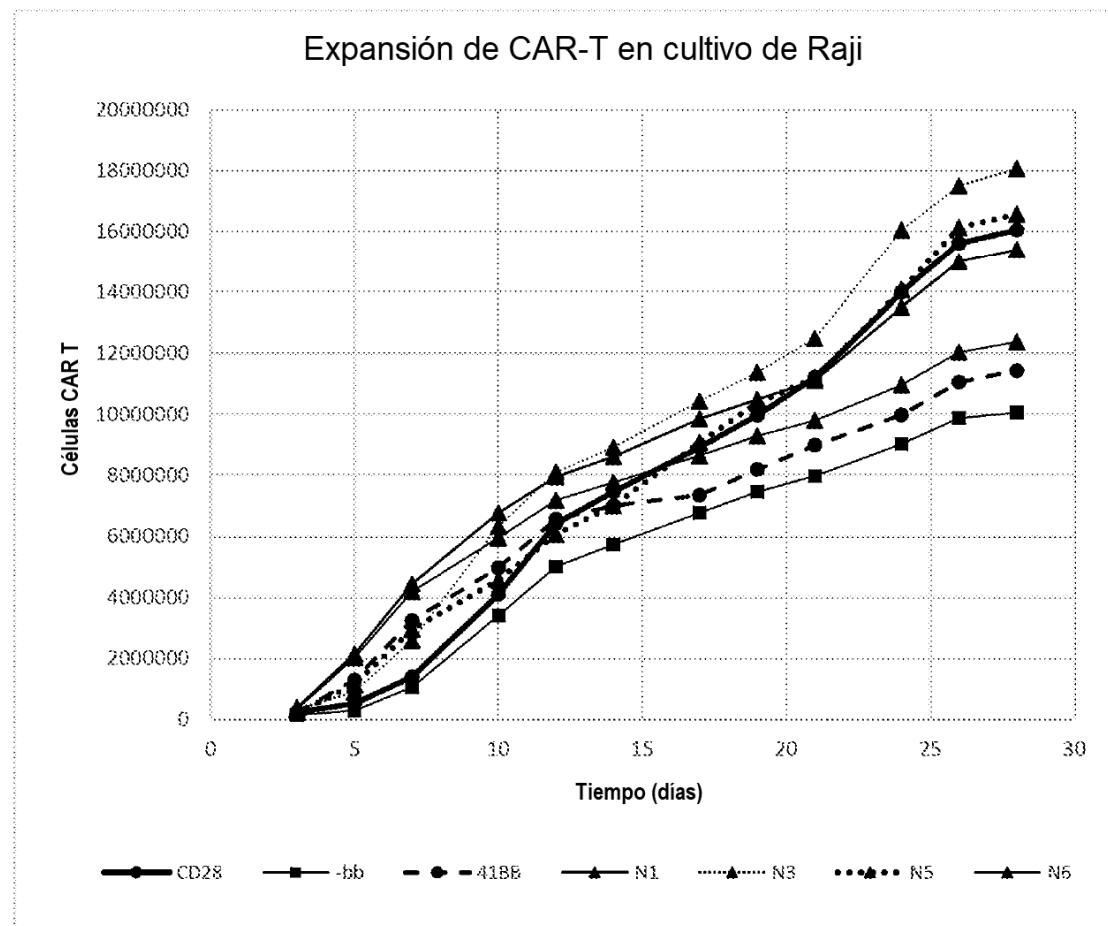
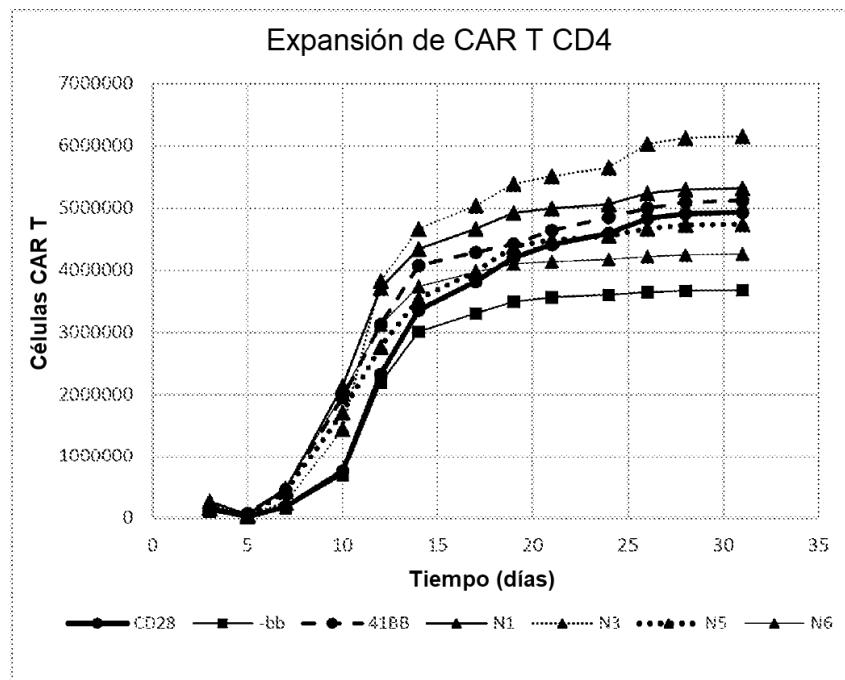


FIGURA 6

B.



C.

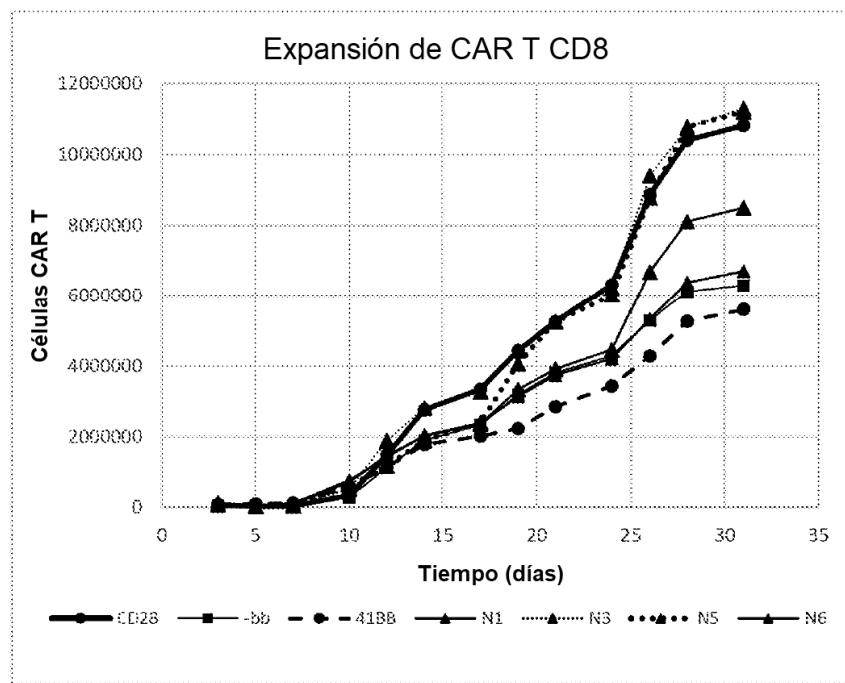


FIGURA 6 (continuación)

CD19 4-1BB CAR



CD19 N1 CAR



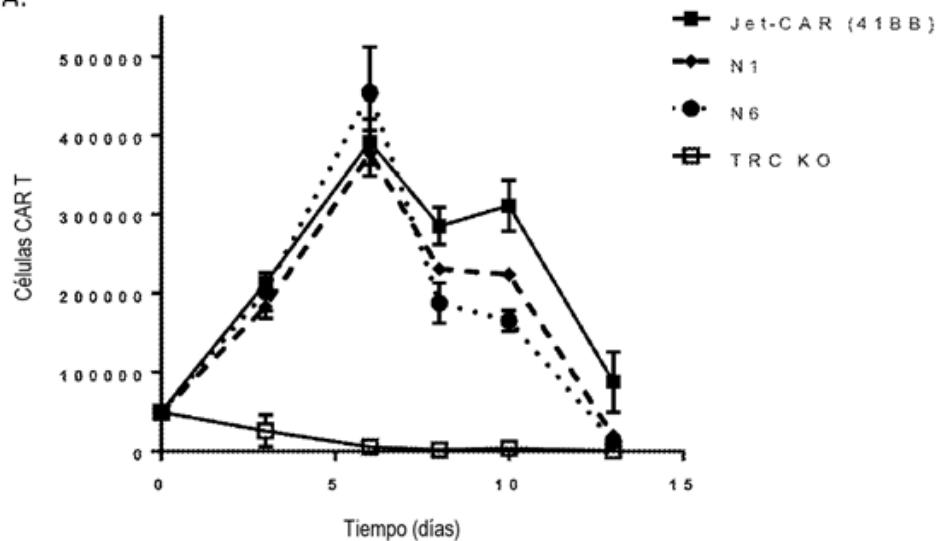
CD19 N6 CAR



**FIGURA 7**

## Donante K799

A.



## Donante z4100

B.

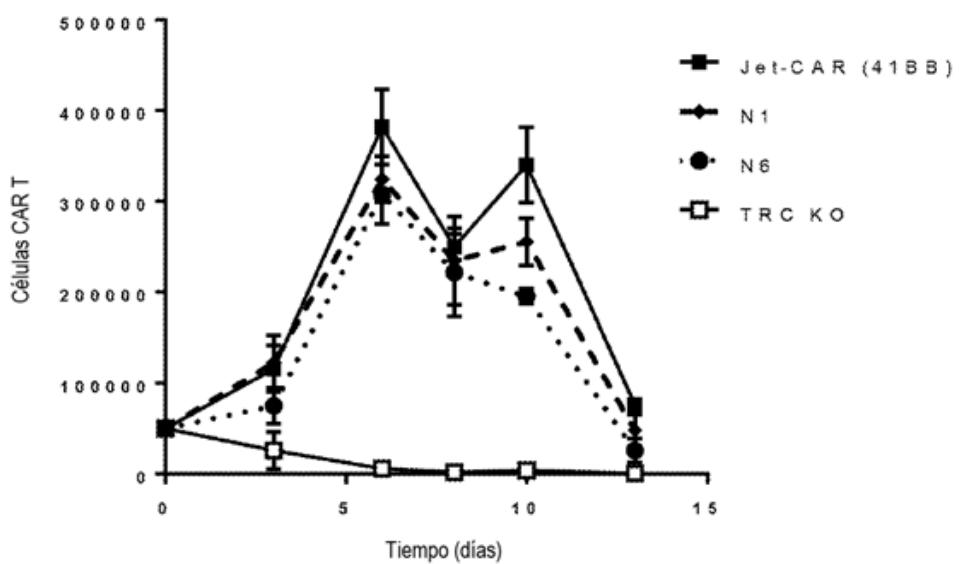
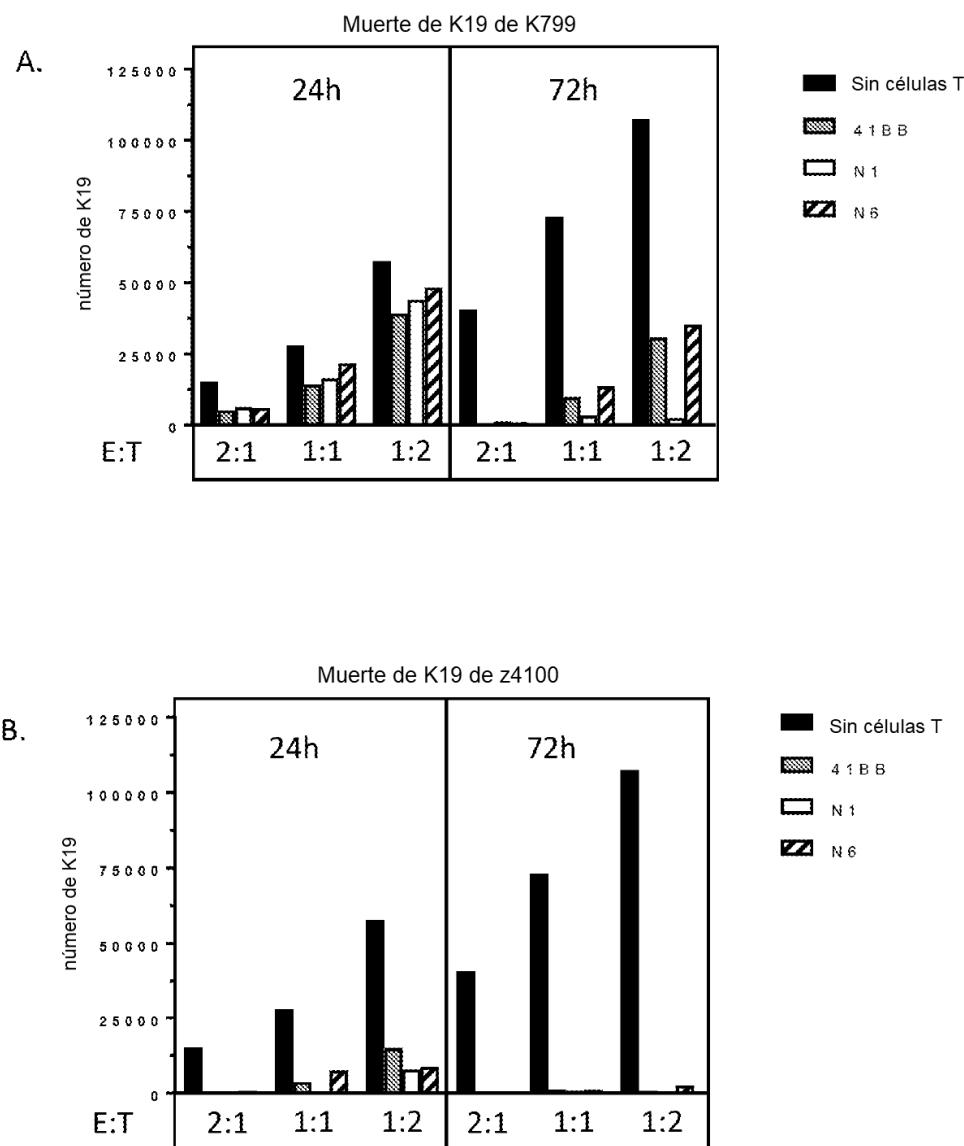
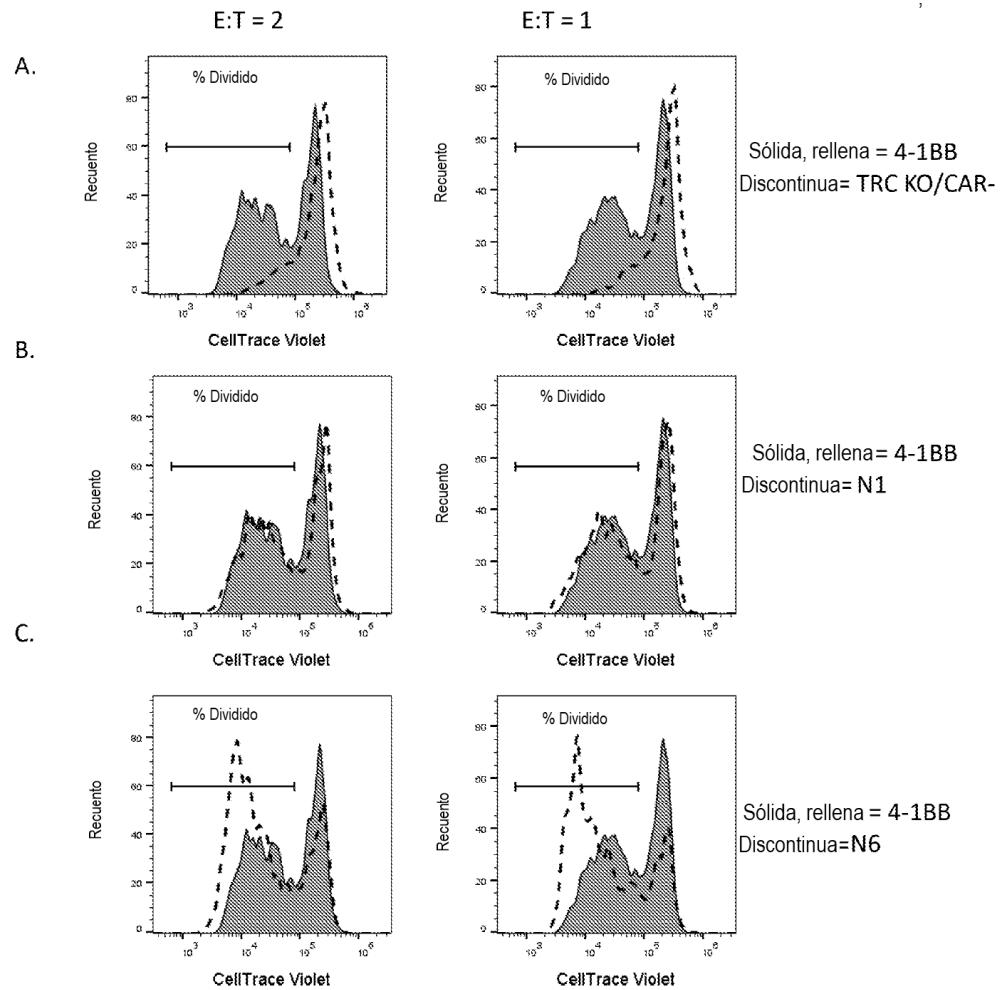


FIGURA 8



**FIGURA 9**

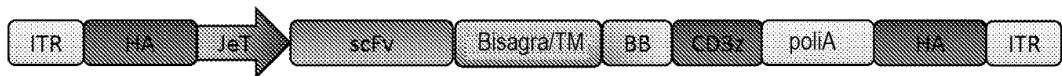
# ES 2 925 644 T3



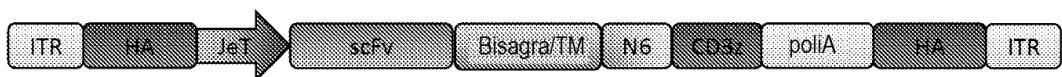
**FIGURA 10**

# ES 2 925 644 T3

7241 CD19 4-1BB CAR



7205 CD19 N6 CAR

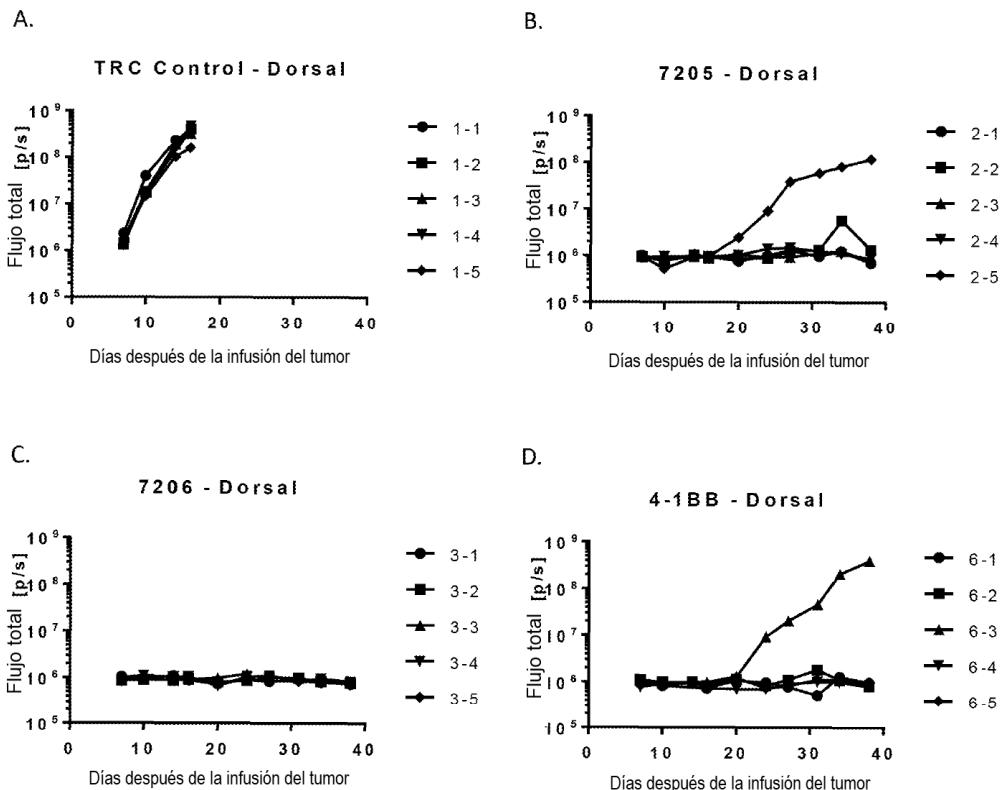


7206 CD19 N6 CAR

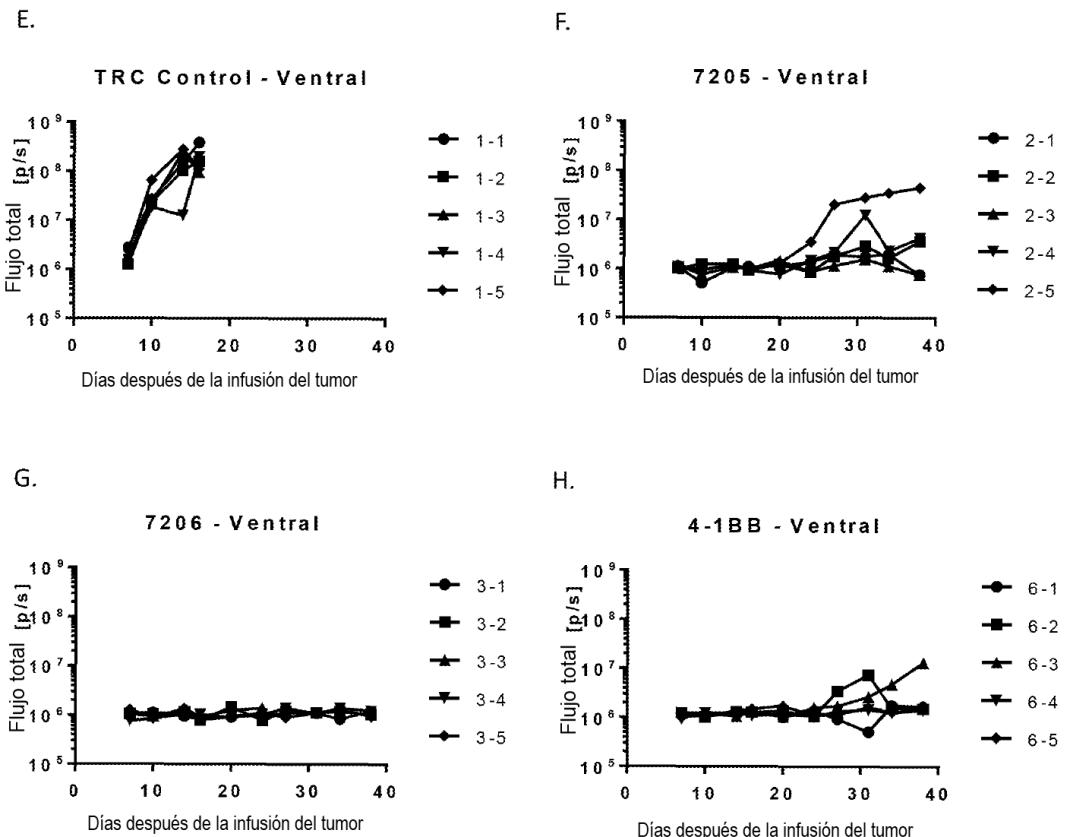


**FIGURA 11**

# ES 2 925 644 T3



**FIGURA 12**



**FIGURA 12 (continuación)**

# ES 2 925 644 T3

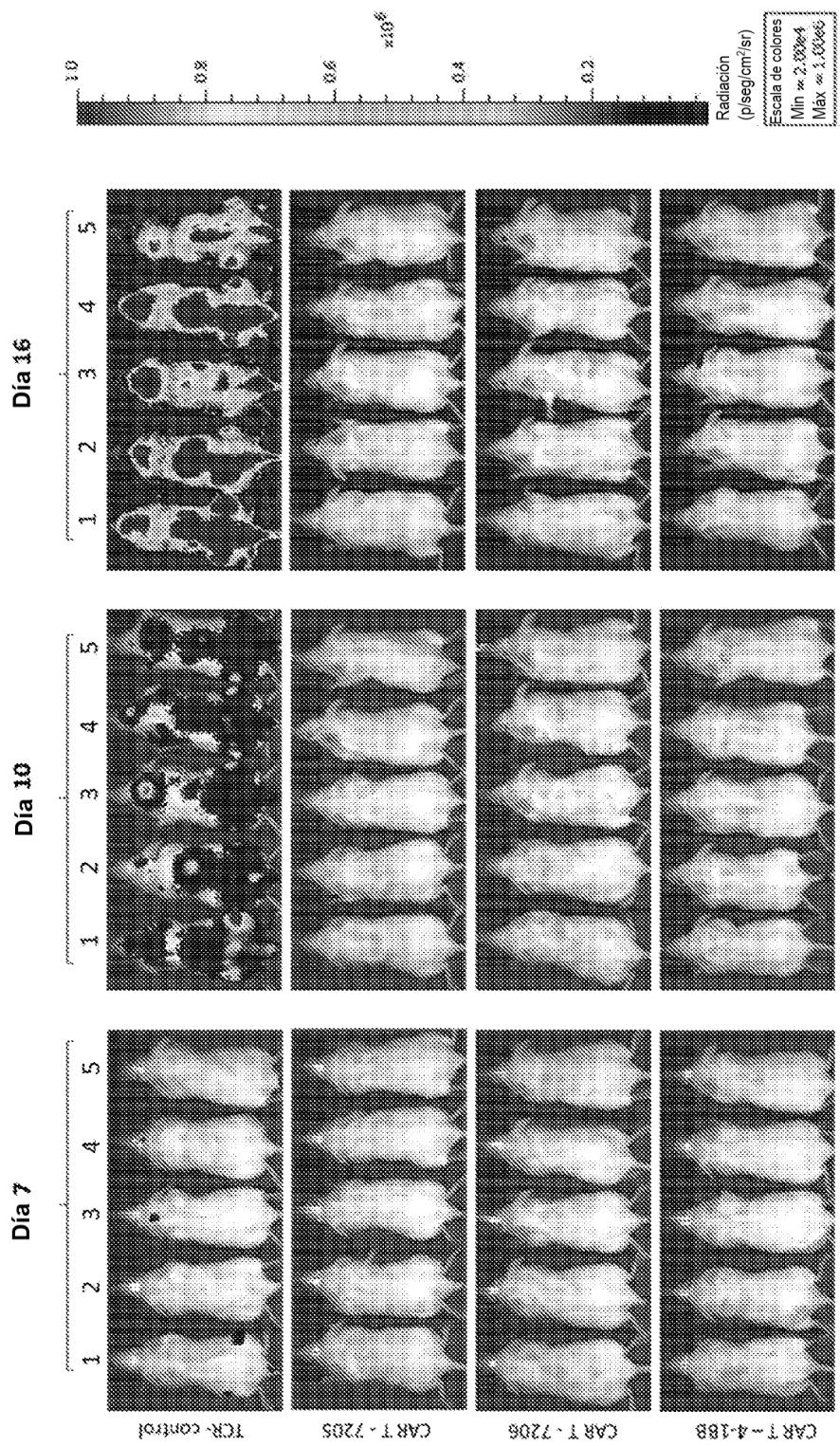
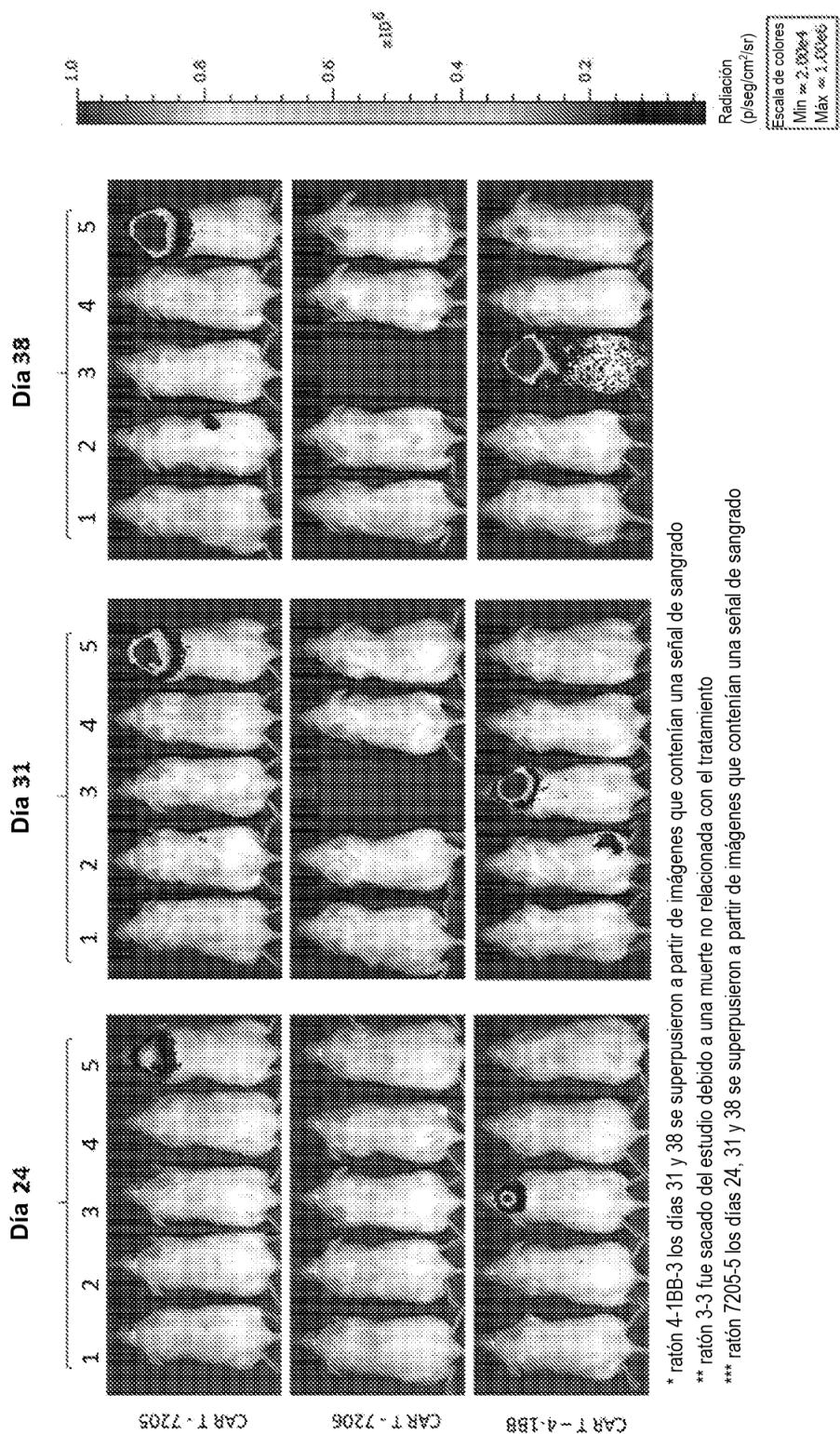


FIGURA 13A



\* ratón 4-1BB-3 los días 31 y 38 se superpusieron a partir de imágenes que contenían una señal de sangrado

\*\* ratón 3-3 fue sacado del estudio debido a una muerte no relacionada con el tratamiento

\*\*\* ratón 7205-5 los días 24, 31 y 38 se superpusieron a partir de imágenes que contenían una señal de sangrado

FIGURA 13B

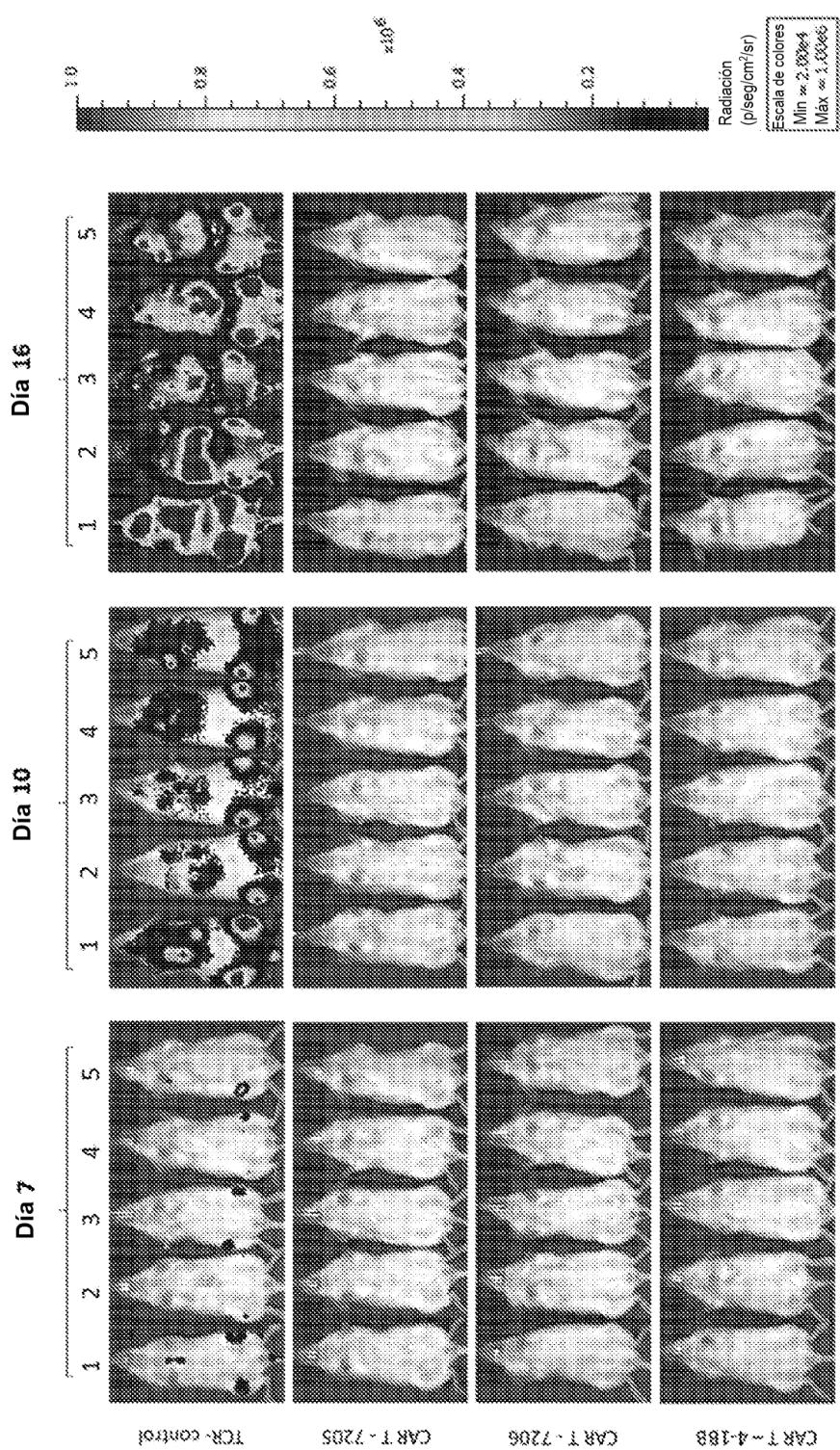


FIGURA 13C

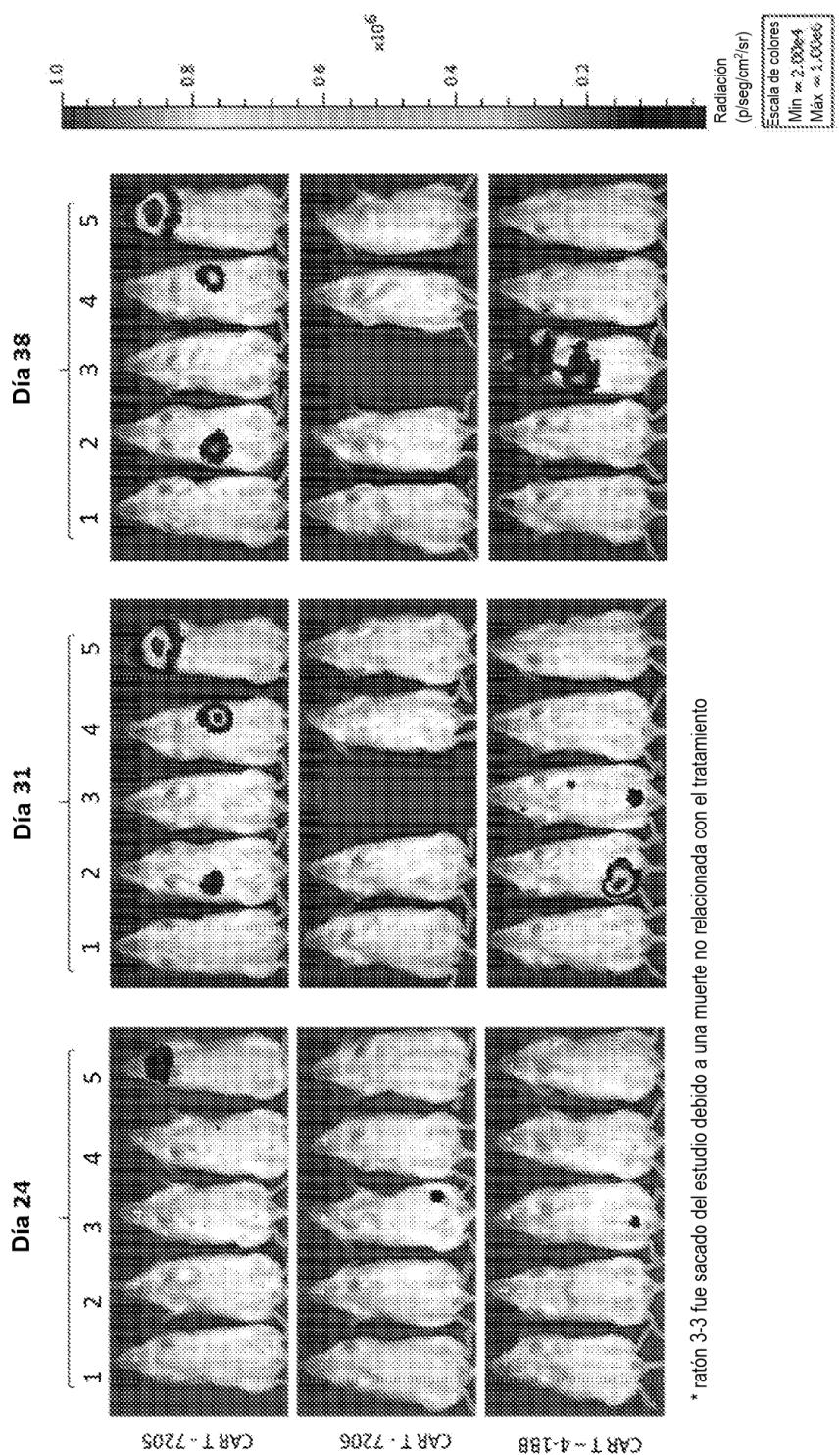
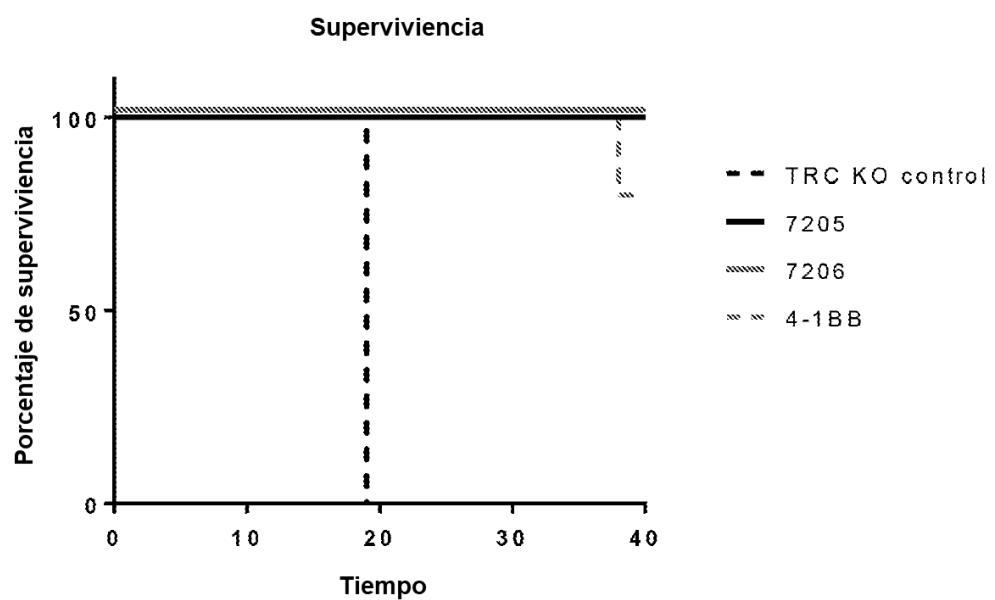


FIGURA 13D



**FIGURA 14**

7240 MyD88/N6 CD19 CAR

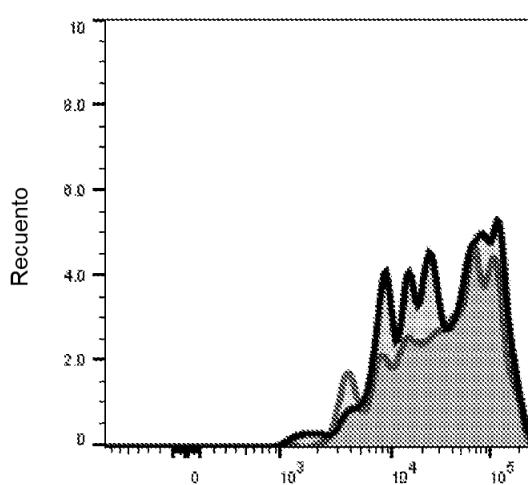


**FIGURA 15**

TRC Control

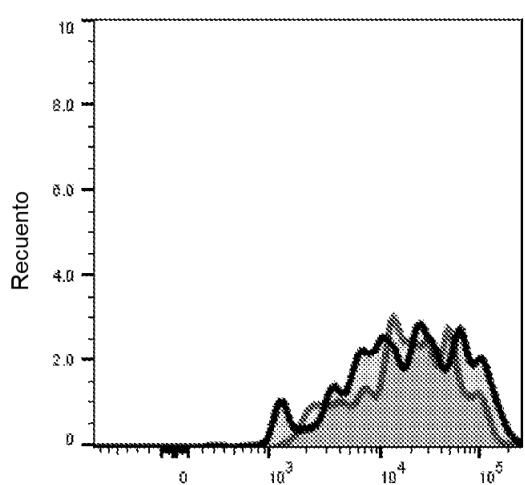
A.

Células T CD4<sup>+</sup>



B.

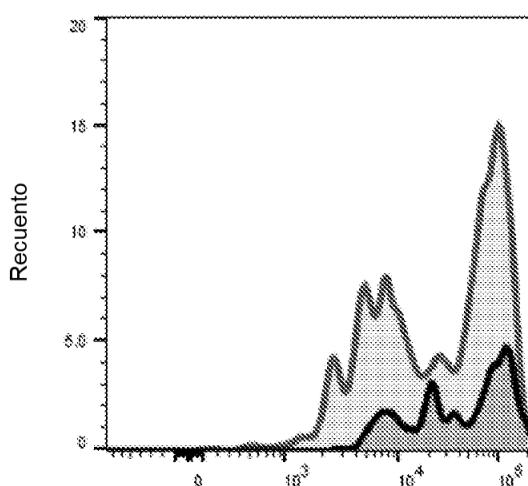
Células T CD8<sup>+</sup>



N6 CAR

C.

Células T CD4<sup>+</sup>



D.

Células T CD8<sup>+</sup>

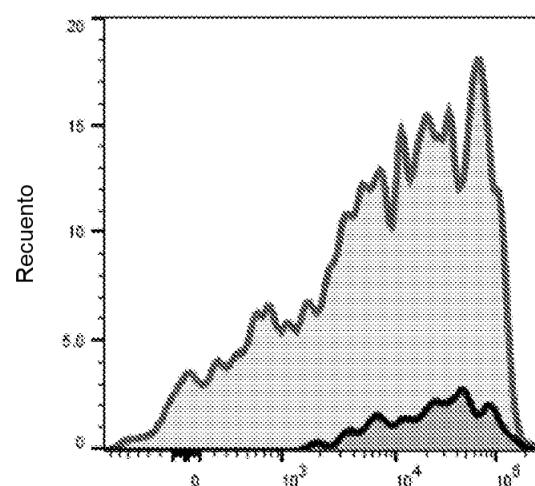


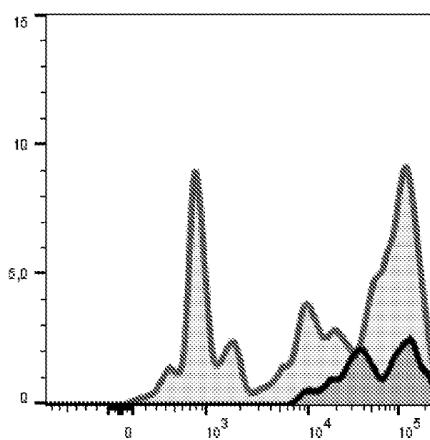
FIGURA 16

MyD88/N6 CAR

E.

Células T CD4<sup>+</sup>

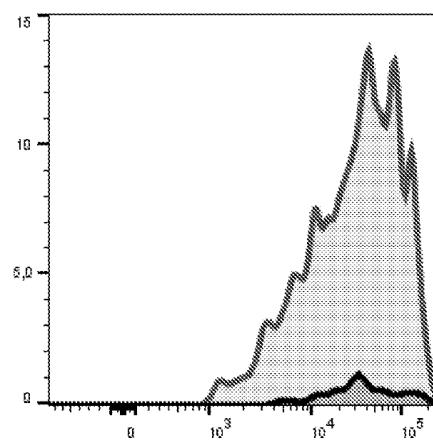
Recuento



F.

Células T CD8<sup>+</sup>

Recuento



**FIGURA 16 (continuación)**

7235 iMyD88/N6 CD 19 CAR

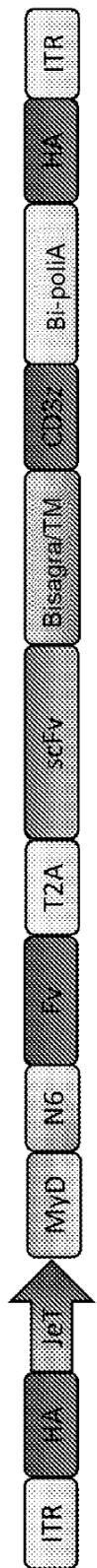
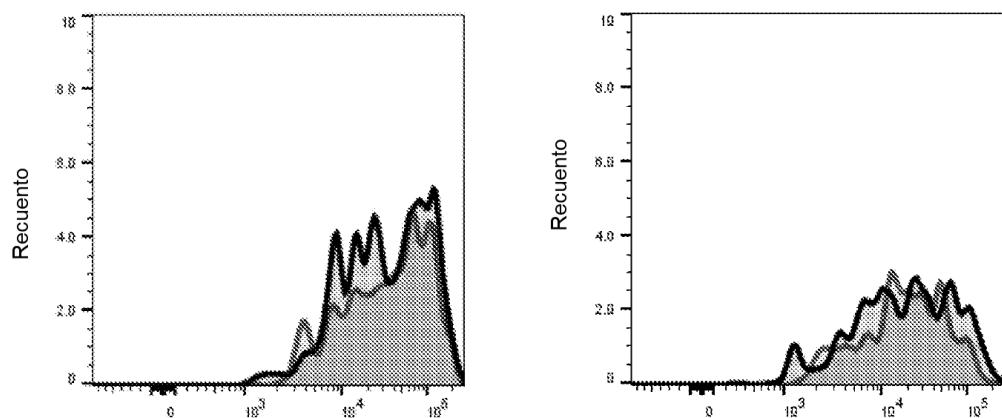


FIGURA 17

TRC Control

---

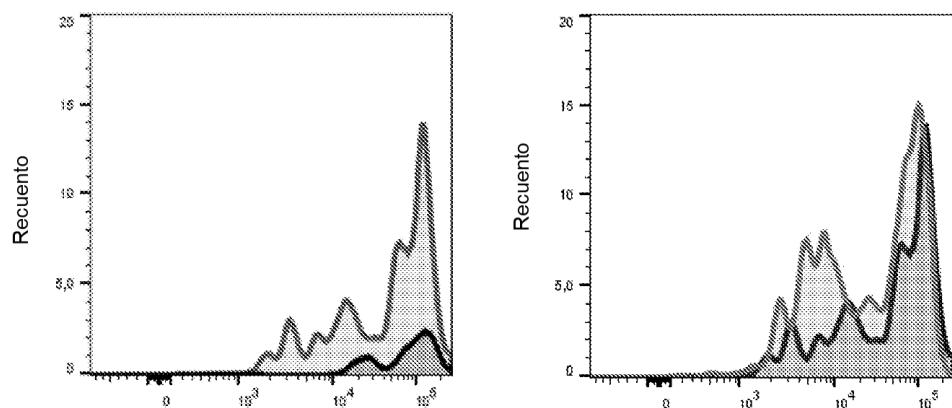
A. Células T CD4<sup>+</sup>      B. Células T CD8<sup>+</sup>



**FIGURA 18**

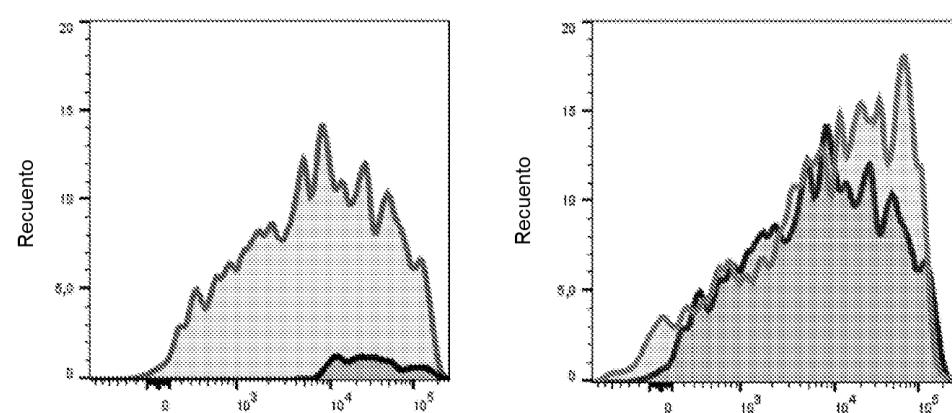
Células T N6 CAR – CD4<sup>+</sup>

A. K19/K562      B. K19 +/- Rimiducid



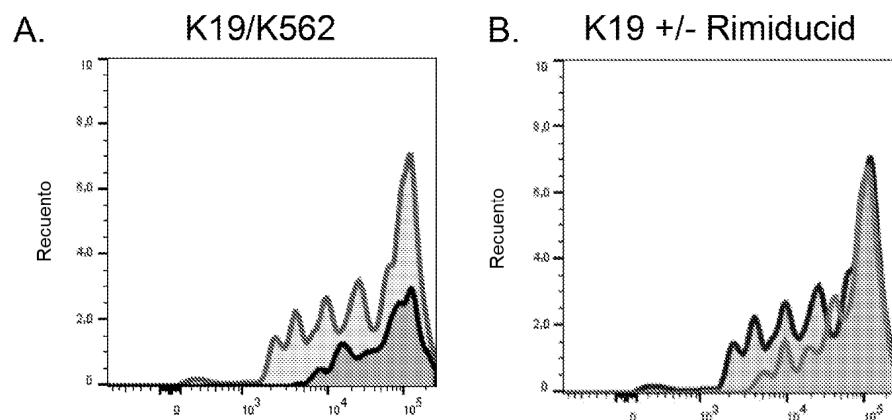
Células T N6 CAR – CD8<sup>+</sup>

C. K19/K562      D. K19 +/- Rimiducid



**FIGURA 19**

Células T iMyD88/N6 – CD4<sup>+</sup>



Células T iMyD88/N6 – CD8<sup>+</sup>

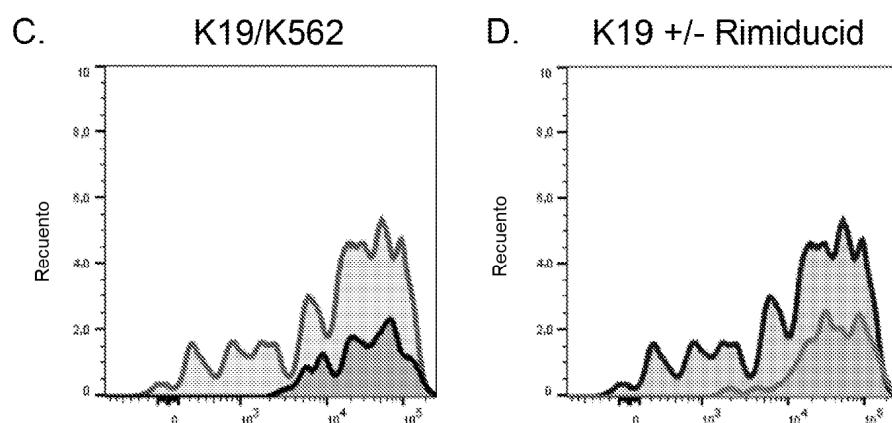


FIGURA 20