

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 828 669**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/735 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2014 PCT/IB2014/061409**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14184741**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2014 E 14727626 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2020 EP 2997132**

(54) Título: **Métodos para genomodificación de linfocitos T alogénicos y altamente activos para inmunoterapia**

(30) Prioridad:

**13.05.2013 US 201313892805
13.05.2013 WO PCT/US2013/040755
13.05.2013 WO PCT/US2013/040766
15.07.2013 US 201313942191**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2021

(73) Titular/es:

**CELLECTIS (100.0%)
8, rue de la Croix Jarry
75013 Paris, FR**

(72) Inventor/es:

**GALETTI, ROMAN;
GOUBLE, AGNES;
GROSSE, STEPHANIE;
SCHIFFER-MANNIOUI, CÉCILE;
POIROT, LAURENT;
SCHARENBERG, ANDREW y
SMITH, JULIANNE**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 828 669 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

Métodos para genomodificación de linfocitos T alogénicos y altamente activos para inmunoterapia

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para desarrollar linfocitos T no alorreactivos genomodificados para inmunoterapia y, más específicamente, a métodos para modificar linfocitos T inactivando tanto los genes que codifican el receptor de linfocitos T como al menos un gen del punto de control inmunitario para liberar el potencial de respuesta inmunitaria. Este método implica el uso de endonucleasas de sitio de corte infrecuentes específicas, en particular nucleasas TALE (endonucleasa efectora de TAL) y polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, para abordar de forma precisa una selección de genes clave en linfocitos T, que están disponibles de donantes o de cultivo de células primarias. La invención también se refiere a rasgos adicionales, que pueden conseguirse en dichos linfocitos T genomodificados, tales como preTCR α ("pTalpha") y derivados funcionales de los mismos, receptor químérico de antígenos (CAR), CAR multicatenario y su uso de los mismos para potenciar la eficacia de inmunoterapia. La invención abre la posibilidad de estrategias inmunoterapéuticas adoptivas convencionales y asequibles para tratar cáncer e infecciones víricas.

20 **Antecedentes de la invención**

La inmunoterapia adoptiva, que implica la transferencia de linfocitos T específicos de antígeno autólogos generados *ex vivo*, es una estrategia prometedora para tratar infecciones víricas y cáncer. Los linfocitos T usados para inmunoterapia adoptiva pueden generarse mediante expansión de linfocitos T específicos de antígeno o redirección de linfocitos T mediante genomodificación (Park, Rosenberg *et al.* 2011). La transferencia de linfocitos T específicos de antígeno vírico es un procedimiento bien establecido usado para el tratamiento de infecciones víricas asociadas con trasplante y tumores malignos relacionados con virus poco habituales. De forma similar, se ha mostrado que el aislamiento y transferencia de linfocitos T específicos de tumor tienen éxito en el tratamiento del melanoma.

30 Se han generado con éxito especificidades novedosas en linfocitos T mediante la transferencia genética de receptores de linfocitos T transgénicos o receptores químéricos de antígenos (CAR) (Jena, Dotti *et al.* 2010). Los CAR son receptores sintéticos que consisten en un resto de dirección que está asociado con uno o más dominios de señalización en una única molécula de fusión. En general, el resto de unión de un CAR consiste en un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo monocatenario (scFv), que comprende los fragmentos ligeros y variables de un anticuerpo monoclonal unidos por un enlazador flexible. También se han usado con éxito restos de unión basados en dominios de receptores o ligandos. Los dominios de señalización para CAR de primera generación proceden de la región citoplásmica del CD3zeta o las cadenas gamma de receptores de Fc. Se ha mostrado que los CAR de primera generación redirigen con éxito la citotoxicidad de linfocitos T, sin embargo, no lograron proporcionar una expansión prolongada y actividad antitumoral *in vivo*. Dominios de señalización de moléculas coestimuladoras que incluyen CD28, OX-40 (CD134) y 4-1BB (CD137) se han añadido solos (segunda generación) o en combinación (tercera generación) para mejorar la supervivencia y aumentar la proliferación de linfocitos T modificados con CAR. Los CAR han permitido con éxito que los linfocitos T se redirijan hacia antígenos expresados en la superficie de células tumorales de diversos tumores malignos, incluyendo linfomas y tumores sólidos (Jena, Dotti *et al.* 2010).

45 Las presentes arquitecturas de CAR se basan en un diseño en el que todos los dominios relevantes están contenidos en un único polipéptido. Este diseño necesita la adición en serie de dominios de señalización, por tanto, es necesario mover algunos dominios de sus posiciones yuxtamembranarias naturales. Por tanto, las arquitecturas en las que los ligandos y los dominios de señalización están separados pueden permitir una función mejorada de los dominios coestimuladores colocados en diferentes cadenas en sus posiciones juxtamembranarias normales, en lugar de añadidos junto con algunos dominios ubicados distales de la membrana plasmática. Un receptor natural, el receptor de alta afinidad por IgE (Fc ϵ RI) produciría dicha arquitectura. Fc ϵ RI presente en mastocitos y basófilos se une a IgE con alta afinidad. Fc ϵ RI es un complejo receptor tetramérico que consiste en una subunidad alfa de unión a ligando, una subunidad beta y un homodímero de dos subunidades gamma de transducción de señales (Metzger, Alcaraz *et al.* 1986). El dominio alfa de Fc ϵ RI consiste en un dominio extracelular que contiene dos dominios de tipo Ig que se unen a IgE, un dominio transmembranario y una cola citoplásmica corta. La subunidad beta contiene cuatro segmentos transmembranarios que separan colas citoplásmicas amino y carboxiterminales. La cadena gamma consiste esencialmente en una región transmembranaria y una cola citoplásmica que contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) (Cambier 1995). La cadena zeta del complejo TCR está muy relacionada con la cadena gamma y puede sustituir la cadena gamma de Fc ϵ RI (Howard, Rodewald *et al.* 1990). H. Torikai *et al.*, BLOOD, 2012, 119: 5697-5705, divulan la eliminación de TCR endógeno en linfocitos T CAR.

60 El protocolo actual para tratamiento de pacientes usando inmunoterapia adoptiva se basa en la transferencia de células autólogas. En este enfoque, se recuperan linfocitos T de pacientes, se modifican genéticamente o se seleccionan *ex vivo*, se cultivan *in vitro* para amplificar el número de células si es necesario y finalmente se infunden en el paciente. Además de la infusión de linfocitos, el hospedador puede manipularse de otras maneras que apoyan el injerto de los linfocitos T o su participación en una respuesta inmunitaria, por ejemplo preacondicionamiento (con radiación o quimioterapia) y administración de factores de crecimiento de linfocitos (tales como IL-2). Cada paciente recibe un

tratamiento fabricado individualmente, usando los propios linfocitos del paciente (es decir una terapia autóloga). Las terapias autólogas se enfrentan a obstáculos técnicos y logísticos sustanciales para la aplicación práctica, su generación requiere instalaciones dedicadas caras y personal experto, deben generarse en un tiempo corto después del diagnóstico de un paciente y, en muchos casos, el pretratamiento del paciente ha dado como resultado función inmunitaria degradada, de modo que los linfocitos del paciente pueden ser poco funcionales y estar presentes en números muy bajos. Debido a estos obstáculos, la preparación de células autólogas de cada paciente es en efecto un producto nuevo, dando como resultado variaciones sustanciales en la eficacia y seguridad. En el mejor de los casos, se querría usar una terapia normalizada en la que las células terapéuticas alogénicas podrían prefabricarse, caracterizarse en detalle y estar disponibles para administración inmediata a pacientes. Por alogénico se entiende que las células se obtienen de individuos que pertenecen a la misma especie pero son genéticamente diferentes. Sin embargo, el uso de células alogénicas tiene en la actualidad muchas desventajas. En hospedadores inmunocompetentes las células alogénicas son rechazadas rápidamente, un proceso denominado rechazo de hospedador frente a injerto (HvG) y esto limita sustancialmente la eficacia de las células transferidas. En hospedadores inmunocompetentes, las células alogénicas son capaces de injertarse, pero sus especificidades de TCR endógeno reconocen el tejido hospedador como exógeno, lo que da como resultado enfermedad de injerto contra el hospedador (GvHD), lo que puede conducir a daño tisular grave y muerte. Para usar eficazmente células alogénicas, deben superarse estos dos problemas.

En hospedadores inmunocompetentes, las células alogénicas se rechazan rápidamente por el sistema inmunitario hospedador. Se ha demostrado que, los leucocitos alogénicos presentes en productos sanguíneos no irradiados no persistirán más de 5 a 6 días. (Boni, Muranski *et al.* 2008). Por tanto, para prevenir el rechazo de células alogénicas, el sistema inmunitario del hospedador debe suprimirse eficazmente. Se usan ampliamente glucocorticoesteroides terapéuticamente para inmunosupresión (Coutinho y Chapman 2011). Esta clase de hormonas esteroideas se une con el receptor de glucocorticoesteroides (GR) presente en el citosol de linfocitos T en la translocación al núcleo y la unión de motivos de ADN específicos que regulan la expresión de varios genes implicados en el proceso inmunológico. El tratamiento de linfocitos T con esteroides glucocorticoesteroides da como resultado niveles reducidos de producción de citocinas que conducen a anergia de linfocitos T e interferencia en la activación de linfocitos T. Alemtuzumab, también conocido como CAMPATH1-H, es un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige a CD52, una glucoproteína ligada a glucosilfosfatidilinositol (GPI) de 12 aminoácidos (Waldmann y Hale 2005). CD52 se expresa a altos niveles en linfocitos T y B y menores niveles en monocitos, mientras que está ausente en granulocitos y precursores de médula ósea. El tratamiento con Alemtuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra CD52, ha demostrado inducir una rápida reducción de los linfocitos y monocitos en circulación. Se usa frecuentemente en el tratamiento de linfomas de linfocitos T y en determinados casos como parte de un régimen de acondicionamiento para trasplante. Sin embargo, en el caso de inmunoterapia adoptiva, el uso de fármacos inmunosupresores tendrá también un efecto perjudicial en los linfocitos T terapéuticos introducidos. Por lo tanto, para usar eficazmente un enfoque de inmunoterapia adoptiva en estas condiciones, sería necesario que las células introducidas fueran resistentes al tratamiento inmunosupresor.

Por otro lado, los receptores de linfocitos T (TCR) son receptores de superficie celular que participan en la activación de linfocitos T en respuesta a la presentación de antígeno. El TCR está compuesto en general por dos cadenas, alfa y beta, que se ensamblan para formar un heterodímero y se asocia con las subunidades transductoras de CD3 para formar el complejo de receptores de linfocitos T presente en la superficie celular. Cada cadena alfa y beta del TCR consiste en una región variable (V) y constante (C) N-terminal de tipo inmunoglobulina, un dominio hidrófobo transmembrana y una región citoplásica corta. Con respecto a moléculas de inmunoglobulina, la región variable de las cadenas alfa y beta se genera por la recombinación V(D)J, creando una gran diversidad de especificidades de antígeno en la población de linfocitos T. Sin embargo, a diferencia de inmunoglobulinas que reconocen antígeno intacto, los linfocitos T son activados por fragmentos peptídicos procesados en asociación con una molécula de MHC, introduciendo una dimensión extra al reconocimiento de antígenos por linfocitos T, conocido como restricción de MHC. El reconocimiento de diferencias de MHC entre el donante y el receptor mediante el receptor de linfocitos T conduce a proliferación de linfocitos T y el desarrollo potencial de GVHD. Se ha mostrado que la expresión en superficie normal del TCR depende de la síntesis y el ensamblaje coordinados de los siete componentes del complejo (Ashwell y Klusner 1990). La inactivación de TCRalfa o TCRbeta puede dar como resultado la eliminación del TCR de la superficie de linfocitos T, lo que evita el reconocimiento de aloantígeno y, por tanto, GVHD. Sin embargo, la alteración de TCR da como resultado la eliminación del componente de señalización CD3 y altera el significado de la expansión de linfocitos T adicional.

La inmunidad mediada por linfocitos T incluye múltiples etapas secuenciales reguladas por un equilibrio entre señales coestimulantes e inhibidoras que ajustan la respuesta inmunitaria. Las señales inhibidoras denominadas puntos de control inmunitarios son cruciales para el mantenimiento de autotolerancia y también limitan el daño al tejido colateral mediado por inmunidad. La expresión de puntos de control inmunitarios puede desregularse por tumores. La capacidad de los tumores de incorporar estas rutas inhibidoras representa un mecanismo importante en la resistencia inmunitaria y limita el éxito de la inmunoterapia. Uno de los enfoques prometedores para activar la respuesta inmunitaria de linfocitos T terapéuticos es el bloqueo de estos puntos de control inmunitarios (Pardoll 2012). Los puntos de control inmunitarios representan barreras importantes a la activación de inmunidad celular funcional en cáncer, y anticuerpos antagonistas específicos para ligandos inhibidores en linfocitos T incluyendo CTLA4 y muerte programada-1 (PD-1) son ejemplos de agentes dirigidos que se evalúan en clínica.

5 El antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4; también conocido como CD152), regula por disminución la amplitud de activación de linfocitos T, y el tratamiento con anticuerpos antagonistas de CTLA4 (ipilimumab) ha mostrado un beneficio de supervivencia en pacientes con melanoma (Robert y Mateus 2011). La proteína de muerte 10 celular programada 1 (PD1 o PDCD1 también conocida como CD279) representa otra diana muy prometedora para inmunoterapia (Pardoll y Drake 2012; Pardoll 2012). A diferencia de CTLA-4, PD1 limita funciones efectoras de linfocitos T en tejido periférico en el momento de una respuesta inflamatoria a la infección y para limitar la autoinmunidad. El primer ensayo clínico con anticuerpo contra PD1 muestra algunos casos de regresión tumoral (Brahmer, Drake *et al.* 2010). Múltiples proteínas de punto de control inmunitario adicionales representan dianas 15 prometedoras para bloqueo terapéutico basándose en estudios recientes.

15 En linfocitos T normales, los receptores de linfocitos T surgen de los receptores de prelinfocitos T (pTCR) que se expresan por timocitos inmaduros y son cruciales para el desarrollo de linfocitos T de los estadios doble negativos (CD4- CD8-) a los doble positivos (CD4+ CD8+). Los prelinfocitos T que tienen éxito en reordenaciones productivas 20 del locus TCRbeta expresan una cadena de TCRbeta funcional que se empareja con una cadena preTalpha invariante y componentes de señalización de CD3 para formar el complejo pre-TCR. La expresión del preTCR en la superficie celular es necesaria para desencadenar la selección beta, un proceso que induce la expansión de linfocitos T en desarrollo, aplica la exclusión alélica del locus TCRbeta y da como resultado la inducción de reordenaciones en el locus TCRalpha (von Boehmer 2005). Después de reordenaciones de TCRalpha productivas y sustitución de pTalpha por TCRalpha para formar un TCR maduro, los timocitos experimentan una segunda etapa de selección, denominada 25 selección positiva o de TCRalpha/beta tras la unión de complejos MHC de péptidos propios expresados en células epiteliales tímicas. Por tanto, los linfocitos T maduros reconocen y responden al complejo de antígeno/MHC mediante su TCR. La consecuencia más inmediata de la activación de TCR es el inicio de rutas de señalización mediante las 30 subunidades de CD3 asociadas, que da como resultado múltiples eventos incluyendo la expansión clonal de linfocitos T, la regulación por aumento de marcadores de activación en la superficie celular y la inducción de citotoxicidad o secreción de citocinas.

35 Debido a la naturaleza de la selección de cadenas de TCRbeta mediante emparejamiento con preTalpha durante el desarrollo tímico, en linfocitos T en los que se ha inactivado TCRalpha, la introducción heteróloga del transgén de pTalpha puede dar como resultado la formación de un preTCR. Este pTCR puede actuar como un medio de activación o estimulación de linfocitos T de una manera que no depende de MHC, permitiendo por tanto, por ejemplo, la expansión continuada de linfocitos T alfa/beta después de inactivación de TCRalpha. De forma importante, el complejo de pTCR presenta una composición bioquímica similar al TCR con respecto a subunidades de CD3 asociadas (Carrasco, Ramiro *et al.* 2001). Además, a diferencia de los TCR, puede producirse señalización de pre-TCR en parte por un evento 40 independiente de ligando. La estructura cristalina del dominio extracelular de pTCR ha proporcionado una base estructural para la independencia de ligando posible de señalización de pTCR. Se ha mostrado que el pTCR forma un dímero de cabeza a cola donde dos heterodímeros de pTalpha-TCRbeta se asocian (Pang, Berry *et al.* 2010).

45 En la presente invención, los inventores han conseguido la producción de linfocitos T genomodificados, lo que supera las limitaciones de las presentes estrategias de inmunoterapia, permitiendo que no sean alorreactivos y que sean muy activos. Aunque, el bloqueo de los puntos de control inmunitario se ha logrado usando anticuerpos, otra manera de conseguir inhibición es mediante la inactivación de la expresión de genes del punto de control inmunitario en linfocitos T, que permite la producción de linfocitos T alogénicos genomodificados de manera ideal como un producto "disponible libremente". Esto se hizo posible mediante inactivación génica usando nucleasas TALE específicas dirigidas contra TCRalpha o TCRbeta acoplada con inactivación de genes que codifican proteína del punto de control inmunitario, tales 50 como PD1 y CTLA-4.

55 En particular, la inactivación de TCRalpha o TCRbeta acoplada con inactivación de genes del punto de control inmunitario en linfocitos T derivados de un donante alogénico, reduce significativamente el riesgo de GVHD, eliminando el TCR, responsable del reconocimiento de disparidades del MHC, mientras permite la proliferación y actividad de los linfocitos introducidos. Por tanto, se espera que estos linfocitos T alogénicos modificados sean muy activos en la sangre del paciente, donde pueden dirigirse a las células tumorales o las células infectadas.

60 Además de la concepción anterior de linfocitos T modificados genéticamente, que pueden no ser alorreactivos y ser muy activos, los inventores, mediante el uso y diseño de nucleasas TALE específicas, han inactivado simultáneamente estos diferentes genes en linfocitos T, obteniendo de ese modo mutantes dobles. De hecho, la manipulación dirigida de dos genes por DSB no se ha conseguido hasta ahora en linfocitos T debido a la dificultad de producir y mantener linfocitos T en cultivo a lo largo del tiempo, a sus bajas tasas de transformación y a la pérdida durante los procedimientos de selección. Estas dificultades dan como resultado una baja probabilidad de éxito para obtener dichas células.

65 Por tanto, una parte importante de la divulgación es haber diseñado nucleasas TALE específicas, que permitan mayores tasas de eventos de DSB dentro de los linfocitos T, que se toleren bien por las células, (especialmente tras cotransfección), que puedan dirigir la selección de genes de acuerdo con la invención. Usando endonucleasas de sitio de corte infrecuente, tales como las nucleasas TALE descritas en el presente documento, se aumentó significativamente la probabilidad de obtener inactivación doble de los genes en los linfocitos T transfectados, de modo

que ahora parece posible producir linfocitos T genomodificados disponibles de donantes periódicamente, usando procedimientos convencionales.

Además, la presente divulgación propone una realización donde los linfocitos T se genomodifican para permitir la proliferación cuando se inactiva TCRalfa. Un problema importante con los linfocitos T que han experimentado inactivación de subunidades de TCR es que las células ya no pueden expandirse a través del complejo CD3. Para solucionar este problema, en el presente documento se describe un medio para expandir los linfocitos T, en que se ha inactivado TCRalfa a través del complejo CD3, mediante la expresión de preTalpha en las células, restableciendo, por tanto, un complejo CD3 funcional en ausencia de un TCR alfa/beta funcional.

De acuerdo con la invención, los linfocitos T se transforman adicionalmente con CAR para redirigir la especificidad de las células alogénicas hacia抗ígenos asociados con tumor independientes de MHC. En particular, la invención se refiere a un CAR multicatenario, en que se colocan dominios coestimuladoras en sus posiciones juxtamembranarias normales para mejorar sus funciones y así potenciar la supervivencia y aumentar la proliferación de linfocitos T genomodificados. Como resultado, la invención proporciona métodos, polipéptidos y polinucleótidos que permiten la transformación eficaz de linfocitos T alogénicos para inmunoterapia adoptiva, y su expansión simple.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención divulga métodos para genomodificar linfocitos T, en particular linfocitos T alogénicos que se pueden obtener de donantes, para que sean adecuados para fines de inmunoterapia. Los métodos de la presente invención más particularmente permiten la modificación precisa del genoma de células oportunas para inmunoterapia inactivando o remplazando genes implicados en el reconocimiento de MHC y/o proteínas del punto de control inmunitario. Las células modificadas oportunas para inmunoterapia comprenden además polinucleótidos recombinantes exógenos que codifican CAR para el reconocimiento celular específico. Los presentes CAR son moléculas de fusión simples que necesitan la adición en serie de dominios de señalización. Mover dominios de señalización desde su posición juxtamembranaria natural puede interferir con su función. Por tanto, para superar esta desventaja, los inventores diseñan un CAR multicatenario derivado de FcεRI para permitir la posición juxtamembranaria normal de todos los dominios de señalización pertinentes. El dominio de unión a IgE de alta afinidad de la cadena alfa de FcεRI se remplaza por un dominio de unión a ligando extracelular tal como scFv para redirigir la especificidad de los linfocitos T a células diana y las colas N y/o C terminales de la cadena beta de FcεRI se usan para colocar señales coestimuladoras en posiciones juxtamembranarias normales.

En otro aspecto de la divulgación, para promover la activación o estimulación de linfocitos T en que se ha inactivado TCRalfa, se introduce pTalpha o variante funcional del mismo en los linfocitos T genomodificados. El pTalpha o variante funcional del mismo usado puede ser pTalpha de longitud completa, una variante de corte y empalme (Saint-Ruf, Lechner *et al.* 1998), una versión truncada C terminal que ha demostrado aumentar la expresión en la superficie celular de preTCR (Carrasco, Ramiro *et al.* 2001). Podrían usarse otros truncamientos adicionales más pequeños o más grandes que los descritos. Diferentes versiones de preTalpha pueden comprender además restos de señalización de otras moléculas (CD28, CD137, CD8, TCRalfa, etc.) para promover la proliferación y supervivencia o comprender mutaciones que afecten a su capacidad de dimerizar, tales como las mutaciones D22A, R24A, R102A o R117A descritas previamente en ratones (Yamasaki, Ishikawa *et al.* 2006) o la mutación W46R descrita en seres humanos (Pang, Berry *et al.* 2010) para disminuir el potencial de proliferación. La parte scFv del CAR también puede fusionarse al dominio extracelular de un pTalpha o una variante funcional del mismo, acoplando, por tanto, la especificidad hacia los抗ígenos diana directamente con la actividad proliferativa del preTCR.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere los polipéptidos y los polinucleótidos, que codifican las endonucleasas de sitio de corte infrecuente, para abordar de forma precisa genes de interés, en particular TCRalfa, TCRbeta, genes del punto de control inmunitario, posibilitando de ese modo la modificación genética de los linfocitos T para inmunoterapia. La presente invención proporciona más particularmente secuencias diana específicas dentro de estos genes y nucleasas TALE diseñadas para abordar esos genes.

La presente divulgación también se refiere a las células aisladas o líneas celulares que comprenden alguna de las proteínas, polipéptidos o vectores descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, los linfocitos T de la presente divulgación comprenden TCRalfa inactivado, TCRbeta, genes del punto de control inmunitario para su uso en inmunoterapia. Las células aisladas de la presente divulgación o las líneas celulares pueden comprender además polinucleótidos recombinantes exógenos, en particular polinucleótidos que codifican pTalpha o variante funcional del mismo, CAR o CAR multicatenarios.

En una realización preferida de la divulgación, los linfocitos T modificados se usan como producto terapéutico, idealmente como un producto "disponible libremente".

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al método para tratar o prevenir el cáncer o infecciones en el paciente, administrando un linfocito T genomodificado que puede obtenerse por los métodos anteriores.

65

Breve descripción de las figuras y tablas

Además de las características precedentes, la divulgación comprende además otras características que surgirán de la descripción siguiente, así como los dibujos adjuntos. Una apreciación más completa de la divulgación y muchas de las ventajas consiguientes de la misma se obtendrá más fácilmente ya que esta se entiende mejor por referencia a las siguientes figuras junto con la descripción detallada.

5 **Figura 1:** Representación esquemática de la relación normal entre linfocitos T y células presentadoras de antígenos.

10 **Figura 2:** Representación esquemática de los linfocitos T terapéuticos modificados genéticamente y las células tumorales del paciente.

15 **Figura 3:** Representación esquemática de CAR multicatenarios.

20 **Figura 4:** Esquema de diferentes versiones de CAR multicatenarios. A. Esquema del receptor FcεRI. B-C Diferentes versiones de CAR multicatenarios (csm1 a csm10) que comprenden un scFv y una región de tallo de CD8 fusionada con el dominio transmembranario de la cadena alfa de FcεRI. Al menos un dominio zeta de 41BB, CD28 y/o CD3 puede fusionarse a una cadena alfa, beta y/o gamma de FcεRI.

25 **Figura 5:** Representación esquemática de un ejemplo del método de genomodificación de células alogénicas humanas para inmunoterapia

30 **Figura 6:** Concentración en células por mililitro de células CD52 positivas o CD52 negativas después de tratamiento con anticuerpo anti-CD52 (CAMPATH1-H) con complemento o controles.

35 **Figura 7:** Comparación de la distribución de dispersión frontal lateral (FSC), un indicador del tamaño celular, entre células TCR positivas y TCR negativas o entre células CD52 positivas y CD52 negativas y células no activadas como control.

40 **Figura 8:** Análisis de citometría de flujo de expresión de CD107a (marcador de desgranulación) en linfocitos T con CD52 y TCRalfa inactivados diana. La expresión de CD107 se analiza en células CD52+TCRαβ+ (primera columna), células CD52-TCRαβ- (segunda columna), células CD52-TCRαβ+ (tercera columna) y células CD52+TCRαβ- (cuarta columna) antes (A) y después de incubación con células Daudi (B); C) representa análisis de citometría de flujo de linfocitos T transfectados adicionalmente con un CAR e incubados con células Daudi; D) representa análisis de citometría de flujo de linfocitos T transfectados con un CAR, pero no incubados con células Daudi y E) representa análisis de citometría de flujo de linfocitos T transfectados con un CAR y tratados con PMA/ionomicina (control positivo).

45 **Figura 9:** Análisis de secuenciación profunda de posibles dianas inespecíficas de nucleasas TALE de CD52 y TRAC.

50 **Figura 10:** Análisis de locus genómico de PDCD1 y CTLA-4 mediante ensayo de endonucleasa T7. Las flechas apuntan a productos de PCR digeridos.

55 **Figura 11:** Representación esquemática de algunos ejemplos de construcciones preTalfa.

60 **Figura 12:** Análisis de citometría de flujo de la eficacia de transducción (% de células BFP+) y la actividad de las construcciones FL, Δ18, Δ48 pTalfa (% de expresión superficial de CD3) en células Jurkat con TCR alfa inactivado.

65 **Figura 13:** Representación esquemática de una construcción lentivírica que codifica proteína pTalfa (preTCRα).

65 **Figura 14:** A. Representación del protocolo experimental. B. Análisis de citometría de flujo de TCR alfa/beta, expresión de CD3 y expresión de BFP en linfocitos T con TCRalfa inactivado (KO) transducidos con BFP-2A-pTalfaΔ48 (KO/Δ48) o vector lentivírico de BFP de control (KO/BFP) antes y después de la purificación. C. Análisis de citometría de flujo de expresión de TCR alfa/beta y CD3 en células con TCR alfa inactivado purificadas transducidas (BFPpos) o no (BFPneg) con vector lentivírico BFP-2A-pTalfaΔ48. NEP representa células no electroporadas con nucleasas TALE de TRAC.

60 **Figura 15: A-B.** Análisis de citometría de flujo de la expresión de marcador de activación temprano CD69 (A), marcador de activación tardío CD25 (B) 24 y 48 horas después de reactivación con microesferas anti-CD3/CD28 respectivamente en células no electroporadas (NEP) y células con TCRalfa inactivado (KO) transducidas con vector lentivírico BFP-2A-pTα-Δ48 (pTα-Δ48), vector lentivírico BFP-2A-pTα-A48.41BB (pTα-A48.BB) o vector de BFP de control (BFP). Los histogramas de pTα-Δ48 corresponden a la señal detectada en células con TCR inactivado que expresan pTα-Δ48 (células BFP+) mientras que los histogramas de KO corresponden a células con TCRalfa inactivado que no expresan pTα-Δ48 (células BFP-) Los histogramas de pTα-Δ48.BB corresponden a la señal detectada en células con TCR inactivado que expresan pTα-Δ48.41BB (células BFP+) mientras que los

histogramas de KO corresponden a células con TCRalfa inactivado que no expresan pTa-Δ48.41BB (células BFP-). Los histogramas de NEP (no electroporado) corresponden a la señal detectada en células no genomodificadas. C. Análisis de citometría de flujo del tamaño de las células 72 horas después de la reactivación con microesferas anti-CD3/CD28 en células no electroporadas (NEP) y células con TCRalfa inactivado (KO) transducidas con vector lentivírico BFP-2A-pTa-Δ48 (pTa-A48), vector lentivírico BFP-2A-pTa-Δ48.41BB (pTa-Δ48.BB) o vector de BFP de control (BFP). Los valores indicados en la parte superior de cada gráfico corresponden a la media geométrica de la fluorescencia de cada población.

Figura 16: Análisis de crecimiento celular de células con TCR alfa inactivado (KO) transducidas con vector pTalpha-Δ48 (pTaΔ48) o de BFP de control (BFP) mantenidas en IL2 o en IL2 con microesferas anti-CD3/CD28 en diferentes puntos temporales (eje de abscisas). El número de células BFP+ se estima en diferentes puntos temporales para cada condición y el factor de inducción de estas células (eje de ordenadas) se estimó con respecto al valor obtenido el día 2 después de la reactivación. Los resultados se obtienen de dos donantes independientes. Para el segundo donante, el crecimiento celular también se determinó para células transducidas con pTalpha-Δ48.41BB (pTa-Δ48.BB) y pTalpha de longitud completa (pTa-FL).

Figura 17: Análisis de citometría de flujo de células GFP positivas en PBMC electroporados con los cinco programas de Cytopulse diferentes. La línea superior corresponde a la transfección de 6×10^6 células por cubeta, mientras que la línea inferior corresponde a la transfección de 3×10^6 células por cubeta.

Figura 18: Análisis de citometría de flujo de mortalidad de linfocitos T purificados usando colorante de viabilidad (eFluor-450) y de células GFP positivas entre la población viable después de electroporación con ARNm de GFP, ADN de GFP y ADN de pUC de control. NEP corresponde a células que se mantuvieron en tampón de electroporación, pero no se electroporaron y NT corresponde a células no electroporadas mantenidas en medio de cultivo.

Figura 19: Análisis de citometría de flujo de TCR alfa/beta y expresión de CD3 en linfocitos T primarios humanos después de electroporación de ARNm de nucleasa TALE de TRAC (parte superior). Análisis de secuenciación profunda de ADN genómico extraído de linfocitos T primarios humanos después de electroporación de ARNm de nucleasa TALE de TRAC (parte inferior).

Figura 20: A. Análisis de citometría de flujo de la expresión de CAR (anti F(ab')2) después de electroporación de linfocitos T con o sin ARNm que codifica un CAR monocatenario. B. Análisis de citometría de flujo de expresión de CD107a (marcador de desgranulación) en linfocitos T electroporados cocultivados con células Daudi.

Figura 21: A. Representación de ARNm que codifica un CAR multicatenario. B. Análisis de citometría de flujo de expresión de CAR (anti F(ab')2) en linfocitos T viables electroporados con o sin un ARNm policistrónico que codifica un CAR multicatenario. C. Análisis de citometría de flujo de expresión de CD107a (marcador de desgranulación) en linfocitos T electroporados cocultivados con células Daudi.

Figura 22: Expresión de CAR multicatenarios en linfocitos T humanos después de electroporación de ARNm policistrónicos.

Figura 23: La expresión de los CAR multisubunitarios está condicionada por la expresión de las tres cadenas: α , β y γ .

Figura 24: Los linfocitos T humanos que expresan transitoriamente los CAR multicatenarios se desgranulan después del cocultivo con células diana. A: construcciones de CAR csm1 a csm5. B: construcciones de CAR csm6 a csm10.

Figura 25: Los linfocitos T humanos que expresan transitoriamente los CAR multicatenarios secretan citocinas después del cocultivo con células diana (linfocitos T frente a células Daudi o K562). A: liberación de IL8. B: liberación de IFN γ . C: liberación de IL5.

Figura 26: Los linfocitos T humanos que expresan transitoriamente los CAR multicatenarios (construcciones csm1 a csm10) lisán células diana.

Figura 27: Inactivación de CTLA4 en linfocitos T primarios, medida por tinción intracelular usando anticuerpo fluorescente y análisis de citometría de flujo.

Figura 28: Distribución de linfocitos T fluorescentes que expresan CTLA4 tras la transfección con las TALEN T1, T2 y T3. La proporción de células que expresan CTLA4 se reduce drásticamente con respecto a las células de control.

Figura 29: Inactivación de PD1 en linfocitos T primarios, medida por tinción intracelular usando anticuerpo fluorescente y análisis de citometría de flujo. La proporción de células que expresan PD1 se reduce drásticamente

con respecto a las células de control.

Figura 30: Diagrama que muestra las frecuencias de delección observadas en linfocitos T tras la transfección con las TALEN T01 y T03 dirigidas al gen PD1.

Figura 31: Diagrama que muestra que la actividad citotóxica se potencia en linfocitos T con PD1 alterado según el experimento descrito en el ejemplo 3.

Tabla 1: Lista de genes del punto de control inmunitario identificados por los inventores como apropiados para hacer que los linfocitos T alogénicos sean más activos para inmunoterapia.

Tabla 2: Descripción de las nucleasas TALE de GR y secuencias de los sitios diana de nucleasas TALE en el gen de GR humano.

Tabla 3: Actividad de escisión de las nucleasas TALE de GR en levadura. Los valores están comprendidos entre 0 y 1. El valor máximo es 1.

Tabla 4: Porcentaje de mutagénesis dirigida en sitios diana de nucleasa TALE endógenos en células 293.

Tabla 5: Porcentaje de mutagénesis dirigida en sitios diana de nucleasa TALE endógenos en linfocitos T primarios.

Tabla 6: Descripción de las nucleasas TALE de CD52, TRAC y TRBC y secuencias de los sitios diana de las nucleasas TALE en los genes correspondientes humanos.

Tabla 7: Secuencias diana adicionales para nucleasas TALE de TRAC y CD52.

Tabla 8: Porcentaje de indeles para la nucleasa TALE dirigida a la diana CD52_T02, TRAC_T01, TRBC_T01 y TRBC_T02.

Tabla 9: Porcentajes de linfocitos T CD52 negativos, TCR negativos y CD52/TCR doble negativos después de transfección de polinucleótidos que expresan nucleasa TALE correspondientes.

Tabla 10: Porcentajes de linfocitos T TCR negativos después de transfección de polinucleótidos que expresan nucleasa TALE de TRBC.

Tabla 11: Descripción de las nucleasas TALE de CTLA4 y PDCD1 y secuencias de los sitios diana de las nucleasas TALE en los genes correspondientes humanos.

Tabla 12: Descripción de un subconjunto de construcciones pTalfa.

Tabla 13: Actividad de las diferentes construcciones pTalfa en células Jurkat con TCR alfa inactivado. Se midió la actividad por análisis de citometría de flujo de expresión de CD3 en células Jurkat con TCR alfa inactivado transfectadas con las construcciones pTalfa diferentes.

Tabla 14: Programas de Cytopulse diferentes usados para determinar la tensión mínima necesaria para electroporación en linfocitos T procedentes de PBMC.

Tabla 15: Programa de Cytopulse usado para electroporar linfocitos T purificados.

50 Descripción detallada de la invención

Salvo que se defina específicamente en este documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia en los campos de la terapia génica, bioquímica, genética y biología molecular.

Todos los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, con métodos y materiales adecuados que se describen en este documento. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes, a menos que se especifique de otra manera.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia en la materia. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera edición, (Sambrook *et al*, 2001, Cold

Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis *et al.* patente de Estados Unidos n.º 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries y S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); la serie, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson y M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., Nueva York), específicamente, los vol.154 y 155 (Wu *et al.* eds.) y el vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); y 10 Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

En un aspecto general, la presente invención se refiere a métodos para nuevas estrategias de inmunoterapia adoptiva en el tratamiento del cáncer e infecciones.

15 Linfocitos T no alorreactivo y altamente activos para inmunoterapia

En un aspecto particular, la presente divulgación se refiere a un método para genomodificar linfocitos T, especialmente para inmunoterapia. En una realización particular, el método comprende:

- 20 (a) proporcionar un linfocito T,
 (b) introducir en dicho linfocito T una endonucleasa de sitio de corte infrecuente que pueda inactivar selectivamente por escisión de ADN un gen del punto de control inmunitario; y
 25 (c) expandir dichas células.

De acuerdo con la invención, este método comprende:

- 30 (a) modificar linfocitos T inactivando al menos:
 - un primer gen que codifica una proteína del punto de control inmunitario, seleccionado entre PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10 y 2B4, y
 - un segundo gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR);
 35 (b) introducir en dicha uno o más linfocitos T un receptor químérico de antígenos (CAR); y
 (c) expandir dichas células.

40 La inmunidad mediada por linfocitos T incluye múltiples etapas secuenciales que implican la selección clonal de células específicas de antígeno, su activación y proliferación en tejido linfoide secundario, su transporte a sitios de antígeno e inflamación, la ejecución de función efectora directa y el aporte de ayuda (a través de citocinas y ligandos de membrana) para una multitud de inmunocitos efectores. Cada una de estas etapas se regula contraequilibrando la señal estimulante e inhibidora que ajusta la respuesta. Los expertos en la materia entenderán, que la expresión "puntos de control inmunitario" significa un grupo de moléculas expresadas por linfocitos T. Estas moléculas pueden actuar eficazmente como "frenos" para modular por disminución o inhibir una respuesta inmunitaria. Las moléculas del punto de control inmunitario incluyen, aunque sin limitación, muerte programada 1 (PD-1, también conocida como PDCD1 o CD279, número de referencia: NM_005018), antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, también conocido como CD152, número de referencia de GenBank AF414120.1), LAG3 (también conocido como CD223, número de referencia: NM_002286.5), Tim3 (también conocido como HAVCR2, número de referencia de GenBank: JX049979.1), BTLA (también conocido como CD272, número de referencia: NM_181780.3), BY55 (también conocido como CD160, número de referencia de GenBank: CR541888.1), TIGIT (también conocido como VSTM3, número de referencia: NM_173799), B7H5 (también conocido como C10orf54, homólogo del gen vista de ratón, número de referencia: NM_022153.1), LAIR1 (también conocido como CD305, número de referencia de GenBank: CR542051.1), SIGLEC10 (número de referencia de GeneBank: AY358337.1), 2B4 (también conocido como CD244, número de referencia: NM_001166664.1), que inhiben directamente los inmunocitos. Por ejemplo, CTLA-4 es una proteína de superficie celular expresada en determinados linfocitos T CD4 y CD8; cuando se ocupa por sus ligandos (B7-1 y B7-2) en células presentadoras de antígeno, se inhiben la activación y función efectora de los linfocitos T. Por tanto, la presente invención se refiere a un método de genomodificación de linfocitos T, especialmente para inmunoterapia, que comprende modificar genéticamente los linfocitos T inactivando al menos una proteína implicada en el punto de control inmunitario, en particular PD1 y/o CTLA-4.

65 En una realización particular, la etapa de modificación genética del método se basa en la inactivación de dos genes seleccionados del grupo que consiste en PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR alfa y TCR beta. En otra realización, la etapa de modificación genética del método se basa en la inactivación de dos genes seleccionados del grupo que consiste en PD1 y TCR alfa, PD1 y TCR beta, CTLA-4 y TCR alfa, CTLA-

4 y TCR beta, LAG3 y TCR alfa, LAG3 y TCR beta, Tim3 y TCR alfa, Tim3 y TCR beta, BTLA y TCR alfa, BTLA y TCR beta, BY55 y TCR alfa, BY55 y TCR beta, TIGIT y TCR alfa, TIGIT y TCR beta, B7H5 y TCR alfa, B7H5 y TCR beta, LAIR1 y TCR alfa, LAIR1 y TCR beta, SIGLEC10 y TCR alfa, SIGLEC10 y TCR beta, 2B4 y TCR alfa, 2B4 y TCR beta. En otra realización de la divulgación, la etapa de modificación genética del método se basa en la inactivación de más de dos genes. La modificación genética se realiza preferentemente *ex vivo*.

la tabla 1 posterior, sin ser exhaustivo, muestra genes del punto de control inmunitario que pueden inactivarse de acuerdo con el contenido del presente texto para mejorar la eficacia e idoneidad de los linfocitos T genomodificados. El gen del punto de control inmunitario se selecciona preferentemente de los genes que tienen identidad con los enumerados en esta tabla, implicados en la función de receptor coinhididor, muerte celular, señalización de citocinas, falta de triptófano y arginina, señalización del TCR, represión inducida de T-reg, factores de transcripción que controlan el agotamiento o la anergia y tolerancia mediada por hipoxia.

Tabla 1: Genes del punto de control inmunitario apropiados para hacer que los linfocitos T alogénicos sean más activos para inmunoterapia

<u>Ruta</u>	<u>Genes que pueden inactivarse en la ruta</u>	<u>ID del gen de la base de datos del NCBI (<i>Homo sapiens</i>) el 13 de mayo, 2014</u>
Receptores coinhididores	LAG3 (CD223)	3902
	HAVCR2 (TIM3)	84868
	BTLA (CD272)	151888
	CD160 (NK1)	11126
	TIGIT (VSIG9)	201633
	CD96 (TACTILE)	10225
	CRTAM (CD355)	56253
	LAIR1 (CD305)	3903
	SIGLEC7 (CD328)	27036
	A2A (IGKV2-29)	28882
	SIGLEC9 (CD329)	27180
	CD244 (2B4))	51744
	TNFRSF10B (CD262)	8795
	TNFRSF10A (CD261)	8797
Muerte celular	CASP3	836
	CASP6	839
	CASP7	840
	CASP8	841
	CASP10	843
	Arhgap5 (GFI2)	394
	Akap8i	10270
	FADD (GIG3)	8772
	FAS(RP11)	355
	Stk17b (DRAK2)	9262
	TGFBRII (AAT3)	7048
	TGFBRI	7046
Señalización de citocinas	SMAD2 (JV18)	4087
	SMAD3	4088
	SMAD4	4089
	SMAD10 (SMAD7)	394331
	SKI (SGS)	6497
	SKIL (SNO)	6498
	TGIF1 (HPE4)	7050
	IL10RA (CD210)	3587
	IL10RB	3588
	HMOX2 (HO-2)	3163
	Jun (AP1)	3725

(continuación)

<u>Ruta</u>	<u>Genes que pueden inactivarse en la ruta</u>	<u>ID del gen de la base de datos del NCBI (<i>Homo sapiens</i>) el 13 de mayo, 2014</u>
	Ppp3cc	5533
	Ppm1g	5496
	Socs1	8651
	Soc3	9021
	IL6R (CD126)	3570
	IL6ST (CD130)	3572
	Lck	3932
	Fyn	2534
	ADAP (FYB)	2533
	Carmal (CARD11)	84433
	Bcl10	8915
	Malt1 (IMD12)	10892
	TAK1(NR2C2)	7182
Falta de arginina/triptófano	EIF2AK4 (GCN2)	440275
	Nuak2	81788
Señalización del TCR	CSK	1445
	PAG1 (CBP)	55824
	SIT1	27240
	CRTAM (CD355)	56253
	Egr2 (AT591)	1959
	DGK-a (DAGK)	1606
	DGK-z	8525
	Cblb	868
	Inpp5b	3633
	Ptpn2 (PTN2)	5771
	Vamp7	6845
	Mast2	23139
	tnk1	8711
	stk17b (DRAK2)	9262
	Mdfic (HIC)	29969
	F11r (CD321)	50848
	FOXP3 (JM2)	50943
Treg inducida	Entpd1 (CD39)	953
	PRDM1 (blimp1)	12142
Factores de transcripción que controlan el agotamiento/anergia	BATF	10538
	Ypel2	388403
	Ppp2r2d	55844
	Rock1	6093
	Sbf1	6305
	Hipk1 (MYAK)	204851
	Map3k3	4215
	Grk6	2870
	Eif2ak3 (PEK)	9451
	Fyn	2534
	NFAT1(NFATC2)	4773
	GUCY1A2	2977
	GUCY1A3	2982
Tolerancia mediada por hipoxia	GUCY1B2	2974
	GUCY1B3	2983

Al inactivar un se pretende que el gen de interés no se exprese en una forma proteínica funcional. En una realización particular, la modificación genética del método se basa en la expresión, en células proporcionadas para modificación por ingeniería, de una endonucleasa de sitio de corte infrecuente de modo que dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente catalice específicamente la escisión en un gen diana, inactivando de ese modo dicho gen diana. Las roturas de la hebra de ácido nucleico causadas por la endonucleasa de sitio de corte infrecuente se reparan habitualmente a

través de los distintos mecanismos de recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos (NHEJ). Sin embargo, la NHEJ es un proceso de reparación imperfecto que a menudo da como resultado cambios en la secuencia de ADN en el sitio de la escisión. Los mecanismos implican volver a unir lo que queda de los dos extremos de ADN a través de religamiento directo (Critchlow y Jackson 1998) o mediante la denominada unión de extremos mediada por

5 microhomología (Ma, Kim *et al.*, 2003). La reparación mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) a menudo da como resultado pequeñas inserciones o delecciones, y se puede usar para la creación de supresiones génicas específicas. Dicha modificación puede ser una sustitución, delección o adición de al menos un nucleótido. Las células en las que se produce un evento de mutagénesis inducida por escisión, es decir, un evento de mutagénesis consecutivo a un evento de NHEJ, pueden identificarse y/o seleccionarse mediante un método bien conocido en la

10 técnica.

En una realización particular, dicho método para genomodificar células comprende al menos una de las siguientes etapas:

- 15 (a) proporcionar un linfocito T, preferentemente de un cultivo celular o de una muestra de sangre;
- (b) introducir en dicho linfocito T una endonucleasa de sitio de corte infrecuente que pueda inactivar selectivamente por escisión de ADN, preferentemente por rotura bicatenaria, respectivamente:
- 20 - dicho gen que codifica una proteína del punto de control inmunitario, y
 - al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR).
- (c) expandir dichas células.

25 En una realización más preferida, dicho método comprende:

- (a) proporcionar un linfocito T, preferentemente de un cultivo celular o de una muestra de sangre;
- (b) transformar dicho linfocito T con ácido nucleico que codifica una endonucleasa de sitio de corte infrecuente que pueda inactivar selectivamente por escisión de ADN, preferentemente por rotura bicatenaria, respectivamente:
- 30 - dicho gen que codifica una proteína del punto de control inmunitario y
 - al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR)
- (c) expresar dichas endonucleasas de sitio de corte infrecuente en dichos linfocitos T;
- (d) clasificar los linfocitos T transformados, que no expresan TCR en su superficie celular;
- (e) expandir dichas células.

40 En una realización particular, dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente aborda específicamente un gen seleccionado del grupo que consiste: PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR alfa y TCR beta. En otra realización, la modificación genética del método se basa en la expresión, en células proporcionadas para modificación por ingeniería, de dos endonucleasas de sitio de corte infrecuente, de modo que cada una de dichas dos endonucleasas de sitio de corte infrecuente, catalice específica y selectivamente la escisión en cada uno de los pares de genes seleccionados del grupo que consiste en PD1 y TCR alfa, PD1 y TCR beta, CTLA-4 y TCR alfa, CTLA-4 y TCR beta, LAG3 y TCR alfa, LAG3 y TCR beta, Tim3 y TCR alfa, Tim3 y TCR beta, BTLA y TCR alfa, BTLA y TCR beta, BY55 y TCR alfa, BY55 y TCR beta, TIGIT y TCR alfa, TIGIT y TCR beta, B7H5 y TCR alfa, B7H5 y TCR beta, LAIR1 y TCR alfa, LAIR1 y TCR beta, SIGLEC10 y TCR alfa, SIGLEC10 y TCR beta, 2B4 y TCR alfa, 2B4 y TCR beta, inactivando de ese modo dichos genes diana. En otra realización de la divulgación, pueden expresarse más de dos endonucleasas de sitio de corte infrecuente en las células de genomodificar para manipular de forma dirigida y/o inactivar más de dos genes.

55 En otra realización de la divulgación, dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente puede ser una meganucleasa, una nucleasa de dedos de cinc o una nucleasa TALE. En una realización preferida, dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente es una nucleasa TALE. Por nucleasa TALE se pretende una proteína de fusión que consiste en un dominio de unión a ADN derivado de un efector de tipo activador de la transcripción (TALE) y un dominio catalítico de nucleasa para escindir una secuencia diana de ácido nucleico. (Boch, Scholze *et al.* 2009; Moscou y Bogdanove 2009; Christian, Cermak *et al.* 2010; Cermak, Doyle *et al.* 2011; Geissler, Scholze *et al.* 2011; Huang, Xiao *et al.* 2011; Li, Huang *et al.* 2011; Mahfouz, Li *et al.* 2011; Miller, Tan *et al.* 2011; Morbitzer, Romer *et al.* 2011; Mussolino, Morbitzer *et al.* 2011; Sander, Cade *et al.* 2011; Tesson, Usal *et al.* 2011; Weber, Gruetzner *et al.* 2011; Zhang, Cong *et al.* 2011; Deng, Yan *et al.* 2012; Li, Piatek *et al.* 2012; Mahfouz, Li *et al.* 2012; Mak, Bradley *et al.* 2012).

60 En la presente divulgación, se han diseñado nuevas nucleasas TALE para manipulación dirigida precisa de genes pertinentes para estrategias de inmunoterapia adoptiva. Las nucleasas TALE preferidas de acuerdo con la invención son las que reconocen y escinden la secuencia diana seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 77 y SEQ

ID NO: 78 (PD1), SEQ ID NO: 74 a SEQ ID NO: 76 (CTLA-4), SEQ ID NO: 37, 57 a 60 (TCRalfa), SEQ ID NO: 38 o 39 (TCRbeta). La presente divulgación también se refiere a polipéptidos de nucleasa TALE que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 79 a SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 41 a 46.

5 La presente divulgación también se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente, al menos un 90 %, un 95 %, 97 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 79 a SEQ ID NO: 88. También se describen en el presente documento, polinucleótidos, vectores que codifican 10 las endonucleasas de sitio de corte infrecuente descritas anteriormente. Este método puede asociarse con uno cualquiera de los diferentes métodos descritos en la presente divulgación.

En otra realización de la divulgación, puede introducirse además un dominio catalítico adicional en la célula con dicha 15 endonucleasa de sitio de corte infrecuente para aumentar la mutagénesis para potenciar su capacidad de inactivar genes diana. En particular, dicho dominio catalítico adicional es una enzima que procesa extremos de ADN. Ejemplos no limitantes de enzimas que procesan extremos de ADN incluyen exonucleasas 5-3', exonucleasas 3-5', exonucleasas alcalinas 5-3', endonucleasas de solapa 5', helicasas, fosfatasa, hidrolasas y ADN polimerasas 20 independientes de molde. Ejemplos no limitantes de dicho dominio catalítico comprenden un dominio proteínico o derivado catalíticamente activo del dominio proteínico seleccionado del grupo que consiste en hExol (EXO1_HUMANO), Exol de levadura (EXO1LEVADURA), Exol de *E. coli*, TREX2 humano, TREX1 de ratón, TREX1 humano, TREX1 bovino, TREX1 de rata, TdT (transferasa de desoxinucleotídeo terminal), DNA2 humano, DNA2 de levadura (DNA2LEVADURA). En una realización preferida de la divulgación, dicho dominio catalítico adicional tiene 25 una actividad 3'-5'-exonucleasa, y en una realización más preferida, dicho dominio catalítico adicional es TREX, más preferentemente dominio catalítico TREX2 (documento WO2012/058458). En otra realización preferida de la divulgación, dicho dominio catalítico está codificado por un polipéptido TREX monocatenario (documento WO2013/009525). Dicho dominio catalítico adicional puede fusionarse a una proteína de fusión de nucleasa o proteína químérica opcionalmente mediante un conector peptídico.

30 Se sabe que las roturas endonucleolíticas estimulan la tasa de recombinación homóloga. Por tanto, en otra realización de la divulgación, la etapa de modificación genética del método comprende además una etapa de introducción en células de un ácido nucleico exógeno que comprende al menos una secuencia homóloga a una parte de la secuencia de ácido nucleico diana, de modo que se produzca recombinación homóloga entre la secuencia de ácido nucleico diana y el ácido nucleico exógeno. En realizaciones particulares, dicho ácido nucleico exógeno comprende una primera 35 y segunda parte que son homólogas a la región 5' y 3' de la secuencia de ácido nucleico diana, respectivamente. Dicho ácido nucleico exógeno en estas realizaciones también comprende una tercera parte ubicada entre la primera y la segunda parte, que no comprende homología con las regiones 5' y 3' de la secuencia de ácido nucleico diana. Después de la escisión de la secuencia de ácido nucleico diana, se estimula un evento de recombinación homóloga entre la secuencia de ácido nucleico diana y el ácido nucleico exógeno. Preferentemente, secuencias homólogas de al menos 50 pb, preferentemente más de 100 pb y más preferentemente más de 200 pb se usan dentro de dicha matriz donante. 40 Por lo tanto, el ácido nucleico exógeno se preferentemente de 200 pb a 6000 pb, más preferentemente de 1000 pb a 2000 pb. De hecho, las homologías de ácido nucleico compartidas ubicadas en regiones flanqueantes en dirección 3' y en dirección 5' del sitio de la rotura y la secuencia de ácido nucleico a introducir deben estar ubicadas entre los dos brazos.

45 En particular, dicho ácido nucleico exógeno comprende sucesivamente una primera región de homología con secuencias en dirección 5' de dicha escisión, una secuencia para inactivar un gen diana seleccionado del grupo que consiste en genes del punto de control inmunitario, TCR alfa y TCR beta y una segunda región de homología con secuencias en dirección 3' de la escisión. Dicha etapa de introducción de polinucleótido puede ser simultánea, antes o después de la introducción o expresión de dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente. Dependiendo de la ubicación de la secuencia de ácido nucleico diana en la que se ha producido el evento de rotura, dicho ácido nucleico exógeno puede usarse para suprimir un gen, por ejemplo, cuando el ácido nucleico exógeno está ubicado dentro de la pauta abierta de lectura de dicho gen, o para introducir nuevas secuencias o genes de interés. Pueden usarse inserciones de secuencia usando dicho ácido nucleico exógeno para modificar un gen existente diana, mediante corrección o remplazo de dicho gen (permutación de alelos como ejemplo no limitante), o para regular por aumento o 50 por disminución la expresión del gen diana (permutación de promotores como ejemplo no limitante), corrección o remplazo de dicho gen diana. En una realización preferida, la inactivación de genes del grupo que consiste en genes del punto de control inmunitario, TCR alfa y TCR beta puede hacerse en una ubicación genómica precisa dirigida por una nucleasa TALE específica, en la que dicha nucleasa TALE específica cataliza una escisión y en la que dicho ácido nucleico exógeno comprende sucesivamente al menos una región de homología y una secuencia para inactivar un 55 gen diana seleccionado del grupo que consiste en genes del punto de control inmunitario, TCR alfa y TCR beta, que se integra por recombinación homóloga. En otra realización de la divulgación, varios genes pueden inactivarse, sucesivamente o al mismo tiempo, usando varias nucleasas TALE respectivamente y que abordan específicamente un gen definido y varios polinucleótidos específicos para inactivación génica específica.

60 65 Por etapa de modificación genómica adicional, puede pretenderse también la inactivación de otro gen seleccionado del grupo que consiste en genes del punto de control inmunitario, TCR alfa y TCR beta. Como se menciona

anteriormente, dicha etapa de modificación genómica adicional puede ser una etapa de inactivación, que comprende:

5 (a) introducir en dichas células al menos una nucleasa de sitio de corte infrecuente de modo que la endonucleasa de sitio de corte infrecuente catalice específicamente la escisión en una secuencia diana del genoma de dicha célula.

10 (b) opcionalmente introducir en dichas células un ácido nucleico exógeno que comprende sucesivamente una primera región de homología con secuencias en dirección 5' de dicha escisión, una secuencia a insertar en el genoma de dicha célula y una segunda región de homología con secuencias en dirección 3' de dicha escisión,

15 en la que dicho ácido nucleico exógeno introducido inactiva un gen e integra a menos una secuencia polinucleotídica exógena que codifica al menos una proteína recombinante de interés. En otra realización de la divulgación, dicha secuencia polinucleotídica exógena se integra dentro de un gen seleccionado del grupo que consiste en genes del punto de control inmunitario, TCR alfa y TCR beta.

15 15 En una realización particular de la divulgación, dicho método para genomodificar células comprende además una etapa de modificación genómica adicional. Por etapa de modificación genómica adicional, puede pretenderse la introducción en células a genomodificar de una proteína de interés. Dicha proteína de interés puede ser, como ejemplos no limitantes, pTalfa o variante funcional de la misma, un receptor quimérico de antígenos (CAR), un CAR

20 multicatenario, un anticuerpo biespecífico como se describe en la presente divulgación. Dicho método para genomodificar células también puede comprender además la introducción de una endonucleasa de sitio de corte infrecuente que pueda inactivar selectivamente por escisión de ADN un gen que codifica una diana para dicho agente inmunosupresor como se describe en la presente divulgación.

25 La divulgación también se refiere a nucleasas TALE. En general, la divulgación se refiere a una nucleasa TALE que comprende:

30 (a) un dominio de unión a ADN de efecto de tipo activador de la transcripción (TALE) que se ha genomodificado para que se una a una secuencia diana dentro de genes seleccionados del grupo que consiste en genes del punto de control inmunitario, TCR alfa y TCR beta;

35 (b) un dominio de escisión o un semidominio de escisión.

35 Las nucleasas TALE preferidas de acuerdo con la divulgación son las que reconocen y escinden la secuencia diana seleccionada del grupo que consiste en:

- SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78 (PD1)
- SEQ ID NO: 74 a SEQ ID NO: 76 (CTLA-4),
- 40 - SEQ ID NO: 37, 57 a 60 (TCRalpha), y
- SEQ ID NO: 38 o 39 (TCRbeta),

45 Dichas nucleasas TALE comprenden preferentemente una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 79 a SEQ ID NO: 88 para escindir la diana respectiva SEQ ID NO: 74 a 78 y SEQ ID NO: 41 a SEQ ID NO: 46, para escindir las secuencias diana respectivas SEQ ID NO: 37 a 39.

50 Como puede surgir algo de variabilidad a partir de los datos genómicos de los que derivan estos polipéptidos, y también para tener en cuenta la posibilidad de sustituir algunos de los aminoácidos presentes en estos polipéptidos sin pérdida importante de actividad (variantes funcionales), también se describen variantes polipeptídicas de los polipéptidos anteriores, que comparten al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 % e incluso más preferentemente al menos un 95 % de identidad con las secuencias proporcionadas en el presente documento.

55 La presente divulgación, por tanto, se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente, al menos un 90 %, un 95 %, 97 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 79 a SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 41 a SEQ ID NO: 46.

60 También están comprendidos en el alcance de la presente divulgación, polinucleótidos, vectores que codifican las endonucleasas de sitio de corte infrecuente descritas anteriormente.

65 En el alcance de la presente divulgación, también se engloban células aisladas o líneas celulares susceptibles de obtenerse mediante dicho método para genomodificar células, en particular linfocitos T, en que al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en genes del punto de control inmunitario, preferentemente seleccionado del

grupo de: PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR alfa y TCR beta se ha inactivado. Preferentemente, dos genes seleccionados del grupo que consiste en: PD1 y TCR alfa, PD1 y TCR beta, CTLA-4 y TCR alfa, CTLA-4 y TCR beta, LAG3 y TCR alfa, LAG3 y TCR beta, Tim3 y TCR alfa, Tim3 y TCR beta, BTLA y TCR alfa, BTLA y TCR beta, BY55 y TCR alfa, BY55 y TCR beta, TIGIT y TCR alfa, TIGIT y TCR beta, B7H5 y TCR alfa, B7H5 y TCR beta, LAIR1 y TCR alfa, LAIR1 y TCR beta, SIGLEC10 y TCR alfa, SIGLEC10 y TCR beta, 2B4 y TCR alfa, 2B4 y TCR beta se han inactivado.

De acuerdo con la divulgación, esos genes se inactivan preferentemente por al menos una endonucleasa de sitio de corte infrecuente. Los inventores han demostrado que el uso de nucleasas TALE era particularmente ventajoso para conseguir inactivación doble en linfocitos T. La divulgación abarca un linfocito T aislado que comprende al menos dos polinucleótidos, codificando dichos polinucleótidos al menos una primera y segunda nucleasa TALE, preferentemente estando la primera nucleasa TALE dirigida contra un gen que codifica TCR y estando la segunda dirigida contra un gen que codifica una proteína del punto de control inmunitario, tal como PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4. En otra realización de la divulgación, dicha célula aislada comprende además una modificación genómica adicional. En otra realización, de la divulgación dicha modificación genómica adicional es la integración de al menos una secuencia polinucleotídica exógena. En otra realización, dicha secuencia exógena se integra en un gen seleccionado del grupo que consiste en PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR alfa y TCR beta.

20 Linfocitos T no alorreactivos y resistentes a inmunosupresión:

En un aspecto particular de la divulgación, la presente invención se refiere a un método de genomodificación de linfocitos T, especialmente para inmunoterapia. En particular, este método comprende:

25 (a) modificar linfocitos T inactivando al menos:

- un primer gen que expresa una diana para un agente inmunosupresor, y
- un segundo gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR) (b) expandir dichas células, 30 opcionalmente en presencia de dicho agente inmunosupresor.

Un agente inmunosupresor es un agente que suprime la función inmunitaria por uno de varios mecanismos de acción. En otras palabras, un agente inmunosupresor es una función desempeñada por un compuesto, que se muestra por una capacidad de disminuir el grado y/o voracidad de una respuesta inmunitaria. Como ejemplo no limitante, un agente inmunosupresor puede ser un inhibidor de calcineurina, una diana de rapamicina, un bloqueante de cadena α de interleucina-2, un inhibidor de la monofosfato de inosina deshidrogenasa, un inhibidor de la ácido dihidrofólico reductasa, un corticoesteroide o un antimetabolito inmunosupresor. Los inmunosupresores citotóxicos clásicos actúan inhibiendo la síntesis de ADN. Otros pueden actuar a través de la activación de linfocitos T o inhibiendo la activación de células auxiliares. El método de acuerdo con la divulgación permite conferir resistencia inmunosupresora a los linfocitos T para inmunoterapia inactivando la diana del agente inmunosupresor en linfocitos T. Como ejemplos no limitantes, las dianas para un agente inmunosupresor pueden ser un receptor para un agente inmunosupresor tal como: CD52, receptor de glucocorticoesteroides (GR), un miembro de la familia de FKBP y un miembro génico de la familia de ciclofilina.

45 En una realización particular de la divulgación, la etapa de modificación genética del método se basa en la inactivación de un gen seleccionado del grupo que consiste en CD52, GR, TCR alfa y TCR beta. En otra realización de la divulgación, la etapa de modificación genética del método se basa en la inactivación de dos genes seleccionados del grupo que consiste en CD52 y GR, CD52 y TCR alfa, CDR52 y TCR beta, GR y TCR alfa, GR y TCR beta, TCR alfa y TCR beta. En otra realización de la divulgación, la etapa de modificación genética del método se basa en la inactivación de más de dos genes. La modificación genética se realiza preferentemente ex vivo.

Al inactivar un se pretende que el gen de interés no se exprese en una forma proteínica funcional. En una realización particular de la divulgación, la modificación genética del método se basa en la expresión, en células proporcionadas para modificación por ingeniería, de una endonucleasa de sitio de corte infrecuente de modo que dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente catalice específicamente la escisión en un gen diana, inactivando de ese modo dicho gen diana. En una realización particular de la divulgación, dicho método para genomodificar células comprende al menos una de las siguientes etapas:

- (a) proporcionar un linfocito T, preferentemente de un cultivo celular o de una muestra de sangre;
- 60 (b) seleccionar un gen en dicho linfocito T que expresa una diana para un agente inmunosupresor;
- (c) introducir en dicho linfocito T una endonucleasa de sitio de corte infrecuente que pueda inactivar selectivamente por escisión de ADN, preferentemente por rotura bicatenaria, respectivamente:
- 65 - dicho gen que codifica una diana para dicho agente inmunosupresor, y

- al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR).
- (d) expandir dichas células, opcionalmente en presencia de dicho agente inmunosupresor.

5 En una realización más preferida de la divulgación, dicho método comprende:

- (a) proporcionar un linfocito T, preferentemente de un cultivo celular o de una muestra de sangre;
- (b) seleccionar un gen en dicho linfocito T que expresa una diana para un agente inmunosupresor;
- (c) transformar dicho linfocito T con ácido nucleico que codifica una endonucleasa de sitio de corte infrecuente que pueda inactivar selectivamente por escisión de ADN, preferentemente por rotura bicatenaria, respectivamente:
 - dicho gen que codifica una diana para dicho agente inmunosupresor, y
 - al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR);
- (d) expresar dichas endonucleasas de sitio de corte infrecuente en dichos linfocitos T;
- (e) clasificar los linfocitos T transformados, que no expresan TCR en su superficie celular;
- (f) expandir dichas células, opcionalmente en presencia de dicho agente inmunosupresor.

En una realización particular de la divulgación, dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente aborda específicamente un gen seleccionado del grupo que consiste CD52, GR, TCR alfa y TCR beta. En otra realización de la divulgación, la modificación genética del método se basa en la expresión, en células proporcionadas para modificación por ingeniería, de dos endonucleasas de sitio de corte infrecuente, de modo que cada una de dichas dos endonucleasas de sitio de corte infrecuente, catalice específica y selectivamente la escisión en cada uno de los pares de genes seleccionados del grupo que consiste en CD52 y GR, CD52 y TCR alfa, CDR52 y TCR beta, GR y TCR alfa, GR y TCR beta, TCR alfa y TCR beta, inactivando de ese modo dichos genes diana. En otra realización de la divulgación, pueden expresarse más de dos endonucleasas de sitio de corte infrecuente en las células de genomodificar para manipular de forma dirigida y/o inactivar más de dos genes.

En otra realización de la divulgación, dicho gen de la etapa (b), específico para un tratamiento inmunosupresor, es CD52 y el tratamiento inmunosupresor de la etapa (d) o (e) comprende un anticuerpo humanizado dirigido al antígeno CD52.

En otra realización de la divulgación, dicho gen de la etapa (b), específico para un tratamiento inmunosupresor, es un receptor de glucocorticoesteroides (GR) y el tratamiento inmunosupresor de la etapa (d) o (e) comprende un corticoesteroide tal como dexametasona.

En otra realización de la divulgación, dicho gen diana de la etapa (b), específico para un tratamiento inmunosupresor, es un miembro genético de la familia de FKBP o una variante del mismo y el tratamiento inmunosupresor de la etapa (d) o (e) comprende FK506, también conocido como tacrolimus o fujimicina. En otra realización de la divulgación, dicho miembro genético de la familia de FKBP es FKBP12 o una variante del mismo.

En otra realización de la divulgación, dicho gen de la etapa (b), específico para un tratamiento inmunosupresor, es un miembro genético de la familia de ciclofilina o una variante del mismo y el tratamiento inmunosupresor de la etapa (d) o (e) comprende ciclosporina.

En otra realización de la divulgación, dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente puede ser una meganucleasa, una nucleasa de dedos de cinc o una nucleasa TALE. En una realización preferida de la divulgación, dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente es una nucleasa TALE. Las nucleasas TALE preferidas son las que reconocen y escinden la secuencia diana seleccionada del grupo que consiste en:

- SEQ ID NO: 1 a 6 (GR),
- SEQ ID NO: 37, 57 a 60 (TCRalpha),
- SEQ ID NO: 38 o 39 (TCRbeta), y
- SEQ ID NO: 40, 61 a 65 (CD52)

Dichas nucleasas TALE comprenden preferentemente una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 41 a SEQ ID NO: 48, para escindir las secuencias diana respectivas SEQ ID NO: 1 a 6 y SEQ ID NO: 37 a 40.

En otra realización de la divulgación, puede introducirse además un dominio catalítico adicional en la célula con dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente para aumentar la mutagénesis para potenciar su capacidad de inactivar genes diana. En particular, dicho dominio catalítico adicional es una enzima que procesa extremos de ADN. Ejemplos no limitantes de enzimas que procesan extremos de ADN incluyen exonucleasas 5'-3', exonucleasas 3'-5', exonucleasas alcalinas 5'-3', endonucleasas de solapa 5', helicasas, fosfatasa, hidrolasas y ADN polimerasas independientes de molde. Ejemplos no limitantes de dicho dominio catalítico comprenden un dominio proteínico o derivado catalíticamente activo del dominio proteínico seleccionado del grupo que consiste en hExol (EXO1_HUMANO), Exol de levadura (EXO1_LEVADURA), Exol de *E. coli*, TREX2 humano, TREX1 de ratón, TREX1 humano, TREX1 bovino, TREX1 de rata, TdT (transferasa de desoxinucleotídeo terminal), DNA2 humano, DNA2 de levadura (DNA2_LEVADURA). En una realización preferida de la divulgación, dicho dominio catalítico adicional tiene una actividad 3'-5'-exonucleasa, y en una realización más preferida de la divulgación, dicho dominio catalítico adicional es TREX, más preferentemente dominio catalítico TREX2 (documento WO2012/058458). En otra realización preferida de la divulgación, dicho dominio catalítico está codificado por un polipéptido TREX monocatenario. Dicho dominio catalítico adicional puede fusionarse a una proteína de fusión de nucleasa o proteína quimérica de acuerdo con la invención opcionalmente mediante un conector peptídico.

Se sabe que las roturas endonucleolíticas estimulan la tasa de recombinación homóloga. Por tanto, en otra realización de la divulgación, la etapa de modificación genética del método comprende además una etapa de introducción en células de un ácido nucleico exógeno que comprende al menos una secuencia homóloga a una parte de la secuencia de ácido nucleico diana, de modo que se produzca recombinación homóloga entre la secuencia de ácido nucleico diana y el ácido nucleico exógeno. En realizaciones particulares, dicho ácido nucleico exógeno comprende una primera y segunda parte que son homólogas a la región 5' y 3' de la secuencia de ácido nucleico diana, respectivamente. Dicho ácido nucleico exógeno en estas realizaciones también comprende una tercera parte ubicada entre la primera y la segunda parte, que no comprende homología con las regiones 5' y 3' de la secuencia de ácido nucleico diana. Después de la escisión de la secuencia de ácido nucleico diana, se estimula un evento de recombinación homóloga entre la secuencia de ácido nucleico diana y el ácido nucleico exógeno. Preferentemente, secuencias homólogas de al menos 50 pb, preferentemente más de 100 pb y más preferentemente más de 200 pb se usan dentro de dicha matriz donante. Por lo tanto, el ácido nucleico exógeno se preferentemente de 200 pb a 6000 pb, más preferentemente de 1000 pb a 2000 pb. De hecho, las homologías de ácido nucleico compartidas ubicadas en regiones flanqueantes en dirección 3' y en dirección 5' del sitio de la rotura y la secuencia de ácido nucleico a introducir deben estar ubicadas entre los dos brazos.

En particular, dicho ácido nucleico exógeno comprende sucesivamente una primera región de homología con secuencias en dirección 5' de dicha escisión, una secuencia para inactivar un gen diana seleccionado del grupo que consiste en CD52, GR, TCR alfa y TCR beta y una segunda región de homología con secuencias en dirección 3' de la escisión. Dicha etapa de introducción de polinucleótido puede ser simultánea, antes o después de la introducción o expresión de dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente. Dependiendo de la ubicación de la secuencia de ácido nucleico diana en la que se ha producido el evento de rotura, dicho ácido nucleico exógeno puede usarse para suprimir un gen, por ejemplo, cuando el ácido nucleico exógeno está ubicado dentro de la pauta abierta de lectura de dicho gen, o para introducir nuevas secuencias o genes de interés. Pueden usarse inserciones de secuencia usando dicho ácido nucleico exógeno para modificar un gen existente diana, mediante corrección o remplazo de dicho gen (permutación de alelos como ejemplo no limitante), o para regular por aumento o por disminución la expresión del gen diana (permutación de promotores como ejemplo no limitante), corrección o remplazo de dicho gen diana. En una realización preferida de la divulgación, la inactivación de genes del grupo que consiste en CD52, GR, TCR alfa y TCR beta puede hacerse en una ubicación genómica precisa dirigida por una nucleasa TALE específica, en la que dicha nucleasa TALE específica cataliza una escisión y en la que dicho ácido nucleico exógeno comprende sucesivamente al menos una región de homología y una secuencia para inactivar un gen diana seleccionado del grupo que consiste en CD52, GR, TCR alfa y TCR beta, que se integra por recombinación homóloga. En otra realización de la divulgación, varios genes pueden inactivarse, sucesivamente o al mismo tiempo, usando varias nucleasas TALE respectivamente y que abordan específicamente un gen definido y varios polinucleótidos específicos para inactivación génica específica.

Por etapa de modificación genómica adicional, puede pretenderse también la inactivación de otro gen seleccionado del grupo que consiste en CD52, GR, TCR alfa y TCR beta. Como se menciona anteriormente, dicha etapa de modificación genómica adicional puede ser una etapa de inactivación, que comprende:

- (a) introducir en dichas células al menos una nucleasa de sitio de corte infrecuente de modo que la endonucleasa de sitio de corte infrecuente catalice específicamente la escisión en una secuencia diana del genoma de dicha célula.
- (b) opcionalmente introducir en dichas células un ácido nucleico exógeno que comprende sucesivamente una primera región de homología con secuencias en dirección 5' de dicha escisión, una secuencia a insertar en el genoma de dicha célula y una segunda región de homología con secuencias en dirección 3' de dicha escisión,
- en la que dicho ácido nucleico exógeno introducido inactiva un gen e integra a menos una secuencia polinucleotídica exógena que codifica al menos una proteína recombinante de interés. En otra realización, dicha secuencia

polinucleotídica exógena se integra dentro de un gen seleccionado del grupo que consiste en CD52, GR, TCR alfa y TCR beta.

5 En una realización particular de la divulgación, dicho método para genomodificar células comprende además una etapa de modificación genómica adicional. Por etapa de modificación genómica adicional, puede pretenderse la introducción en células a genomodificar de una proteína de interés. Dicha proteína de interés puede ser, como ejemplos no limitantes, pTalfa o variante funcional de la misma, un receptor quimérico de antígenos (CAR), un CAR multicatenario, un anticuerpo biespecífico o endonucleasa de sitio de corte infrecuente dirigida a PDCD1 o CTLA-4 como se describe en la presente divulgación.

10 La divulgación también se refiere a nucleasas TALE. En general, la divulgación se refiere a una nucleasa TALE que comprende:

15 (a) un dominio de unión a ADN de efector de tipo activador de la transcripción (TALE) que se ha genomodificado para que se una a una secuencia diana dentro de genes seleccionados del grupo que consiste en CD52, GR, TCR alfa y TCR beta;

(b) un dominio de escisión o un semidominio de escisión.

20 Las nucleasas TALE preferidas de acuerdo con la divulgación son las que reconocen y escinden la secuencia diana seleccionada del grupo que consiste en:

- SEQ ID NO: 1 a 6 (GR),
- SEQ ID NO: 37, 57 a 60 (TCRalpha),
- SEQ ID NO: 38 o 39 (TCRbeta), y
- SEQ ID NO: 40, 61 a 65 (CD52)

30 Dichas nucleasas TALE comprenden preferentemente una secuencia polipeptídica seleccionada de SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 41 a SEQ ID NO: 48, para escindir las secuencias diana respectivas SEQ ID NO: 1 a 6 y SEQ ID NO: 37 a 40.

35 Como puede surgir algo de variabilidad a partir de los datos genómicos de los que derivan estos polipéptidos, y también para tener en cuenta la posibilidad de sustituir algunos de los aminoácidos presentes en estos polipéptidos sin pérdida importante de actividad (variantes funcionales), también se mencionan variantes polipeptídicas de los polipéptidos anteriores, que comparten al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 % e incluso más preferentemente al menos un 95 % de identidad con las secuencias proporcionadas en el presente documento.

40 La presente divulgación, por tanto, se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente, al menos un 90 %, un 95 %, 97 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 41 a SEQ ID NO: 48.

45 También están comprendidos en el alcance de la presente divulgación, polinucleótidos, vectores que codifican las endonucleasas de sitio de corte infrecuente descritas anteriormente.

50 En el alcance de la presente divulgación, también se engloban células aisladas o líneas celulares susceptibles de obtenerse mediante dicho método para genomodificar células, en particular linfocitos T, en que al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en CD52, GR, TCR alfa y TCR beta se ha inactivado. Preferentemente, dos genes seleccionados del grupo que consiste en CD52 y GR, CD52 y TCR alfa, CDR52 y TCR beta, GR y TCR alfa, GR y TCR beta, TCR alfa y TCR beta se han inactivado.

55 De acuerdo con la divulgación, esos genes se inactivan preferentemente por al menos una endonucleasa de sitio de corte infrecuente. Los inventores han demostrado que el uso de nucleasas TALE era particularmente ventajoso para conseguir inactivación doble en linfocitos T. La divulgación abarca un linfocito T aislado que comprende al menos dos polinucleótidos, codificando dichos polinucleótidos al menos una primera y segunda nucleasa TALE, preferentemente estando la primera nucleasa TALE dirigida contra un gen que codifica TCR y estando la segunda dirigida contra un gen que codifica un receptor para un agente inmunosupresor, tal como CD52 o GR.

60 En otra realización de la divulgación, dicha célula aislada comprende además una modificación genómica adicional. En otra realización de la divulgación, dicha modificación genómica adicional es la integración de al menos una secuencia polinucleotídica exógena. En otra realización de la divulgación, dicha secuencia exógena se integra en un gen seleccionado del grupo que consiste en CD52, GR, TCR alfa y TCR beta.

PreTalfa

- 5 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método de expansión de linfocitos T deficientes de TCR alfa, que comprende introducir en dicho linfocito T pTalfa (también denominado preTCRa) o una variante funcional del mismo y expandir dichas células, opcionalmente a través de estimulación del complejo CD3. En una realización preferida de la divulgación, el método comprende:
- 10 a) transformar dichas células con ácido nucleico que codifica al menos un fragmento de pTalfa para mantener la expresión en superficie de CD3
- 15 b) expresar dicho pTalfa en dichas células
- c) expandir dichas células opcionalmente, opcionalmente a través de estimulación del complejo CD3.
- 15 La divulgación también se refiere a un método de preparación de linfocitos T para inmunoterapia, que comprende las etapas del método para la expansión de linfocitos T.
- 20 En una realización particular de la divulgación, la secuencia polinucleotídica de pTalfa puede introducirse aleatoriamente o también a través de recombinación homóloga, en particular la inserción podría estar asociada con la inactivación de gen TCRalfa.
- 25 De acuerdo con la divulgación, se usan diferentes variantes funcionales de pTalfa. Una "variante funcional" del péptido se refiere a una molécula sustancialmente similar al péptido completo o un fragmento del mismo. Un "fragmento" del pTalfa o variante funcional del mismo, se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto. El pTalfa preferido o variantes funcionales pueden ser pTalfa de longitud completa o una versión de pTalfa truncada en el extremo C. El pTalfa truncado en el extremo C carece, en el extremo C terminal, de uno o más residuos. Como ejemplos no limitantes, la versión de pTalfa truncada en el extremo C carece de 18, 48, 62, 78, 92, 110 o 114 residuos del extremo C de la proteína (SEQ ID NO: 107 a SEQ ID NO: 114). Además, pueden prepararse variantes 30 de secuencia de aminoácidos del péptido mediante mutaciones en el ADN que codifica el péptido. Dichas variantes funcionales incluyen, por ejemplo, delecciones de, o inserciones o sustituciones de, residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. También puede realizarse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llevar a la construcción final, siempre que la construcción final posea la actividad deseada, en particular el restablecimiento de un complejo CD3 funcional. En una realización preferida de la divulgación, se introduce al menos una mutación en las 35 diferentes versiones de pTalfa como se describe anteriormente para lograr la dimerización. Como ejemplo no limitante, el residuo mutado puede ser al menos W46R, D22A, K24A, R102A o R117A de la proteína pTalfa humana o posiciones alineadas usando el método CLUSTALW en la familia de pTalfa o miembro homólogo. Preferentemente, pTalfa o variante del mismo como se describe anteriormente comprende el residuo mutado W46R (SEQ ID NO: 123) o los residuos mutados D22A, K24A, R102A y R117A (SEQ ID NO: 124). En una realización particular de la divulgación, 40 dicho pTalfa o variantes también se fusionan a un dominio de transducción de señales tal como CD28, OX40, ICOS, CD27, CD137 (4-1BB) y CD8 como ejemplos no limitantes (SEQ ID NO: 115 a SEQ ID NO: 120). El dominio extracelular de pTalfa o variantes como se describen anteriormente se pueden fusionar a un fragmento de la proteína TCRalfa, particularmente el dominio transmembranario e intracelular de TCRalfa (SEQ ID NO: 122). Las variantes de pTalfa también se pueden fusionar al dominio intracelular de TCRalfa (SEQ ID NO: 121).
- 45 En otra realización de la divulgación, dichas versiones de pTalfa se fusionan a un dominio extracelular de unión a ligando y más preferentemente pTalfa o variante funcional del mismo se fusiona a un fragmento de anticuerpo monocatenario (scFV) que comprende el fragmento variable de la cadena ligera (V_L) y la pesada (V_H) de un anticuerpo monoclonal específico de antígeno diana unido mediante un conector flexible. Como ejemplo no limitante, la secuencia de aminoácidos de pTalfa o variante funcional del mismo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 107 a 50 SEQ ID NO: 124.
- 55 Como puede surgir algo de variabilidad a partir de los datos genómicos de los que derivan estos polipéptidos, y también para tener en cuenta la posibilidad de sustituir algunos de los aminoácidos presentes en estos polipéptidos sin pérdida importante de actividad (variantes funcionales), la divulgación abarca polipéptidos variantes de los polipéptidos anteriores que comparten al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 % e incluso más preferentemente al menos un 95 % de identidad con las secuencias proporcionadas en el presente documento.
- 60 La presente divulgación, por tanto, se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia polipeptídica que tiene al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente, al menos un 90 %, un 95 %, 97 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 107 a SEQ ID NO: 124.
- 65 Por linfocito T deficiente de TCR alfa se pretende un linfocito T aislado que carece de la expresión de una cadena alfa de TCR funcional. Esto puede conseguirse por diferentes medios, como ejemplos no limitantes, genomodificando un

linfocito T de tal manera que no exprese ningún TCR alfa funcional en su superficie celular o genomodificando un linfocito T de modo que produzca muy poca cadena alfa de TCR funcional en su superficie o genomodificando un linfocito T para que exprese una forma mutada o truncada de la cadena alfa de TCR.

- 5 Las células deficientes de TCR alfa ya no pueden expandirse a través del complejo CD3. Por tanto, para solucionar este problema y permitir la proliferación de células deficientes de TCR alfa, se introduce pTalfa o variante funcional del mismo en dichas células, restableciendo, por tanto, un complejo CD3 funcional. En una realización preferida de la divulgación, el método comprende además introducir en dichos linfocitos T endonucleasas de sitio de corte infrecuentes que pueden inactivar selectivamente por escisión de ADN un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR). En una realización particular de la divulgación, dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuentes es una nucleasa TALE. Como ejemplos no limitantes, la nucleasa TALE se dirige contra una de las secuencias diana génicas de TCRalfa seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 57 a 60. Preferentemente, las TALE-nucleasas se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42.
- 10 15 En una realización particular de la divulgación, dicho método para la expansión de linfocitos T deficientes de TCR alfa comprende una etapa de modificación genómica adicional. Por etapa de modificación genómica adicional, puede pretenderse la introducción en células a genomodificar de una proteína de interés. Dicha proteína de interés puede ser, como ejemplos no limitantes, un receptor quimérico de antígenos (CAR), particularmente un CAR que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 73, un CAR multicatenario, particularmente un CAR multicatenario que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 125, un anticuerpo biespecífico, endonucleasas de sitio de corte infrecuentes dirigidas a PDCD1 o CTLA-4, particularmente la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 74 a SEQ ID NO: 78 o una endonucleasa de sitio de corte infrecuentes dirigida a una diana para un agente inmunosupresor como se describe en la presente divulgación.
- 20 25 30 También se describen en el presente documento polipéptidos que codifican pTalfa, particularmente variantes funcionales descritas anteriormente. En una realización preferida, la divulgación se refiere a un pTalfa o variante funcional del mismo fusionado a un dominio de transducción de señales tal como CD28, OX40, ICOS, CD137 y CD8. Más particularmente, la divulgación se refiere a una variante funcional de pTalfa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 107 a SEQ ID NO: 124. También se describen en el presente documento polinucleótidos, vectores que codifican pTalfa o variantes funcionales del mismo descritos anteriormente.

35 Las células aisladas o líneas celulares susceptibles de obtener por dicho método también se describen en el presente documento. En particular, dichas células aisladas o líneas celulares se obtienen introduciendo en dichas células un pTalfa o una variante funcional del mismo para mantener la expresión en superficie de CD3. En una realización preferida de la divulgación, dicha célula aislada o línea celular se modifica genéticamente además inactivando el gen de TCRalfa. Este gen se inactiva preferiblemente por al menos una endonucleasa de sitio de corte infrecuentes. En una realización preferida de la divulgación, dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuentes es una nucleasa TALE.

40 Receptor quimérico de antígenos (CAR) multicatenario

En otra realización, la divulgación se refiere a un receptor quimérico de antígenos (CAR) multicatenario particularmente adaptado a la producción y expansión de linfocitos T genomodificados de la presente divulgación. El CAR multicatenario comprende al menos dos de los siguientes componentes:

- 45 a) un polipéptido que comprende el dominio transmembranario de la cadena alfa de FcεRI y un dominio extracelular de unión a ligando,
- 50 b) un polipéptido que comprende una parte de la cola citoplásica N y C terminal y el dominio transmembranario de la cadena beta de FcεRI y/o
- c) dos polipéptidos que comprenden cada uno una parte de la cola intracitoplásica y el dominio transmembranario de la cadena gamma de FcεRI, por lo que los diferentes polipéptidos multimerizan juntos espontáneamente para formar CAR dimérico, trimérico o tetramérico.

55 60 65 Un ejemplo de CAR tetramérico se ilustra en la figura 3. Se representan diferentes versiones de CAR multicatenarios en la figura 4. Un ejemplo de CAR multicatenario comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 125. La expresión "una parte de" usada en el presente documento se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, que es un péptido más corto. Como alternativa, pueden prepararse variantes funcionales de secuencia de aminoácidos del polipéptido mediante mutaciones en el ADN que codifica el polipéptido. Dichas variantes funcionales incluyen, por ejemplo, delecciones de, o inserciones o sustituciones de, residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. También puede realizarse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llevar a la construcción final, siempre que la construcción final posea la actividad deseada, especialmente para que muestra una actividad inmunitaria celular antidiaria específica.

65 En una realización preferida de la divulgación, dicho dominio extracelular de unión a ligando es un scFv. Un dominio

de unión distinto de scFv también puede usarse para dirección predefinida de linfocitos, tales como fragmentos de anticuerpos de un único dominio de camélidos o ligandos de receptores como un polipéptido de factor de crecimiento endotelial vascular, un péptido de unión a integrina, heregulina o una muteína de IL-13, dominios de unión a anticuerpo, bucles hipervariables de anticuerpo o CDR como ejemplos no limitantes.

- 5 En una realización preferida de la divulgación, dicho polipéptido de a) comprende además una región de tallo entre dicho dominio extracelular de unión a ligando y dicho dominio transmembranario. La expresión "región de tallo" usada en el presente documento significa en general cualquier oligo o polipéptido que actúe uniendo el dominio transmembranario con el dominio extracelular de unión a ligando. En particular, la región de tallo se usa para proporcionar más flexibilidad y accesibilidad para el dominio extracelular de unión a ligando. Una región de tallo puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y mucho más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos. La región de tallo puede proceder de la totalidad o parte de las moléculas de origen natural, tal como de la totalidad o parte de la región extracelular de CD8, CD4 o CD28, o de la totalidad o parte de una región constante de anticuerpo. Como alternativa, la región de tallo puede ser una secuencia sintética que corresponde a una secuencia de tallo de origen natural o puede ser una secuencia de tallo completamente sintética.
- 10
- 15

En una realización preferida de la divulgación, dicho polipéptido de a), b) y/o c) comprende además al menos un dominio de transducción de señales. En una realización mucho más preferida, dicho dominio de transducción de señales se selecciona del grupo que consiste en CD28, OX40, ICOS, CD137 y CD8.

- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- 70
- 75
- 80
- 85
- 90
- 95
- 100
- 105
- 110
- 115
- 120
- 125
- 130
- 135
- 140
- 145
- 150
- 155
- 160
- 165
- 170
- 175
- 180
- 185
- 190
- 195
- 200
- 205
- 210
- 215
- 220
- 225
- 230
- 235
- 240
- 245
- 250
- 255
- 260
- 265
- 270
- 275
- 280
- 285
- 290
- 295
- 300
- 305
- 310
- 315
- 320
- 325
- 330
- 335
- 340
- 345
- 350
- 355
- 360
- 365
- 370
- 375
- 380
- 385
- 390
- 395
- 400
- 405
- 410
- 415
- 420
- 425
- 430
- 435
- 440
- 445
- 450
- 455
- 460
- 465
- 470
- 475
- 480
- 485
- 490
- 495
- 500
- 505
- 510
- 515
- 520
- 525
- 530
- 535
- 540
- 545
- 550
- 555
- 560
- 565
- 570
- 575
- 580
- 585
- 590
- 595
- 600
- 605
- 610
- 615
- 620
- 625
- 630
- 635
- 640
- 645
- 650
- 655
- 660
- 665
- 670
- 675
- 680
- 685
- 690
- 695
- 700
- 705
- 710
- 715
- 720
- 725
- 730
- 735
- 740
- 745
- 750
- 755
- 760
- 765
- 770
- 775
- 780
- 785
- 790
- 795
- 800
- 805
- 810
- 815
- 820
- 825
- 830
- 835
- 840
- 845
- 850
- 855
- 860
- 865
- 870
- 875
- 880
- 885
- 890
- 895
- 900
- 905
- 910
- 915
- 920
- 925
- 930
- 935
- 940
- 945
- 950
- 955
- 960
- 965
- 970
- 975
- 980
- 985
- 990
- 995
- 1000
- 1005
- 1010
- 1015
- 1020
- 1025
- 1030
- 1035
- 1040
- 1045
- 1050
- 1055
- 1060
- 1065
- 1070
- 1075
- 1080
- 1085
- 1090
- 1095
- 1100
- 1105
- 1110
- 1115
- 1120
- 1125
- 1130
- 1135
- 1140
- 1145
- 1150
- 1155
- 1160
- 1165
- 1170
- 1175
- 1180
- 1185
- 1190
- 1195
- 1200
- 1205
- 1210
- 1215
- 1220
- 1225
- 1230
- 1235
- 1240
- 1245
- 1250
- 1255
- 1260
- 1265
- 1270
- 1275
- 1280
- 1285
- 1290
- 1295
- 1300
- 1305
- 1310
- 1315
- 1320
- 1325
- 1330
- 1335
- 1340
- 1345
- 1350
- 1355
- 1360
- 1365
- 1370
- 1375
- 1380
- 1385
- 1390
- 1395
- 1400
- 1405
- 1410
- 1415
- 1420
- 1425
- 1430
- 1435
- 1440
- 1445
- 1450
- 1455
- 1460
- 1465
- 1470
- 1475
- 1480
- 1485
- 1490
- 1495
- 1500
- 1505
- 1510
- 1515
- 1520
- 1525
- 1530
- 1535
- 1540
- 1545
- 1550
- 1555
- 1560
- 1565
- 1570
- 1575
- 1580
- 1585
- 1590
- 1595
- 1600
- 1605
- 1610
- 1615
- 1620
- 1625
- 1630
- 1635
- 1640
- 1645
- 1650
- 1655
- 1660
- 1665
- 1670
- 1675
- 1680
- 1685
- 1690
- 1695
- 1700
- 1705
- 1710
- 1715
- 1720
- 1725
- 1730
- 1735
- 1740
- 1745
- 1750
- 1755
- 1760
- 1765
- 1770
- 1775
- 1780
- 1785
- 1790
- 1795
- 1800
- 1805
- 1810
- 1815
- 1820
- 1825
- 1830
- 1835
- 1840
- 1845
- 1850
- 1855
- 1860
- 1865
- 1870
- 1875
- 1880
- 1885
- 1890
- 1895
- 1900
- 1905
- 1910
- 1915
- 1920
- 1925
- 1930
- 1935
- 1940
- 1945
- 1950
- 1955
- 1960
- 1965
- 1970
- 1975
- 1980
- 1985
- 1990
- 1995
- 2000
- 2005
- 2010
- 2015
- 2020
- 2025
- 2030
- 2035
- 2040
- 2045
- 2050
- 2055
- 2060
- 2065
- 2070
- 2075
- 2080
- 2085
- 2090
- 2095
- 2100
- 2105
- 2110
- 2115
- 2120
- 2125
- 2130
- 2135
- 2140
- 2145
- 2150
- 2155
- 2160
- 2165
- 2170
- 2175
- 2180
- 2185
- 2190
- 2195
- 2200
- 2205
- 2210
- 2215
- 2220
- 2225
- 2230
- 2235
- 2240
- 2245
- 2250
- 2255
- 2260
- 2265
- 2270
- 2275
- 2280
- 2285
- 2290
- 2295
- 2300
- 2305
- 2310
- 2315
- 2320
- 2325
- 2330
- 2335
- 2340
- 2345
- 2350
- 2355
- 2360
- 2365
- 2370
- 2375
- 2380
- 2385
- 2390
- 2395
- 2400
- 2405
- 2410
- 2415
- 2420
- 2425
- 2430
- 2435
- 2440
- 2445
- 2450
- 2455
- 2460
- 2465
- 2470
- 2475
- 2480
- 2485
- 2490
- 2495
- 2500
- 2505
- 2510
- 2515
- 2520
- 2525
- 2530
- 2535
- 2540
- 2545
- 2550
- 2555
- 2560
- 2565
- 2570
- 2575
- 2580
- 2585
- 2590
- 2595
- 2600
- 2605
- 2610
- 2615
- 2620
- 2625
- 2630
- 2635
- 2640
- 2645
- 2650
- 2655
- 2660
- 2665
- 2670
- 2675
- 2680
- 2685
- 2690
- 2695
- 2700
- 2705
- 2710
- 2715
- 2720
- 2725
- 2730
- 2735
- 2740
- 2745
- 2750
- 2755
- 2760
- 2765
- 2770
- 2775
- 2780
- 2785
- 2790
- 2795
- 2800
- 2805
- 2810
- 2815
- 2820
- 2825
- 2830
- 2835
- 2840
- 2845
- 2850
- 2855
- 2860
- 2865
- 2870
- 2875
- 2880
- 2885
- 2890
- 2895
- 2900
- 2905
- 2910
- 2915
- 2920
- 2925
- 2930
- 2935
- 2940
- 2945
- 2950
- 2955
- 2960
- 2965
- 2970
- 2975
- 2980
- 2985
- 2990
- 2995
- 3000
- 3005
- 3010
- 3015
- 3020
- 3025
- 3030
- 3035
- 3040
- 3045
- 3050
- 3055
- 3060
- 3065
- 3070
- 3075
- 3080
- 3085
- 3090
- 3095
- 3100
- 3105
- 3110
- 3115
- 3120
- 3125
- 3130
- 3135
- 3140
- 3145
- 3150
- 3155
- 3160
- 3165
- 3170
- 3175
- 3180
- 3185
- 3190
- 3195
- 3200
- 3205
- 3210
- 3215
- 3220
- 3225
- 3230
- 3235
- 3240
- 3245
- 3250
- 3255
- 3260
- 3265
- 3270
- 3275
- 3280
- 3285
- 3290
- 3295
- 3300
- 3305
- 3310
- 3315
- 3320
- 3325
- 3330
- 3335
- 3340
- 3345
- 3350
- 3355
- 3360
- 3365
- 3370
- 3375
- 3380
- 3385
- 3390
- 3395
- 3400
- 3405
- 3410
- 3415
- 3420
- 3425
- 3430
- 3435
- 3440
- 3445
- 3450
- 3455
- 3460
- 3465
- 3470
- 3475
- 3480
- 3485
- 3490
- 3495
- 3500
- 3505
- 3510
- 3515
- 3520
- 3525
- 3530
- 3535
- 3540
- 3545
- 3550
- 3555
- 3560
- 3565
- 3570
- 3575
- 3580
- 3585
- 3590
- 3595
- 3600
- 3605
- 3610
- 3615
- 3620
- 3625
- 3630
- 3635
- 3640
- 3645
- 3650
- 3655
- 3660
- 3665
- 3670
- 3675
- 3680
- 3685
- 3690
- 3695
- 3700
- 3705
- 3710
- 3715
- 3720
- 3725
- 3730
- 3735
- 3740
- 3745
- 3750
- 3755
- 3760
- 3765
- 3770
- 3775
- 3780
- 3785
- 3790
- 3795
- 3800
- 3805
- 3810
- 3815
- 3820
- 3825
- 3830
- 3835
- 3840
- 3845
- 3850
- 3855
- 3860
- 3865
- 3870
- 3875
- 3880
- 3885
- 3890
- 3895
- 3900
- 3905
- 3910
- 3915
- 3920
- 3925
- 3930
- 3935
- 3940
- 3945
- 3950
- 3955
- 3960
- 3965
- 3970
- 3975
- 3980
- 3985
- 3990
- 3995
- 4000
- 4005
- 4010
- 4015
- 4020
- 4025
- 4030
- 4035
- 4040
- 4045
- 4050
- 4055
- 4060
- 4065
- 4070
- 4075
- 4080
- 4085
- 4090
- 4095
- 4100
- 4105
- 4110
- 4115
- 4120
- 4125
- 4130
- 4135
- 4140
- 4145
- 4150
- 4155
- 4160
- 4165
- 4170
- 4175
- 4180
- 4185
- 4190
- 4195
- 4200
- 4205
- 4210
- 4215
- 4220
- 4225
- 4230
- 4235
- 4240
- 4245
- 4250
- 4255
- 4260
- 4265
- 4270
- 4275
- 4280
- 4285
- 4290
- 4295
- 4300
- 4305
- 4310
- 4315
- 4320
- 4325
- 4330
- 4335
- 4340
- 4345
- 4350
- 4355
- 4360
- 4365
- 4370
- 4375
- 4380
- 4385
- 4390
- 4395
- 4400
- 4405
- 4410
- 4415
- 4420
- 4425
- 4430
- 4435
- 4440
- 4445
- 4450
- 4455
- 4460
- 4465
- 4470
- 4475
- 4480
- 4485
- 4490
- 4495
- 4500
- 4505
- 4510
- 4515
- 4520
- 4525
- 4530
- 4535
- 4540
- 4545
- 4550
- 4555
- 4560
- 4565
- 4570
- 4575
- 4580
- 4585
- 4590
- 4595
- 4600
- 4605
- 4610
- 4615
- 4620
- 4625
- 4630
- 4635
- 4640
- 4645
- 4650
- 4655
- 4660
- 4665
- 4670
- 4675
- 4680
- 4685
- 4690
- 4695
- 4700
- 4705
- 4710
- 4715
- 4720
- 4725
- 4730
- 4735
- 4740
- 4745
- 4750
- 4755
- 4760
- 4765
- 4770
- 4775
- 4780
- 4785
- 4790
- 4795
- 4800
- 4805
- 4810
- 4815
- 4820
- 4825
- 4830
- 4835
- 4840
- 4845
- 4850
- 4855
- 4860
- 4865
- 4870
- 4875
- 4880
- 4885
- 4890
- 4895
- 4900
- 4905
- 4910
- 4915
- 4920
- 4925
- 4930
- 4935
- 4940
- 4945
- 4950
- 4955
- 4960
- 4965
- 4970
- 4975
- 4980
- 4985
- 4990
- 4995
- 5000
- 5005
- 5010
- 5015
- 5020
- 5025
- 5030
- 5035
- 5040
- 5045
- 5050
- 5055
- 5060
- 5065
- 5070
- 5075
- 5080
- 5085
- 5090
- 5095
- 5100
- 5105
- 5110
- 5115
- 5120
- 5125
- 5130
- 5135
- 5140
- 5145
- 5150
- 5155
- 5160
- 5165
- 5170
- 5175
- 5180
- 5185
- 5190
- 5195
- 5200
- 5205
- 5210
- 5215
- 5220
- 5225
- 5230
- 5235
- 5240
- 5245
- 5250
- 5255
- 5260
- 5265
- 5270
- 5275
- 5280
- 5285
- 5290
- 5295
- 5300
- 5305
- 5310
- 5315
- 5320
- 5325
- 5330
- 5335
- 5340
- 5345
- 5350
- 5355
- 5360
- 5365
- 5370
- 5375
- 5380
- 5385
- 5390
- 5395
- 5400
- 5405
- 5410
- 5415
- 5420
- 5425
- 5430
- 5435
- 5440
- 5445
- 5450
- 5455
- 5460
- 5465
- 5470
- 5475
- 5480
- 5485
- 5490
- 5495
- 5500
- 5505
- 5510
- 5515
- 5520
- 5525
- 5530
- 5535
- 5540
- 5545
- 5550
- 5555
- 5560
- 5565
- 5570
- 5575
- 5580
- 5585
- 5590
- 5595
- 5600
- 5605
- 5610
- 5615
- 5620
- 5625
- 5630
- 5635
- 5640
- 5645
- 5650
- 5655
- 5660
- 5665
- 5670
- 5675
- 5680
- 5685
- 5690
- 5695
- 5700
- 5705
- 5710
- 5715
- 5720
- 5725
- 5730
- 5735
- 5740
- 5745
- 5750
- 5755
- 5760
- 5765
- 5770
- 5775
- 5780
- 5785
- 5790
- 5795
- 5800
- 5805
- 5810
- 5815
- 5820
- 5825
- 5830
- 5835
- 5840
- 5845
- 5850
- 5855
- 5860
- 5865
- 5870
- 5875
- 5880
- 5885
- 5890
- 5895
- 5900
- 5905
- 5910
- 5915
- 5920
- 5925
- 5930
- 5935
- 5940
- 5945
- 5950
- 5955</p

biespecífico, endonucleasa de sitio de corte infrecuente dirigida a PDCD1 o CTLA-4, un pTalfa o una variante funcional del mismo como se describe en la presente divulgación.

5 La presente divulgación también se refiere a células aisladas o líneas celulares susceptibles de obtenerse mediante dicho método para genomodificar células. En particular, dicha célula aislada comprende secuencias polinucleotídicas exógenas que codifican polipéptidos que comprenden dicho CAR multicatenario.

Anticuerpos biespecíficos

10 De acuerdo con una realización adicional de la divulgación, los linfocitos T genomodificados obtenidos mediante los diferentes métodos que se describen previamente, pueden exponerse además a anticuerpos biespecíficos. Dichos linfocitos T podrían exponerse a anticuerpos biespecíficos *ex vivo* antes de la administración a un paciente o *in vivo* después de la administración a un paciente. Dichos anticuerpos biespecíficos comprenden dos regiones variables con 15 distintas propiedades antigenicas que permiten llevar las células genomodificadas a las proximidades de un antígeno diana. Como ejemplo no limitante, dicho anticuerpo biespecífico está dirigido contra un marcador tumoral y antígeno de linfocitos tal como CD3 y tiene el potencial de redirigir y activar cualquier linfocito T en circulación contra los tumores.

Métodos de administración

20 Los diferentes métodos descritos anteriormente implican introducir pTalfa o variantes funcionales del mismo, endonucleasa de sitio de corte infrecuente, nucleasa TALE, CAR o CAR multicatenario opcionalmente con enzima que procesa extremos de ADN o ácido nucleico exógeno en una célula.

25 Como ejemplo no limitante, dicho pTalfa o variante funcional del mismo, endonucleasas de sitio de corte infrecuente, nucleasas TALE, CAR o CAR multicatenario opcionalmente con enzima que procesa extremos de ADN o ácido nucleico exógeno pueden introducirse como transgenes codificados por uno o como diferentes vectores plasmídicos. Pueden incluirse diferentes transgenes en un vector, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de salto ribosómico tal como una secuencia que codifica un péptido 2A. Los péptidos 2A, que se identificaron en el grupo Aphthovirus de los picornavirus, provocan un "salto" ribosómico de un codón al siguiente, sin

30 la formación de un enlace peptídico entre los dos aminoácidos codificados por los codones (véase Donnelly *et al.*, J. of General Virology 82: 1013-1025 (2001); Donnelly *et al.*, J. of Gen. Virology 78: 13-21 (1997); Doronina *et al.*, Mol. And. Cell. Biology 28(13): 4227-4239 (2008); Atkins *et al.*, RNA 13: 803-810 (2007)). Por "codón" se entiende tres nucleótidos en un ARNm (o en la hebra de sentido de una molécula de ADN) que se traducen por un ribosoma en un residuo aminoacídico. Por tanto, pueden sintetizarse dos polipéptidos a partir de una sola pauta abierta de lectura contigua dentro de un ARNm cuando los polipéptidos están separados por una secuencia oligopeptídica 2A que está en la misma pauta sin desplazamiento. Dichos mecanismos de salto ribosómico son bien conocidos en la técnica y se sabe que se usan por varios vectores para la expresión de varias proteínas codificadas por un solo ARN mensajero. Como ejemplo no limitante, los péptidos 2A se han usado para expresar en la célula la endonucleasa de sitio de corte infrecuente y una enzima que procesa extremos de ADN o los diferentes polipéptidos del CAR multicatenario.

40 Dicho vector plasmídico puede contener un marcador de selección que proporciona la identificación y/o selección de células que recibieron dicho vector.

45 Los polipéptidos pueden sintetizarse *in situ* en la célula como resultados de la introducción de polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos en la célula. Como alternativa, dichos polipéptidos podrían producirse fuera de la célula y después introducirse en la misma. Los métodos para introducir una construcción polinucleotídica en células animales son conocidos en la técnica e incluyen como ejemplos no limitantes métodos de transformación estable en los que la construcción polinucleotídica se integra en el genoma de la célula, métodos de transformación transitoria en los que la construcción polinucleotídica no se integra en el genoma de la célula y métodos mediados por virus. Dichos polinucleótidos pueden introducirse en una célula mediante, por ejemplo, vectores víricos recombinantes (por ejemplo, retrovirus, adenovirus), liposomas y similares. Por ejemplo, los métodos de transformación transitoria incluyen, por ejemplo, microinyección, electroporación o bombardeo de partículas. Dichos polinucleótidos pueden incluirse en vectores, más particularmente plásmidos o virus, en vista de que se expresan en células.

55 - *Electroporación*

Una realización más preferida de la divulgación, los polinucleótidos que codifican polipéptidos como se describen anteriormente, pueden ser ARNm que se introduce directamente en las células, por ejemplo, mediante electroporación. Los inventores determinaron la condición óptima para la electroporación de ARNm en linfocitos T.

60 El inventor utilizó la tecnología cytoPulse que permite, mediante el uso de campos eléctricos pulsados, permeabilizar transitoriamente células vivas para la administración de material a las células. La tecnología, basada en el uso de formas de onda de electroporación PulseAgile (propiedad de Cellectis) permite el control preciso de la duración de los pulsos, de la intensidad, así como del intervalo entre los pulsos (patente de Estados Unidos 6,010,613 y solicitud PCT internacional WO2004083379). Todos estos parámetros pueden modificarse para alcanzar las mejores condiciones para una alta eficiencia de transfección con una mortalidad mínima. Básicamente, los primeros pulsos de alto campo

eléctrico permiten la formación de poros, mientras que los pulsos posteriores de campo eléctrico inferior permiten mover el polinucleótido a la célula. Los inventores describen las etapas que condujeron al logro de una eficiencia de transfección > 95 % del ARNm en los linfocitos T y el uso del protocolo de electroporación para expresar transitoriamente diferentes tipos de proteínas en los linfocitos T. En el presente documento se describe un método de transformación de linfocitos T, que comprende poner en contacto dichos linfocitos T con ARN y aplicar a los linfocitos T una secuencia de pulso ágil que consiste en:

- 5 (a) un impulso eléctrico con un intervalo de voltaje de 2250 a 3000 V por centímetro, un ancho de pulso de 0,1 ms y un intervalo de pulso de 0,2 a 10 ms entre los pulsos eléctricos de las etapas (a) y (b);
- 10 (b) un pulso eléctrico con un intervalo de voltaje de 2250 a 3000 V con un ancho de pulso de 100 ms y un intervalo de pulso de 100 ms entre el pulso eléctrico de la etapa (b) y el primer pulso eléctrico de la etapa (c); y
- 15 (c) 4 pulsos eléctricos con un voltaje de 325 V con un ancho de pulso de 0,2 ms y un intervalo de pulso de 2 ms entre cada uno de los 4 pulsos eléctricos.

En una realización particular de la divulgación, el método de transformación de linfocitos T comprende poner en contacto dichos linfocitos T con ARN y aplicar a los linfocitos T una secuencia de pulso ágil que consiste en:

- 20 (a) un impulso eléctrico con un voltaje de 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000V por centímetro, un ancho de pulso de 0,1 ms y un intervalo de pulso de 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ms entre los pulsos eléctricos de la etapa (a) y (b);
- 25 (b) un impulso eléctrico con un intervalo de voltaje de 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2400, 2450, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000V con un ancho de pulso de 100 ms y un intervalo de pulso de 100 ms entre el pulso eléctrico de la etapa (b) y el primer impulso eléctrico de la etapa (c); y
- 30 (c) 4 pulsos eléctricos con un voltaje de 325 V con un ancho de pulso de 0,2 ms y un intervalo de pulso de 2 ms entre cada uno de los 4 pulsos eléctricos.

35 Cualquier valor incluido en el intervalo de valores descrito anteriormente se desvela en la presente solicitud. El medio de electroporación puede ser cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, el medio de electroporación tiene una conductividad en un intervalo que abarca de 0,01 a 1,0 miliSiemens.

40 Activación y expansión de linfocitos T

45 En realizaciones particulares de la divulgación, como ejemplos no limitantes, dicho ARN codifica una endonucleasa de sitio de corte infrecuente, un monómero de la endonucleasa de sitio de corte infrecuente tal como seminucleasa TALE, un receptor químérico de antígenos, al menos un componente del receptor químérico de antígenos multicatenario, un pTalfa o variante funcional del mismo, un ácido nucleico exógeno, un dominio catalítico adicional.

50 En general, los linfocitos T de la divulgación pueden expandirse por contacto con una superficie que se ha unido a un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3 TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T.

55 En particular, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse *in vitro*, tal como mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína quinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se utiliza un ligando que une la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de linfocitos T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Como pueden apreciar fácilmente los expertos en la materia, La relación entre partículas y células puede depender del tamaño de partícula en relación con la célula diana. En algunas realizaciones adicionales de la presente invención, las células, tales como linfocitos T, se combinan con microesferas recubiertas de agente, las microesferas y las células se separan posteriormente, y luego las células se cultivan. En una realización alternativa, antes del cultivo, las células y las microesferas recubiertas con agente no se separan sino que se cultivan juntas. Las proteínas de la superficie celular pueden ligarse permitiendo que las microesferas paramagnéticas a las que se unen anti-CD3 y anti-CD28 (3x28 microesferas) entren en contacto con los linfocitos T. En una realización de la divulgación, las células (por ejemplo, de

- 4 a 10 linfocitos T) y las microesferas (por ejemplo, microesferas paramagnéticas T CD3/CD28 M-450 DYNABEADS® en una proporción de 1:1) se combinan en un tampón, preferentemente PBS (sin cationes divalentes, tales como calcio y magnesio). De nuevo, los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente que se puede usar cualquier concentración celular. La mezcla se puede cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) a 5 aproximadamente 14 días o cualquier valor entero por hora en el medio. En otra realización de la divulgación, la mezcla se puede cultivar durante 21 días. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o, X-vivo 5, (Lonza)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , 1L-4, 1L-7, GM-CSF, -10, -2, 1L-15, TGFP y TNF- o cualquier otro aditivo para el 10 crecimiento de células conocido por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de las células incluyen, pero sin limitación, tensioactivo, plasmanato y agentes reductores, tales como N-acetilcisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1 y X-Vivo 20, Optimizer, con 15 aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, libre de suero o suplementado con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y la expansión de los linfocitos T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomicina, se incluyen solo en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se infunden en un sujeto. Las células diana se mantienen en condiciones necesarias para apoyar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (por ejemplo, 37 °C) y atmósfera (por ejemplo, aire más un 5 % de CO₂). Los linfocitos T que han estado expuestos a tiempos de estimulación variados 20 pueden presentar características diferentes
- En otra realización particular de la divulgación, dichas células pueden expandirse cocultivando con tejido o células. Dichas células también pueden expandirse *in vivo*, por ejemplo, en la sangre del sujeto después de administrar dicha célula al sujeto.
- 25 Linfocitos T modificados**
- En el alcance de la presente divulgación también se abarca un linfocito T aislado obtenido de acuerdo con uno cualquiera de los métodos descritos previamente. Dicho linfocito T puede derivar de una célula madre. Las células madre pueden ser células madre adultas, células madre embrionarias, más particularmente células madre no 30 humanas, células madre de sangre medular, células progenitoras, células madre de la médula ósea, células madre pluripotenciales inducidas, células madre totipotenciales no humanas o células madre hematopoyéticas. Las células humanas representativas son células CD34+. Dicha célula aislada también puede ser una célula dendrítica, un linfocito NK, un linfocito B o un linfocito T seleccionado del grupo que consiste en linfocitos T inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos T auxiliares. En otro ejemplo, dicha célula puede derivar del grupo que 35 consiste en linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Antes de la expansión y modificación genética de las células, puede obtenerse una fuente de células de un sujeto a través de diversos métodos no limitantes. Los linfocitos T pueden obtenerse de varias fuentes no limitantes, incluyendo células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón umbilical, tejido de timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, se pueden usar innumerables 40 líneas de linfocitos T disponibles y conocidas por los expertos en la materia. En otra realización de la divulgación, dicha célula puede proceder de un donante sano, de un paciente diagnosticado con cáncer o de un paciente diagnosticado con una infección. En otra realización de la divulgación, dicha célula es parte de una población mixta de células que presentan diferentes características fenotípicas. También se describe en el presente documento una 45 línea celular obtenida de un linfocito T transformado de acuerdo con el método descrito previamente. También se mencionan en el presente documento células modificadas resistentes a un tratamiento inmunosupresor y susceptible a obtenerse por el método previo.
- En otra realización de la divulgación, Dicha célula aislada comprende un gen inactivado seleccionado del grupo que consiste en CD52, GR, PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10, 2B4, TCR alfa y 50 TCR beta y/o expresa un CAR, un CAR multicatenario y/o un transgén pTalfa. En otra realización de la divulgación, dicha célula aislada de acuerdo con la presente invención comprende dos genes inactivados seleccionados del grupo que consiste en CD52 y GR, CD52 y TCR alfa, CDR52 y TCR beta, GR y TCR alfa, GR y TCR beta, TCR alfa y TCR beta, PD1 y TCR alfa, PD1 y TCR beta, CTLA-4 y TCR alfa, CTLA-4 y TCR beta, LAG3 y TCR alfa, LAG3 y TCR beta, Tim3 y TCR alfa, Tim3 y TCR beta, BTLA y TCR alfa, BTLA y TCR beta, BY55 y TCR alfa, BY55 y TCR beta, TIGIT y 55 TCR alfa, TIGIT y TCR beta, B7H5 y TCR alfa, B7H5 y TCR beta, LAIR1 y TCR alfa, LAIR1 y TCR beta, SIGLEC10 y TCR alfa, SIGLEC10 y TCR beta, 2B4 y TCR alfa, 2B4 y TCR beta y/o expresa un CAR, un CAR multicatenario y/o un transgén pTalfa.
- En otra realización de la divulgación, el TCR se vuelve no funcional en las células de acuerdo con la invención al 60 inactivar el gen de TCR alfa y/o el o los genes de TCR beta. Las estrategias anteriores se usan más particularmente para evitar GvHD. En un aspecto particular de la presente divulgación, es un método para obtener células modificadas derivadas de un individuo, en el que dichas células pueden proliferar independientemente de la ruta de señalización de complejo principal de histocompatibilidad. Dicho método comprende las siguientes etapas:
- 65 (a) recuperar células de dicho individuo;

- (b) modificar genéticamente dichas células *ex vivo* inactivando los genes de TCR alfa o TCR beta;
- (c) cultivar los linfocitos T modificadas genéticamente *in vitro* en condiciones apropiadas para amplificar dichas células.

5 Las células modificadas, que pueden proliferar independientemente de la ruta de señalización de complejo principal de histocompatibilidad, son susceptibles a obtenerse por este método. Dichas células modificadas pueden usarse para tratar a pacientes que lo necesitan contra el rechazo de hospedador contra injerto (HvG) y la enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD); por lo tanto, en el presente documento también se describe un método de tratamiento de 10 pacientes que lo necesitan contra el rechazo de hospedador contra injerto (HvG) y la enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD), que comprende tratar a dicho paciente administrando a dicho paciente una cantidad eficaz de 15 células modificadas que comprenden genes inactivados de TCR alfa y/o TCR beta.

Aplicaciones terapéuticas

15 En otra realización, la célula aislada obtenida por los diferentes métodos o línea celular derivada de dicha célula aislada como se describe previamente, puede usarse como medicamento. En otra realización, dicho medicamento puede usarse para tratar el cáncer o infecciones en un paciente que lo necesita. En otra realización, dicha célula aislada de acuerdo con la invención o línea celular derivada de dicha célula aislada puede usarse en la fabricación de un 20 medicamento para el tratamiento de un cáncer o una infección vírica en un paciente que lo necesita.

En otro aspecto, la presente divulgación se basa en métodos para tratar pacientes que lo necesitan, comprendiendo dicho método al menos una de las siguientes etapas:

- 25 (a) proporcionar un linfocito T obtenible mediante uno cualquiera de los métodos descritos previamente;
- (b) administrar dichos linfocitos T transformados a dicho paciente,

30 En una realización, dichos linfocitos T puede experimentar una expansión robusta de los linfocitos T *in vivo* y pueden persistir durante una cantidad prolongada de tiempo.

Dicho tratamiento puede ser mitigante, curativo o profiláctico. Puede ser parte de una inmunoterapia autóloga o parte 35 de un tratamiento de inmunoterapia alogénica. Por autólogo, se entiende que las células, la línea celular o la población de células utilizadas para tratar pacientes se originan a partir de dicho paciente o de un donante compatible con el Antígeno Leucocitario Humano (HLA). Por alogénico se entiende que las células o la población de células utilizadas para tratar pacientes no son originarias de dicho paciente sino de un donante.

40 La invención es particularmente adecuada para inmunoterapia alogénica, en la medida en que permite la transformación de linfocitos T, normalmente obtenidas de donantes, en células no alorreactivas. Esto puede hacerse bajo protocolos estándar y reproducirse tantas veces como sea necesario. Los linfocitos T modificados resultantes pueden agruparse y administrarse a uno o varios pacientes, disponibles como producto terapéutico "disponible libremente".

45 Las células que pueden usarse con los métodos divulgados se describen en la sección previa. Dicho tratamiento puede usarse para tratar a pacientes diagnosticados con cáncer, infección vírica, trastornos autoinmunitarios o enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD). Los cánceres que pueden tratarse incluyen tumores que no están vascularizados, o aún no están sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Los cánceres 50 pueden comprender neoplasias hemolinfáticas (tales como tumores hemáticos, por ejemplo, leucemias y linfomas) o pueden comprender tumores sólidos. Los tipos de cánceres a tratar con los linfocitos T CAR descritos en el presente documento, pero sin limitación, carcinoma, blastoma y sarcoma, y ciertas leucemias o neoplasias linfoides, tumores benignos y malignos, y tumores malignos, por ejemplo, sarcomas, carcinomas y melanomas. También se incluyen tumores/cánceres de adultos y tumores/cánceres pediátricos.

55 El tratamiento puede ser combinado con una o más terapias contra el cáncer, seleccionada del grupo de terapia con anticuerpos, quimioterapia, terapia de citocinas, terapia de células dendríticas, terapia génica, terapia hormonal, terapia con luz láser y radioterapia.

60 De acuerdo con una realización preferida de la divulgación, dicho tratamiento puede administrarse a pacientes que experimentan un tratamiento inmunosupresor. De hecho, la presente divulgación se basa preferentemente en células o población de células, que se han hecho resistentes a al menos un agente inmunosupresor debido a la inactivación de un gen que codifica un receptor para dicho agente inmunosupresor. En este aspecto, el tratamiento inmunosupresor debe ayudar en la selección y expansión de los linfocitos T de acuerdo con la invención dentro del paciente.

65 La administración de las células o población de células de acuerdo con la presente divulgación puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluso por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía

subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa o intralinfática, o intraperitonealmente. En una realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran preferentemente mediante inyección intravenosa.

- 5 La administración de las células o población de células puede consistir en la administración de 10^4 - 10^9 células por kg de peso corporal, preferentemente de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal incluyendo todos los valores enteros de números de células dentro de esos intervalos. Las células o la población de células pueden administrarse en una o más dosis. En otra realización, dicha cantidad efectiva de células se administran como una dosis única. En otra realización de la divulgación, dicha cantidad efectiva de células se administra como más de una dosis durante un período de tiempo. El momento de la administración está a criterio del médico responsable y depende de la condición clínica del paciente. Las células o la población de células pueden obtenerse de cualquier fuente, como un banco de sangre o un donante. Si bien las necesidades individuales varían, la determinación de intervalos óptimos de cantidades efectivas de un tipo celular dado para una enfermedad o afecciones particulares dentro de la habilidad de la técnica. Una cantidad efectiva significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o profiláctico. La dosis administrada dependerá de la edad, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hubiera, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado.

En otra realización de la divulgación, dicha cantidad efectiva de células o composición que comprende esas células se administra por vía parenteral. Dicha administración puede ser una administración intravenosa. Dicha administración puede realizarse directamente mediante inyección dentro de un tumor.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, las células se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o siguiendo) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluidos, aunque sin limitaciones, el tratamiento con agentes como terapia antivírica, cidofovir e interleucina-2, El tratamiento con citarabina (también conocido como ARA-C) o nataliziimab para pacientes con EM o tratamiento con efaliztimab para pacientes con psoriasis u otros tratamientos para pacientes con LMP. En realizaciones adicionales, los linfocitos T de la invención pueden usarse en combinación con quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tal como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunoablativos tales como CAM PATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, 30 rapamicina, ácido micoplenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhiben la cinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina) (Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1 1; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Citrr. Opin. mm n. 5:763-773, 93). En una realización adicional, las composiciones celulares de la presente divulgación se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después) trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos T que utiliza agentes de quimioterapia, tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos, tales como OKT3 o CAMPATH, En otra realización, las composiciones celulares de la presente invención se administran después de la terapia ablativa de linfocitos B, tales como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con dosis altas de quimioterapia seguida de trasplante de 40 células madre de sangre periférica. Después del trasplante, los sujetos pueden recibir una infusión de los inmunocitos expandidos de la presente divulgación. Las células expandidas también pueden administrarse antes o después de cirugía. Dichas células modificadas obtenidas mediante uno cualquiera de los métodos descritos en la presente pueden usarse para tratar a pacientes que lo necesitan contra el rechazo de hospedador contra injerto (HvG) y la enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD); por lo tanto, en el alcance de la presente divulgación, es un método de tratamiento de pacientes que lo necesitan contra el rechazo de hospedador contra injerto (HvG) y la enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD), que comprende tratar a dicho paciente administrando a dicho paciente una cantidad eficaz de células modificadas que comprenden genes inactivados de TCR alfa y/o TCR beta.

Ejemplo de método para genomodificar células alogénicas humanas para inmunoterapia

- 50 Para una mejor comprensión de la divulgación, se ilustra un ejemplo de método para genomodificar células alogénicas humanas para inmunoterapia en la figura 5. El método comprende una combinación de una o varias de las siguientes etapas:
- 55 1. Proporcionar linfocitos T de un cultivo celular o de una muestra de sangre de un paciente individual o del banco de sangre y activar dichos linfocitos T usando microesferas activadoras anti-CD3/C28. Las microesferas proporcionan tanto señales principales como coestimulantes que son necesarias para la activación y expansión de linfocitos T.
- 60 2.
- 65 a) Transducir dichas células con transgén pTalfa o variante funcional del mismo para mantener la expresión en superficie de CD3 y permitir la expansión celular a través de la estimulación del complejo CD3. Se espera que la alteración de TCR elimine el complejo TCR y suprima la alorreactividad (GvHD), pero puede alterar la expansión de células alogénicas debido a la pérdida del componente de señalización CD3. Se espera que las células transducidas expresen la cadena pTalfa o variante funcional de la misma. Esta cadena pTalfa se

5 empareja con la cadena TCRbeta y los componentes de señalización CD3 para formar el complejo preTCR y, por tanto, restablecer un complejo CD3 funcional y mantener la activación o estimulación de células TCRalfa inactivadas. La transducción de linfocitos T con vector lentivírico pTalfa puede llevarse a cabo antes o después de la inactivación de TCRalfa.

10 5 b) Transducir dichas células con CAR multicatenarios permite redirigir los linfocitos T contra antígenos expresado en la superficie de células diana de diversas neoplasias malignas incluyendo linfomas y tumores sólidos. Para mejorar la función del dominio coestimulante, los inventores han diseñado un CAR multicatenario derivado de Fc ϵ RI como se describe previamente. La transducción puede llevarse a cabo antes o después de la inactivación de TCRalfa y los otros genes, tales como genes CD52.

15 10 5 3. Genomodificación de linfocitos T no alorreactivos y resistentes a inmunosupresión:

20 15 10 5 a) Es posible inactivar TCR alfa en dichas células para eliminar el TCR de la superficie de la célula y evitar el reconocimiento de tejido hospedador como exógeno por el TCR de las alogénicas y, por tanto, evitar GvHD.

25 20 15 10 5 b) Es posible también inactivar un gen que codifica una diana para agente inmunosupresor para hacer que dichas células sean resistentes al tratamiento inmunosupresor para evitar el rechazo de injertos sin afectar a los linfocitos T trasplantados. En este ejemplo, la diana de los agentes inmunosupresores es CD52 y el agente inmunosupresor es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD52.

30 25 20 15 10 5 Los inventores han demostrado que el uso de nucleasa TALE, permitiendo tasas mayores de eventos de DSB dentro de los linfocitos T fue particularmente ventajoso para conseguir la doble inactivación anterior en linfocitos T. Preferentemente, se inactivan los genes de TCRalfa y CD52 electroporando linfocitos T con ARNm que codifica una nucleasa TALE dirigida a dichos genes. Los inventores han descubierto que usar ARNm produjo una alta tasa de transformación que fue menos perjudicial para los linfocitos T y, por tanto, fue crucial en el proceso de genomodificación de linfocitos T. A continuación, los linfocitos T se clasifican usando microesferas magnéticas. Por ejemplo, los linfocitos T que expresan CD52 se retiran por fijación en una superficie sólida, y las células inactivadas no se exponen a la agresión de pasarlas a través de una columna. Este método suave aumenta la concentración de linfocitos T genomodificados apropiadamente.

35 30 25 20 15 10 5 4. Expansión *in vitro* de linfocitos T genomodificados antes de administración a un paciente o *in vivo* después de administración a un paciente a través de estimulación del complejo CD3. Antes de la etapa de administración, los pacientes pueden someterse a un tratamiento inmunosupresor tal como CAMPATH1-H, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD52.

40 35 30 25 20 15 10 5 5. Opcionalmente se expusieron dichas células con anticuerpos biespecíficos *ex vivo* antes de la administración a un paciente o *in vivo* después de la administración a un paciente para llevar las células genomodificadas a las proximidades de un antígeno diana.

45 40 35 30 25 20 15 10 5 Otras definiciones

- Los restos de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos se designan en el presente documento de acuerdo con el código de una letra, en los que, por ejemplo, Q significa Gln o resto de glutamina, R significa Arg o resto de arginina y D significa Asp o resto de ácido aspártico.
- Sustitución de aminoácido significa el reemplazo de un resto de aminoácido por otro, por ejemplo, el reemplazo de un resto de arginina con un resto de glutamina en una secuencia peptídica es una sustitución de aminoácidos.
- Los nucleótidos se designan del siguiente modo: se usa un código de una letra para designar la base de un nucleósido: a es adenina, t es timina, c es citosina y g es guanina. Para los nucleótidos degenerados, r representa g o a (nucleótidos púricos), k representa g o t, s representa g o c, w representa a o t, m representa a o c, y representa t o c (nucleótidos pirimidínicos), d representa g, a o t, v representa g, a o c, b representa g, t o c, h representa a, t o c, y n representa g, a, t o c.
- "Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "polinucleótidos" se refiere a nucleótidos y/o polinucleótidos, tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquiera de ligadura, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos de origen natural (tales como ADN y ARN) o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas enantioméricas de nucleótidos de origen natural) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases pirimidínicas o púricas. Las modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden functionalizarse como éteres o ésteres. Además, todo el resto de azúcar puede ser reemplazado por estructuras similares estérica y electrónicamente, tales como azúcares aza y análogos de azúcar carbocíclico. Los ejemplos de modificaciones

en un resto base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos mediante enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicanterios.

- 5 - por "polinucleótido que comprende sucesivamente una primera región de homología con secuencias en dirección 5' de dicha rotura de la doble cadena, una secuencia que se insertará en el genoma de dicha célula y una segunda 10 región de homología con secuencias en dirección 3' de dicha rotura bicanteraria" se pretende que signifique una construcción de ADN o una matriz que comprende una primera y segunda porción que son homólogas a las regiones 5' y 3' de una diana de ADN *in situ*. La construcción de ADN también comprende una tercera porción colocada entre la primera y la segunda porción que comprende alguna homología con la secuencia de ADN 15 correspondiente *in situ* o, como alternativa, no comprende homología con las regiones 5' y 3' de la diana de ADN *in situ*. Tras la escisión del ADN diana, se estimula un evento de recombinación homóloga entre el genoma que contiene el gen diana comprendido en el locus de interés y esta matriz, en el que la secuencia genómica que contiene la diana de ADN se reemplaza por la tercera porción de la matriz y una parte variable de la primera y segunda porciones de dicha matriz.
- por "ADN diana", "secuencia diana de ADN", "secuencia de ADN diana", "secuencia diana de ácido nucleico", "secuencia diana" o "sitio de procesamiento" se pretende una secuencia polinucleotídica a la que una 20 endonucleasa de sitio de corte infrecuente puede dirigirse y procesar como se describe en el presente documento. Estos términos se refieren a una localización de ADN específica, preferentemente una localización genómica en una célula, pero también una porción de material genético que puede existir independientemente del cuerpo principal de material genético, tal como plásmidos, episomas, virus, transposones o en orgánulos tales como las mitocondrias, como ejemplo no limitante. Como ejemplos no limitantes de dianas de nucleasa TALE, las secuencias 25 genómicas diana en general consisten en secuencias de 17 pb de longitud (denominadas semidianas) separadas por un espaciador de 15 pb. Cada semidiana se reconoce por repeticiones de las nucleasas TALE enumeradas en las tablas 2, 6, 7 y 11 como ejemplos no limitantes, codificadas en plásmidos, bajo el control de promotor EF1-alfa o el promotor T7. La secuencia diana de ácido nucleico está definida por la secuencia 5' a 3' de una hebra de dicha diana, como se indica en las tablas 2, 6, 7 y 11.
- 30 - Por receptor químérico de antígenos (CAR) se pretende moléculas que combinan un dominio de unión contra un componente presente en la célula diana, por ejemplo, una especificidad basada en anticuerpo para un antígeno deseado (por ejemplo, antígeno tumoral) con un dominio intracelular activador del receptor de linfocitos T para 35 generar una proteína químérica que muestre una actividad inmunitaria celular antidiana específica. En general, el CAR consiste en un anticuerpos monocatenario extracelular (scFvFc) fusionado al dominio de señalización intracelular de la cadena zeta del complejo receptor de antígenos de linfocitos T (scFvFc:ζ) y tiene la capacidad, cuando se expresa en linfocitos T, de redirigir el reconocimiento antigénico basado en la especificidad del anticuerpo monoclonal. Un ejemplo de CAR usado en la presente invención es un CAR dirigido contra el antígeno CD19 y puede comprender como ejemplo no limitante la secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 73
- 40 - Por "vector de liberación" o "vectores de liberación" se entiende cualquier vector de liberación que se pueda usar para poner en contacto celular (es decir, "contactar") o liberar dentro de células o compartimentos subcelulares (es decir, "introducir") agentes/sustancias químicas y moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) necesarios. Incluye, pero no se limita a vectores de liberación liposomales, vectores de liberación víricos, vectores de liberación de 45 fármacos, vehículos químicos, vehículos poliméricos, lipoplexos, poliplexos, dendrímeros, microburbujas (medios de contraste de ultrasonidos), nanopartículas, emulsiones u otros vectores de transferencia apropiados. Estos vectores de liberación permiten la liberación de moléculas, sustancias químicas, macromoléculas (genes, proteínas) u otros vectores, tales como plásmidos, péptidos desarrollados por Diatos. En estos casos, los vectores de liberación son vehículos de moléculas. Por "vector de liberación" o "vectores de liberación" también se pretenden métodos de administración para realizar transfección.
- 50 - Los términos "vector" o "vectores" se refieren a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un "vector" en el presente documento incluye, aunque no de forma limitativa, un vector vírico, un plásmido, un vector de ARN o una molécula de ARN o ADN lineal o circular que puede consistir en ácidos nucleicos cromosómicos, no cromosómicos, semisintéticos o sintéticos. Los vectores preferidos son aquellos 55 capaces de replicación autónoma (vector episomal) y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos (vectores de expresión). Los expertos en la materia conocen un gran número de vectores adecuados y están disponibles comercialmente.
- 60 Los vectores víricos incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa, tal como ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y virus de la estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de cadena positiva, tales como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN de doble cadena, incluyendo adenovirus, virus del herpes (por ejemplo, virus del herpes simple tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (por ejemplo, vaccinia, viruela aviar y viruela del canario). Otros virus incluyen el virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, 65 papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis, por ejemplo. Los ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis-sarcoma aviar, tipo C de mamífero, virus de tipo B, virus de tipo D, grupo HTLV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J. M.,

Retroviridae: The viruses and their replication, En Fundamental Virology, Tercera edición, B. N. Fields, *et al.*, Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1996).

- 5 - Por "vector lentivírico" se entiende vectores lentivíricos basados en el VIH que son muy prometedores para la liberación de genes debido a su capacidad de empaquetamiento relativamente grande, inmunogenicidad reducida y su capacidad para transducir de manera estable con alta eficiencia una amplia gama de diferentes tipos de células. Los vectores lentivíricos generalmente se generan después de la transfección transitoria de tres (empaquetamiento, envoltura y transferencia) o más plásmidos en las células productoras. Como el VIH, los vectores lentivíricos entran en la célula diana a través de la interacción de las glucoproteínas de la superficie vírica con los receptores en la superficie celular. Al entrar, el ARN del virus sufre transcripción inversa, que está mediada por el complejo de transcriptasa inversa del virus. El producto de la transcripción inversa es un ADN vírico lineal bicatenario, que es el sustrato para la integración vírica en el ADN de las células infectadas. Por "vectores lentivíricos integrativos (o VL)", se entiende vectores tales como ejemplo no limitante, que pueden integrarse en el genoma de una célula diana. Por el contrario, por "vectores lentivíricos no integrativos (o NILV)" se entiende vectores de liberación de genes eficientes que no se integran en el genoma de una célula diana a través de la acción de la integrasa del virus.
- 10 - Los vectores y vectores de liberación pueden asociarse o combinarse con cualquier técnica de permeabilización celular, tales como sonoporación o electroporación o derivados de estas técnicas.
- 15 - Por "célula" o "células" se entiende cualquier célula viva eucariota, células primarias y líneas celulares derivadas de estos organismos para cultivos *in vitro*.
- 20 - Por "célula primaria" o "células primarias" se entiende células tomadas directamente de tejido vivo (es decir, material de biopsia) y establecidas para el crecimiento *in vitro*, que han sufrido muy pocas duplicaciones de población y, por lo tanto, son más representativos de los principales componentes funcionales y características de los tejidos de los que derivan, en comparación con líneas celulares tumorigénicas continuas o inmortalizadas artificialmente.
- 25 - Como ejemplos no limitantes, las líneas celulares pueden seleccionarse del grupo que consiste en células CHO-K1; células HEK293; células Caco2; células U2-OS; células NIH 3T3; células NSO; células SP2; células CHO-S; células DG44; células K-562, células U-937; células MRC5; células IMR90; células Jurkat; células HepG2; células HeLa; células HT-1080; células HCT-116; células Hu-h7; células Huvec; células Molt 4.
- 30 - Todas estas líneas celulares pueden modificarse mediante el método del presente documento descrito para proporcionar modelos de líneas celulares para producir, expresar, cuantificar, detectar, estudiar un gen o una proteína de interés; estos modelos también se pueden utilizar para detectar moléculas biológicamente activas de interés en investigación y producción, y en varios campos como el químico, biocombustibles, terapéutica y agronomía como ejemplos no limitantes.
- 35 - por "mutación" se entiende la sustitución, delección, inserción de hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, catorce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta o más nucleótidos/aminoácidos en un polinucleótido (ADNc, gen) o una secuencia de polipéptidos. La mutación puede afectar a la secuencia de codificación de un gen o a su secuencia reguladora. También puede afectar a la estructura de la secuencia genómica o a la estructura/estabilidad del ARNm codificado.
- 40 - por "variante (s)", se entiende una variante repetida, una variante, una variante de unión al ADN, una variante de una nucleasa TALE, una variante de polipéptido obtenida por mutación o reemplazo de al menos un resto en la secuencia de aminoácidos de la molécula original.
- 45 - por "variante funcional" se entiende un mutante catalíticamente activo de una proteína o un dominio de proteína; dicho mutante puede tener la misma actividad en comparación con su proteína madre o dominio de proteína o propiedades adicionales, o actividad más alta o más baja.
- 50 - Por "gen" se entiende la unidad básica de la herencia, que consiste en un segmento de ADN dispuesto de manera lineal a lo largo de un cromosoma, que codifica una proteína específica o segmento de proteína. Un gen normalmente incluye un promotor, una región no traducida en 5', una o más secuencias de codificación (exones), opcionalmente intrones, una región no traducida en 3'. El gen puede comprender además un terminador, potenciadores y/o silenciadores.
- 55 - Como se usa en este documento, el término "locus" es la ubicación física específica de una secuencia de ADN (por ejemplo, de un gen) en un cromosoma. El término "locus" puede referirse a la ubicación física específica de una secuencia diana de endonucleasa de sitio de corte poco frecuente en un cromosoma. Dicho locus puede comprender una secuencia diana que se reconoce y/o escinde por una endonucleasa de sitio de corte infrecuente como se describe en el presente documento. Se entiende que el locus de interés no solo puede calificar una secuencia de ácido nucleico que existe en el cuerpo principal del material genético (es decir, en un cromosoma)

de una célula, sino también una porción de material genético que puede existir independientemente a dicho cuerpo principal de material genético, tal como los plásmidos, episomas, virus, transposones o en orgánulos como las mitocondrias como ejemplos no limitantes.

- 5 - La expresión "endonucleasa" se refiere a cualquier enzima de tipo silvestre o variante que pueda catalizar la hidrólisis (escisión) de enlaces entre ácidos nucleicos dentro de una molécula de ADN o ARN, preferentemente, una molécula de ADN. Las endonucleasas no escinden la molécula de ADN o ARN independientemente de su secuencia, sino que reconocen y escinden la molécula de ADN o ARN en secuencias polinucleotídicas específicas, denominadas adicionalmente "secuencias diana" o "sitios diana". Las endonucleasas pueden clasificarse como endonucleasas de sitio de corte infrecuente cuando tienen normalmente un sitio de reconocimiento polinucleotídico mayor de 12 pares de bases (pb) de longitud, más preferentemente de 14-55 pb. Las endonucleasas de sitio de corte infrecuente aumentan significativamente la HR induciendo roturas bicatenarias (DSB) del ADN en un locus definido (Rouet, Smith *et al.* 1994; Choulika, Perrin *et al.* 1995; Pingoud y Silva 2007). Las endonucleasas de sitio de corte infrecuente pueden ser, por ejemplo, una endonucleasa de asentamiento (Paques y Duchateau 2007), una nucleasa químérica de dedos de cinc (ZFN) resultante de la fusión de dominios de dedos de cinc genomodificados con el dominio catalítico de una enzima de restricción tal como FokI (Porteus y Carroll 2005) o una endonucleasa química (Eisenschmidt, Lanio *et al.* 2005; Arimondo, Thomas *et al.* 2006). En endonucleasas químicas, un escindidor químico o peptídico se conjuga con un polímero de ácidos nucleicos o con otro ADN que reconozca una secuencia diana específica, dirigiendo de ese modo la actividad de escisión a una secuencia específica. Las endonucleasas químicas también abarcan nucleasas sintéticas como conjugados de ortofenantrolina, una molécula de escisión de ADN y oligonucleótidos que forman estructuras tricatenarias (TFO), que se sabe que se unen a secuencias de ADN específicas (Kalish y Glazer 2005). Dichas endonucleasas químicas están comprendidas en el término "endonucleasa" usado en el presente documento.
- 10 25 Las endonucleasas de sitio de corte infrecuente también pueden ser, por ejemplo, nucleasas TALE, una nueva clase de nucleasas químéricas que usan un dominio catalítico de FokI y un dominio de unión a ADN derivado del efecto de tipo activador de la transcripción (TALE), una familia de proteínas usadas en el proceso de infección por patógenos vegetales del género *Xanthomonas* (Boch, Scholze *et al.* 2009; Moscou y Bogdanove 2009; Christian, Cermak *et al.* 2010; Li, Huang *et al.*). La disposición funcional de una nucleasa TALE basada en FokI (nucleasa TALE) es esencialmente la de una ZFN, estando el dominio de unión a ADN de dedos de cinc remplazado por el dominio TALE. Como tal, la escisión de ADN por una nucleasa TALE requiere dos regiones de reconocimiento de ADN flanqueando una región centro inespecífica. Las endonucleasas de sitio de corte infrecuente también pueden derivar de nucleasas TALE.
- 30 35 La endonucleasa de sitio de corte infrecuente puede ser una endonucleasa de asentamiento, también conocida con el nombre de meganucleasa. Dichas endonucleasas de asentamiento son bien conocidas en la técnica (Stoddard 2005). Las endonucleasas de asentamiento reconocen una secuencia diana de ADN y generan una rotura monocatenaria o bicatenaria. Las endonucleasas de asentamiento son altamente específicas, reconocen los sitios diana del ADN que varían de 12 a 45 pares de bases (pb) de longitud, habitualmente varían de 14 a 40 pb de longitud.
- 40 45 50 55 60 65 La endonucleasa de asentamiento puede corresponder, por ejemplo, a una endonucleasa LAGLIDADG, a una endonucleasa HNH o a una endonucleasa GIY-YIG. La endonucleasa de asentamiento preferida puede ser una I-Cre/ variante.
- Por una "nucleasa TALE" (TALEN) se pretende una proteína de fusión que consiste en un dominio de unión a ácido nucleico normalmente derivado de un efecto de tipo activador de la transcripción (TALE) y un dominio catalítico de nucleasa para escindir una secuencia diana de ácido nucleico. El dominio catalítico es preferentemente un dominio de nucleasa y más preferentemente un dominio que tiene actividad endonucleasa, como, por ejemplo, I-TevI, ColE7, NucA y Fok-I. En una realización particular, el dominio TALE puede fusionarse a una meganucleasa como, por ejemplo, I-CreI e I-OnuI o variante funcional de las mismas. En una realización más preferida, dicha nucleasa es una nucleasa TALE monomérica. Una nucleasa TALE monomérica es una nucleasa TALE que no requiere dimerización para reconocimiento y escisión específicos, tal como las fusiones de repeticiones TAL genomodificadas con el dominio catalítico de I-TevI descrito en el documento WO2012138927. Los efectores de tipo activador de la transcripción (TALE) son proteínas de la especie bacteriana *Xanthomonas* que comprenden una pluralidad de secuencias repetidas, comprendiendo cada repetición disresiduos en la posición 12 y 13 (RVD) que son específicos para cada base nucleotídica de la secuencia diana de ácido nucleico. También pueden obtenerse dominios de unión con propiedades de unión a ácido nucleico modulares base-a-base (MBBBD) similares de nuevas proteínas modulares descubiertas recientemente por el solicitante en una especie bacteriana diferente. Las nuevas proteínas modulares tienen la ventaja de presentar más variabilidad de secuencia que las repeticiones de TAL. Preferentemente, los RVD asociados con el reconocimiento de los diferentes nucleótidos son HD para reconocer C, NG para reconocer T, NI para reconocer A, NN para reconocer G o A, NS para reconocer A, C, G o T, HG para reconocer T, IG para reconocer T, NK para reconocer G, HA para reconocer C, ND para reconocer C, HI para reconocer C, HN para reconocer G, NA para reconocer G, SN para reconocer G o A e YG para reconocer T, TL para reconocer A, VT para reconocer A o G y SW para reconocer A. En otra realización, los aminoácidos críticos 12 y 13 pueden mutar hacia otros restos de aminoácidos para modular su especificidad hacia los nucleótidos A, T, C y G, y en particular para mejorar esta especificidad. La nucleasa TALE ya se ha descrito y usado para estimular la selección génica dirigida y las modificaciones génicas (Boch, Scholze *et al.* 2009; Moscou

y Bogdanove 2009; Christian, Cermak *et al.* 2010; Li, Huang *et al.*). Dichas nucleasas TAL genomodificadas están disponibles en el mercado con el nombre comercial TALEN™ (Celllectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 París, Francia).

- 5 - El término "escisión" se refiere a la rotura del esqueleto covalente de un polinucleótido. La escisión puede iniciarse mediante varios métodos que incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrólisis enzimática o química de un enlace fosfodiéster. Es posible la escisión de cadena sencilla y la escisión de cadena doble y la división de cadena doble puede producirse como resultado de dos eventos de escisión de cadena sencilla. La escisión de doble cadena de ADN, ARN o ADN/ARN híbrido puede dar como resultado la producción de extremos romos o extremos escalonados.
- 10 - Por "proteína de fusión" se entiende el resultado de un proceso bien conocido en la técnica que consiste en la unión de dos o más genes que originalmente codifican proteínas separadas o parte de ellas, la traducción de dicho "gen de fusión" da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales.
- 15 - "Identidad", se refiere a la identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico o polipéptidos. La identidad se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear a efectos de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. Un grado de similitud o identidad entre las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos es una función del número de nucleótidos idénticos o coincidentes en las posiciones compartidas por las secuencias de ácido nucleico. Se pueden usar varios algoritmos y/o programas de alineación para calcular la identidad entre dos secuencias, incluidos FASTA o BLAST, que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencia GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y se pueden usar con, por ejemplo, configuración predeterminada. Por ejemplo, polipéptidos que tiene al menos un 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con polipéptidos específicos descritos en la presente memoria que muestra sustancialmente las mismas funciones, así como polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, se contemplan.
- 20 - "Similitud" describe la relación entre las secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos. También puede usarse BLASTP para identificar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 % de similitud de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia usando una matriz de similitud tal como BLOSUM45, BLOSUM62 o BLOSUM80. Salvo que se indique de otro modo, una puntuación de similitud se basará en el uso de BLOSUM62. Cuando se usa BLASTP, el porcentaje de similitud se basa en la puntuación de positivos de BLASTP y el porcentaje de identidad de secuencia se basa en la puntuación de identidades de BLASTP. Las "identidades" de BLASTP muestran el número y fracción de residuos totales en los pares de secuencias de alta puntuación que son idénticos; y los "positivo" de BLASTP muestran el número y fracción de residuos para los que las puntuaciones de alineación tienen valores positivos y que son similares entre sí. Se contemplan secuencias de aminoácidos que tienen estos grados de identidad o similitud o cualquier grado intermedio de identidad o similitud con las secuencias de aminoácidos divulgados en el presente documento y están abarcadas por esta divulgación. Las secuencias polinucleotídicas de polipéptidos similares se deducen usando el código genético y pueden obtenerse por medios convencionales. Por ejemplo, una variante funcional de pTalfa puede tener un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 % de similitud de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107. Un polinucleótido que codifica dicha variante funcional se produciría por retrotraducción de su secuencia de aminoácidos usando el código genético.
- 30 - "dominio de transducción de señales" o "ligando coestimulador" se refiere a una molécula en una célula presentadora de antígeno que se une específicamente a una molécula coestimuladora relacionada en un linfocito T, proporcionando de este modo una señal que, además de la señal primaria proporcionada mediante, por ejemplo, la unión de un complejo de TCR/CD3 con una molécula del MHC cargada con péptido, media en una respuesta de linfocitos T, incluyendo, aunque no de forma limitativa, activación de proliferación, la diferenciación y similares. Un ligando coestimulador puede incluir, pero sin limitaciones, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando coestimulante inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intercelular (ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, receptor de linfoxina beta, 3/TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une con el receptor de ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando coestimulador también abarca, entre otras cosas, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula coestimulante presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitaciones, CD27, CD28, 4-IBB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, anticuerpo 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83.
- 40 - Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo en una respuesta coestimulante por la célula, tal como, pero sin limitación, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y receptor de ligando Toll.
- 50 - Una "señal coestimuladora", como se usa en el presente documento, se refiere a una señal, que, en combinación con
- 55 -
- 60 -
- 65 -

Una "molécula coestimuladora" se refiere al compañero de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando coestimulador, mediando de este modo en una respuesta coestimulante por la célula, tal como, pero sin limitación, proliferación. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula del MHC de clase I, BTLA y receptor de ligando Toll.

Una "señal coestimuladora", como se usa en el presente documento, se refiere a una señal, que, en combinación con

la señal primaria, tal como la ligadura TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o regulación por aumento o disminución de las moléculas clave.

- 5 - "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene sitios de unión para dos antígenos diferentes dentro de una sola molécula de anticuerpo. Los expertos en la materia apreciarán que otras moléculas además de la estructura del anticuerpo canónico pueden construirse con dos especificidades de unión. Se apreciará además que la unión al antígeno por anticuerpos biespecíficos puede ser simultánea o secuencial. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante técnicas químicas (véase, por ejemplo, Kranz *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5807), por técnicas de "polidoma" (véase la patente de Estados Unidos n.º 4,474,893) o mediante técnicas de 10 ADN recombinante, que todos son conocidos *per se*. Como ejemplo no limitante, cada dominio de unión comprende al menos una región variable de una cadena pesada de anticuerpo ("región VH o H"), en el que la región VH del primer dominio de unión se une específicamente al marcador de linfocitos tal como CD3, y la región VH del segundo dominio de unión se une específicamente al antígeno tumoral.
- 15 10 - La expresión "dominio extracelular de unión a ligando", como se usa en el presente documento, se define como un oligo o polipéptido que puede unirse a un ligando. Preferentemente, el dominio será capaz de interaccionar con una molécula de superficie celular. Por ejemplo, el dominio de unión a ligando extracelular puede elegirse para reconocer un ligando que actúa como un marcador de superficie celular en células diana con una patología particular. Así, los ejemplos de marcadores de la superficie celular que pueden actuar como ligandos incluyen 20 aquellos asociados con infecciones víricas, bacterianas y parasitarias, enfermedad autoinmunitaria y células cancerosas.

El término "sujeto" o "paciente", como se usa en el presente documento, incluye todos los miembros del reino animal, incluidos los primates no humanos y los seres humanos.

- 25 20 La descripción escrita anterior de la divulgación proporciona una manera y proceso de hacerla y usarla de tal manera que cualquier persona experta en esta técnica esté habilitada para hacerla y usarla, estando esta habilitación proporcionada en particular para el objeto de las reivindicaciones adjuntas, que forman parte de la descripción original.
- 30 Cuando se indique un límite numérico o un intervalo en este documento, los puntos extremos se incluyen. Además, todos los valores y subintervalos dentro de un límite o intervalo numérico se incluyen específicamente como si se hubieran escrito explícitamente.
- 35 La descripción anterior se presenta para posibilitar que un experto en la materia haga y use la invención, y se proporciona en el contexto de una aplicación particular y sus requisitos. Diversas modificaciones a las realizaciones preferidas serán muy evidentes para los expertos en la materia, y los principios genéricos definidos en el presente documento pueden aplicarse a otras realizaciones y aplicaciones. Por tanto, no se pretende que esta invención esté limitada a las realizaciones mostradas.
- 40 Habiendo descrito generalmente la presente invención, se puede obtener una mayor comprensión haciendo referencia a ciertos ejemplos específicos, que se proporcionan en el presente documento solo con fines ilustrativos y no se pretende que sean limitantes, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplos

45 Ejemplo 1: Nucleasas TALE que escinden el gen GR humano

50 Se diseñaron y produjeron seis nucleasas TALE heterodiméricas dirigidas a exones del gen GR humano. La tabla 2 a continuación indica las secuencias diana escindidas por cada nucleasa TALE. La nucleasa TALE de GR estaba compuesta por dos entidades independientes (llamadas seminucleasas TALE), conteniendo cada una de ellas una secuencia de repetición genomodificada para que se una y escinda entre secuencias diana de GR que consisten en dos secuencias de 17 pb de longitud (llamadas semidiana) separadas por un espaciador de 15 pb.

55 **Tabla 2:** Descripción de las nucleasas TALE de GR y secuencias de los sitios diana de nucleasas TALE en el gen de GR humano.

Nombre de la diana	Secuencia diana	Secuencia de repetición	Secuencia de la seminucleasa TALE
GRex2	TATTCACTGATGGACTC caaagaatcattaac TCCTGGTAGAGAAGAAA (SEQ ID NO: 1)	Repetición GRex2-LPT9-L1 (SEQ ID NO: 7)	GRex2-LTALEN (SEQ ID NO: 19)
		Repetición -GRex2-LPT9-R1 (SEQ ID NO: 8)	GRex2-R TALEN (SEQ ID NO: 20)

(continuación)

Nombre de la diana	Secuencia diana	Secuencia de repetición	Secuencia de la seminucleasa TALE
GRex3T2	TGCTGGTGTGCTCTGA tgaagcttcaggatg TCATTATGGAGTCTTAA (SEQ ID NO: 2)	Repetición -GRex3T2-L1 (SEQ ID NO: 9)	GRex3T2-L TALEN (SEQ ID NO: 21)
		Repetición -GRex3T2-R1 (SEQ ID NO: 10)	GRex3T2-R TALEN (SEQ ID NO: 22)
GRex3T4	TGCTCTGATGAAGCTTC aggatgtcattatgg AGTCTTAACCTGTGGAA (SEQ ID NO: 3)	Repetición -GRex3T4-L1 (SEQ ID NO: 11)	GRex3T4-L TALEN (SEQ ID NO: 23)
		Repetición -GRex3T4-R1 (SEQ ID NO: 12)	GRex3T4-R TALEN (SEQ ID NO: 24)
GRex5T1	TGGTGTCACTGTTGGAG gttattgaacctgaa GTGTTATATGCAGGATA (SEQ ID NO: 4)	Repetición -GRex5T1-LPT8-L1 (SEQ ID NO: 13)	GRex5T1-L TALEN (SEQ ID NO: 25)
		Repetición -GRex5T1-LPT8-R1 (SEQ ID NO: 14)	GRex5T1-R TALEN (SEQ ID NO: 26)
GRex5T2	TATGATAGCTCTGTTCC agactcaacttggag GATCATGACTACGCTCA (SEQ ID NO: 5)	Repetición -GRex5T2-L1 (SEQ ID NO: 15)	GRex5T2-L TALEN (SEQ ID NO: 27)
		Repetición -GRex5T2-R1 (SEQ ID NO: 16)	GRex5T2-R TALEN (SEQ ID NO: 28)
GRex5T3	TTATATGCAGGATATGA tagctctgttcaga CTCAACTGGAGGATCA (SEQ ID NO: 6)	Repetición -GRex5T3-L1 (SEQ ID NO: 17)	GRex5T3-L TALEN (SEQ ID NO: 29)
		Repetición -GRex5T3-R1 (SEQ ID NO: 18)	GRex5T3-R TALEN (SEQ ID NO: 30)

Las secuencias de aminoácidos de los dominios N terminal, C terminal y la repetición se basan en la AvrBs3 TALE (ref: GenBank: X16130.1). Los dominios C terminal y N terminal están separados por dos sitios de restricción BsmBI.

- 5 Las matrices de repeticiones (SEQ ID NO: 7 a 18), dirigidas a las secuencias deseadas (SEQ ID NO: 1 a 6) se sintetizaron usando un método en soporte sólido compuesto de etapas consecutivas de restricción/ligamiento/lavado (solicitud PCT internacional WO2013/017950). En resumen, el primer bloque (que codifica una dirrepetición) se inmovilizó en un soporte sólido a través de interacción de biotina/estreptavidina, el segundo bloque (trirrepetición) se ligó entonces al primero y después de digestión con SfaNI se acopló un tercer bloque (trirrepetición). El proceso se repitió usando bloque de tri- o dirrepetición tras obtener la matriz de repeticiones deseada. Entonces se clonó el producto en un plásmido de clonación pAPG10 clásico para amplificación en *E. coli* y se secuenció. Las secuencias de la matriz de repeticiones obtenidas de este modo se subclonaron en un vector de TALE de expresión en levaduras usando las enzimas de restricción de tipo IIS BsmBI para el plásmido que recibe y BbvI y SfaNI para la secuencia de repetición insertada. El ADN codificante de la seminucleasa TALE, que contiene un dominio de unión a ADN derivado de TALE fusionado al dominio catalítico de la enzima de restricción FokI, se amplificó en *E. coli*, se recuperó por técnicas miniprep convencionales y se secuenció para evaluar la integridad de la inserción.

Actividad de nucleasas TALE de GR en levadura:

- 20 La actividad nucleasa de las seis nucleasas GR-TALE se ensayó a 37 °C y 30 °C en nuestro ensayo de SSA de levadura descrito previamente (solicitudes PCT internacionales WO 2004/067736) y en (Epinat, Arnould *et al.* 2003; Chames, Epinat *et al.* 2005; Arnould, Chames *et al.* 2006; Smith, Grizot *et al.* 2006) en dianas que contenían las dos secuencias diana de TALE encaradas entre sí en la hebra de ADN separadas por un espaciador de 15 pb que dan como resultado las SEQ ID NO: 1 a 6. Todos los plásmidos indicadores de diana de levadura que contenían las secuencias diana de ADN de nucleasa TALE se construyeron como se describe previamente (solicitudes internacionales PCT WO 2004/067736) y en (Epinat, Arnould *et al.* 2003; Chames, Epinat *et al.* 2005; Arnould, Chames *et al.* 2006; Smith, Grizot *et al.* 2006). Los niveles de actividad de escisión de nucleasa TALE, en levaduras, de clones individuales en las dianas se presentan en la tabla 3.

Tabla 3: Actividad de escisión de las nucleasas TALE de GR en levadura.

Diana	Seminucleasa TALE transfectada	levadura gal37 °C	levadura gal30 °C
GRex2	Grex2-L TALEN	1	1
	Grex2-R TALEN		
GRex3T2	GRex3T2-L TALEN	0,92	0,87
	GRex3T2-R TALEN		
GRex3T4	GRex3T4-L TALEN	0,94	0,87
	GRex3T4-R TALEN		
GRex5T1	GRex5T1-L TALEN	0,48	0,36
	GRex5T1-R TALEN		
GRex5T2	GRex5T2-L TALEN	0,97	0,91
	GRex5T2-R TALEN		
GRex5T3	GRex5T3-L TALEN	1	0,98
	GRex5T3-R TALEN		

Los valores están comprendidos entre 0 y 1. El valor máximo es 1.

Actividad de nucleasas TALE de GR en células HEK293:

- 5 Cada construcción de nucleasa TALE se subclonó usando digestión con enzimas de restricción en un vector de expresión de mamífero bajo el control de un promotor largo de pEF1alfa.
- 10 Un día antes de la transfección se sembraron un millón de células HEK293. Las células se cotransfectaron con 2,5 µg de cada uno de dos plásmidos que codifican la mitad izquierda y derecha de la nucleasa TALE GRex2, GRex3T2, GRex3T4, GRex5T1, GRex5T2 o GRex5T3 que reconocen las dos semidianas de las secuencias genómicas de interés en el gen GR bajo el control del promotor EF1alfa usando 25 µl de Lipofectamine (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como control, las células se cotransfectaron con 2,5 µg de cada uno de los dos plásmidos que codifican la mitad izquierda y la derecha de nucleasas TALE dirigidas al sitio diana de la región de la cadena constante alfa del receptor de linfocitos T (TRAC_T01) ((nucleasa TALE TRAC_T01-L y -R (SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, sitio diana TRAC_T01 (SEQ ID NO: 37)) bajo el control del promotor EF1alfa. La rotura bicatenaria generada por las nucleasas TALE en la secuencia codificante de GR induce unión de extremos no homólogos (NHEJ), que es un mecanismo propenso a errores. La actividad de las nucleasas TALE se mide por la frecuencia de inserciones o delecciones en el locus genómico diana.
- 15 20 Unos 2 o 7 días después de la transfección las células se recogieron y se realizaron PCR específicas de locus en el ADN genómico extraído usando los siguientes cebadores: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTCTCCGACTCAG-3' (secuencia adaptadora directa)- 10N (TAG)- secuencia directa específica de locus para el exón 2 de GR: 5'-GGTCATTAAACAAGCTGCC-3' (SEQ ID NO: 31), para el exón 3 de GR: 5'-GCATTCTGACTATGAAGTGA-3' (SEQ ID NO: 32) y para el exón 5 de GR: 5'-TCAGCAGGCCACTACAGGAGTCTCACAAAG-3' (SEQ ID NO: 33) y el cebador inverso 5'-CCTATCCCTGTGCGCTTGGCAGTCTCAG-3' (secuencia adaptadora inversa)- secuencia inversa específica de locus para el exón 2 de GR: 5'-AGCCAGTGAGGGTGAAGACG-3' (SEQ ID NO: 34), para el exón 3 de GR: 5'-GGGCTTGCATATAATGGAA-3' (SEQ ID NO: 35) y para el exón 5 de GR: 5'-CTGACTCTCCCTCATAGTCCCCAGAAC-3' (SEQ ID NO: 36).
- 25 30 35 Los productos de PCR se secuenciaron mediante un sistema de secuenciación 454 (454 Life Sciences). Se obtuvieron aproximadamente 10.000 secuencias por producto de PCR y luego se analizaron para detectar la presencia de eventos de inserción o delección específicos del sitio. La tabla 4 indica el porcentaje de las secuencias que mostraban inserciones o delecciones en el sitio diana de nucleasa TALE entre el número total de secuencias en la muestra. En la tabla 4 se enumeran para GRex2, GRex3T2 y GRex3T4 los resultados de un experimento representativo.
- 40 En todos los casos ensayados, el % de mutagénesis fue similar en el día 7 en comparación con el de la muestra en el día 2 después de la transfección. También se analizó la naturaleza de los eventos mutagénicos, poniendo de manifiesto una mayoría de delecciones en todos los casos en comparación con las inserciones.

Tabla 4: Porcentaje de mutagénesis dirigida en sitios diana de nucleasa TALE endógenos en células HEK293.

Diana	% de indeles a los 2 días con transfección de nucleasa TALE de GR	% de indeles a los 7 días con transfección de nucleasa TALE de GR	% de indeles a los 2 días con transfección de control con nucleasa TALE TRAC_T01
GRex2	20,3	24,9	0,5
GRex3T2	9,3	9,8	0

(continuación)

Diana	% de indeles a los 2 días con transfección de nucleasa TALE de GR	% de indeles a los 7 días con transfección de nucleasa TALE de GR	% de indeles a los 2 días con transfección de control con nucleasa TALE TRAC_T01
GRex3T4	19	18,3	0,0
GRex5T1	11,2	NA	0,7
GRex5T2	3,4	NA	0
GRex5T3	8,3	NA	0

Actividad de nucleasas TALE de GR en linfocitos T primarios:

- 5 Cada construcción de nucleasa TALE se subclonó usando digestión con enzimas de restricción en un vector de expresión bajo el control de un promotor T7.
- 10 El ARNm que codifica nucleasas TALE que escinden secuencias genómicas de GR se sintetizó a partir de cada plásmido que portaba las secuencias codificantes en dirección 3' del promotor T7. Los linfocitos T aislados de la sangre periférica se activaron durante 5 días usando microesferas activadoras anti-CD3/CD28 (Life Technologies) y luego se transfecaron 5 millones de células mediante electroporación con 10 µg de cada uno de los 2 ARNm que codifican las seminucleasas TALE usando un instrumento CytoLVT-P (aparato BTX-Harvard). Los linfocitos T transfectados con 10 µg de cada uno de los 2 ARNm que codifican las dos seminucleasas TALE dirigidas al gen CD52 (TALEN CD52_T02-L y -R (SEQ ID NO: 55 y 56), secuencia diana CD52_T02 SEQ ID NO: 40) se usan como control.
- 15 15 A los 3 y 7 días después de la transfección, se aisló el ADN genómico de las células transfectadas y se realizaron PCR específicas de locus usando los cebadores descritos previamente. Los productos de PCR se secuenciaron mediante un sistema de secuenciación 454 (454 Life Sciences). Se obtuvieron aproximadamente 10.000 secuencias por producto de PCR y luego se analizaron para detectar la presencia de eventos de inserción o delección específicos del sitio; los resultados se encuentran en la tabla 5.
- 20 20

Tabla 5: Porcentaje de mutagénesis dirigida en sitios diana de nucleasa TALE endógenos en linfocitos T primarios.

Diana	% de indeles en el día 3 con transfección de nucleasa TALE de GR	% de indeles en el día 7 con transfección de nucleasa TALE de GR	% de indeles en el día 3 con transfección de control con nucleasa TALE de CD52
GRex2	26,2	30,7	0,7
GRex3T2	1,09	0,86	0,02
GRex3T4	6,3	6,93	0
GRex5T1	0,04	0,035	0,05
GRex5T2	1,3	1,0	0,22
GRex5T3	17,4	NA	0,41

- 25 Ejemplo 2: Nucleasas TALE que escinden el gen CD52 humano, la cadena constante alfa del receptor de linfocitos T humano (TRAC) y las cadenas 1 y 2 constantes beta del receptor de linfocitos T humano (TRBC)

Como se describió en el ejemplo 1, se diseñaron y produjeron nucleasas TALE heterodiméricas dirigidas respectivamente a los genes CD52, TRAC y TRBC. Las secuencias genómicas diana consisten en dos secuencias de 17 pb de longitud (denominadas semidianas) separadas por un espaciador de 11 o 15 pb. Cada semidiana se reconoce por repeticiones de las seminucleasas TALE enumeradas en la 6. El genoma humano contiene dos cadenas beta de receptor de linfocitos T funcionales (TRBC1 y TRBC2). Durante el desarrollo de linfocitos T alfa/beta, se selecciona una de estas dos cadenas constantes en cada célula para unirla a la región variable de TCR-beta y formar una cadena beta funcional de longitud completa. Las 2 dianas de TRBC se eligieron en secuencias conservadas entre TRBC1 y TRBC2 de modo que la nucleasa TALE correspondiente escindiría tanto TRBC1 como TRBC2 al mismo tiempo.

35

Tabla 6: Descripción de las nucleasas TALE de CD52, TRAC y TRBC y secuencias de los sitios diana de las nucleasas TALE en los genes correspondientes humanos.

Diana	Secuencia diana	Secuencia de repetición	Seminucleasa TALE
TRAC_T01	TTGTCCCCACAGATATCC Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGA (SEQ ID NO: 37)	Repetición TRAC_T01-L (SEQ ID NO: 41)	TRAC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 49)
		Repetición TRAC_T01-R (SEQ ID NO: 42)	TRAC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 50)

(continuación)

Diana	Secuencia diana	Secuencia de repetición	Seminucleasa TALE
TRBC_T01	TGTGTTGAGCCATCAG aagcagagatctccc ACACCCAAAAGGCCACA (SEQ ID NO: 38)	Repetición TRBC_T01-L (SEQ ID NO: 43)	TRBC_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 51)
		Repetición TRBC_T01-R (SEQ ID NO: 44)	TRBC_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 52)
TRBC_T02	TTCCCACCCGAGGTCGC tgtgttgagccatca GAAGCAGAGATCTCCA (SEQ ID NO: 39)	Repetición TRBC_T02-L (SEQ ID NO: 45)	TRBC_T02-L TALEN (SEQ ID NO: 53)
		Repetición TRBC_T02-R (SEQ ID NO: 46)	TRBC_T02-R TALEN (SEQ ID NO: 54)
CD52_T02	TTCCTCCTACTCACCAT cagccctcggttat GGTACAGGTAAGAGCAA (SEQ ID NO: 40)	Repetición CD52_T02-L (SEQ ID NO: 47)	CD52_T02-L TALEN (SEQ ID NO: 55)
		Repetición CD52_T02-R (SEQ ID NO: 48)	CD52_T02-R TALEN (SEQ ID NO: 56)

Se han diseñado otras secuencias diana en los genes TRAC y CD52, que se muestran en la tabla 7.

5

Tabla 7: Secuencias diana adicionales para nucleasas TALE de TRAC y CD52.

Diana	Secuencia diana
TRAC_T02	TTTAGAAAGTTCCCTGTG atgtcaagctggtcg AGAAAAGCTTGAAACA (SEQ ID NO: 57)
TRAC_T03	TCCAGTGACAAGTCTGT ctgcctattcaccga TTTTGATTCTCAAACAA (SEQ ID NO: 58)
TRAC_T04	TATATCACAGACAAAAAC tgtgctagacatgag GTCTATGGACTTCAAGA (SEQ ID NO: 59)
TRAC_T05	TGAGGTCTATGGACTTC aagagcaacagtgtct GTGGCCTGGAGCAACAA (SEQ ID NO: 60)
CD52_T01	TTCCCTTCTCCTCCTAC caccatcagcctcct TTACCTGTACCATAAC (SEQ ID NO: 61)
CD52_T04	TTCCCTCCTACTCACCA cagccctcctgg TCTTACCTGTACCATA (SEQ ID NO: 62)

(continuación)

Diana	Secuencia diana
CD52_T05	TCCTACTCACCATCAG ctcctggttat TTGCTCTTACCTGTAC (SEQ ID NO: 63)
CD52_T06	TTATCCCACCTCTCCT ctacagatacaaact TTTGTGAGAGTC (SEQ ID NO: 64)
CD52_T07	TGGACTCTCAGGACAA acgacaccagccaaa TGCTGAGGGCTGCTG (SEQ ID NO: 65)

Actividad de la nucleasa CD52-TALE, nucleasa TALE-TRAC y nucleasa TRBC-TALE en células HEK293

5 Cada construcción de nucleasa TALE se subclonó usando digestión con enzimas de restricción en un vector de expresión de mamífero bajo el control del promotor largo de pEF1alfa. Un día antes de la transfección se sembraron un millón de células HEK293. Las células se cotransfectaron con 2,5 µg de cada uno de los dos plásmidos que codifican las nucleasas TALE que reconocen las dos semidianas en la secuencia genómica de interés en el gen CD52, la región de cadena constante alfa del receptor de linfocitos T (TRAC) o la región de cadena constante beta del receptor de linfocitos T (TRBC) bajo el control del promotor EF1-alfa o 5 µg de un vector pUC de control (pCLS0003) usando 10 25 µl de Lipofectamine (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La escisión bicatenaria generada por las nucleasas TALE en las secuencias codificantes de CD52 o TRAC se repara en células vivas mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ), que es un mecanismo propenso a errores. La actividad de las nucleasas TALE en células vivas se mide por la frecuencia de inserciones o delecciones en el locus genómico diana. 48 horas después de la transfección, se aisló el ADN genómico de las células transfectadas y se realizaron PCR específicas de locus 15 utilizando los siguientes cebadores: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTCTCCGACTCAG (secuencia adaptadora directa)-10N (TAG)- secuencia directa específica de locus para CD52: 5'-CAGATCTGCAGAAAGGAAGC-3' (SEQ ID NO: 66), para TRAC: 5'-ATCACTGGCATCTGGACTCCA-3' (SEQ ID NO: 67), para TRBC1: 5'-AGAGCCCCTACCAGAACAGAC-3' (SEQ ID NO: 68), o para TRBC2: 5'-GGACCTAGTAACATAATTGTGC-3' (SEQ ID NO: 69), y el cebador inverso 5'-CCTATCCCTGTGTGCGCTTGGCAGTCTCAG (secuencia adaptadora inversa)-secuencia inversa específica de locus endógena para CD52: 5'-CCTGTTGGAGTCCATCTGCTG-3' (SEQ ID NO: 70), para TRAC: 5'-CCTCATGTCTAGCACAGTTT-3' (SEQ ID NO: 71), para TRBC1 y TRBC2: 5'-ACCAGCTCAGCTCACGTGGT-3' (SEQ ID NO: 72). Los productos de PCR se secuenciaron mediante un sistema 20 de secuenciación 454 (454 Life Sciences). Se obtuvieron aproximadamente 10.000 secuencias por producto de PCR y luego se analizaron para detectar la presencia de eventos de inserción o delección específicos del sitio; Los resultados 25 se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8: Porcentajes de indeles para la nucleasa TALE dirigida a las dianas CD52_T02, TRAC_T01, TRBC_T01 y TRBC_T02.

Diana	% Indeles con transfección de nucleasa TALE	% Indeles con transfección de control de pUC
CD52_T02	28,0	0,9
TRAC_T01	41,9	0,3
TRBC_T01 en la cadena constante 1	3,81	0
TRBC_T01 en la cadena constante 2	2,59	0
TRBC_T02 en la cadena constante 1	14,7	0
TRBC_T02 en la cadena constante 1	5,99	0

30 Actividad de la nucleasa CD52-TALE, Nucleasa TRBC-TALE y nucleasa TRAC-TALE en linfocitos T primarios

Cada construcción de nucleasa TALE se subclonó usando digestión con enzimas de restricción en un vector de expresión de mamífero bajo el control del promotor T7.

El ARNm que codifica la nucleasa TALE que escinde secuencias genómicas de CD52 TRAC y TRBC se sintetizó a partir de plásmido que portaba las secuencias codificantes en dirección 3' del promotor T7. Los linfocitos T aislados de la sangre periférica se activaron durante 5 días usando microesferas activadoras anti-CD3/CD28 (Life Technologies) y luego se transfectaron 5 millones de células mediante electroporación con 10 µg de cada uno de los 2 ARNm que codifican la seminucleasa TALE (o sin codificación) ARN como controles) utilizando un instrumento CytoLVT-P. Como consecuencia de las inserciones y delecciones inducidas por NHEJ, la secuencia codificante de CD52 y/o TRAC estará fuera de la pauta de lectura en una fracción de las células dando como resultado genes no funcionales. 5 días después de la electroporación, las células se marcaron con anticuerpo anti-CD52 o anti-TCR conjugado con fluorocromo mediante citometría de flujo para detectar la presencia de CD52 o TCR en su superficie celular. Como todos los linfocitos T expandidos de la sangre periférica normalmente expresan CD52 y TCR, la proporción de células CD52 negativas o TCR negativas es una medida directa de la actividad nucleasa de TALE. En la tabla 9 se enumeran los resultados de un experimento representativo. La tabla 10 muestra los resultados de un experimento representativo que ensaya la eficacia de las nucleasas TALE de TRBC.

Tabla 9: Porcentajes de linfocitos T CD52 negativos, TCR negativos y CD52/TCR doble negativos después de transfección de polinucleótidos que expresan nucleasa TALE correspondientes.

ARN transfectado	% de células CD52 negativas	% de células TCR negativas	% de células CD52/TCR doble negativas
ARN no codificante	1,21	1.531	0.111
TALEN CD52_T02	49,2	1,6	0,78
TALEN TRAC_T01	2,16	44,8	0,97
TALEN CD52_T02 + TALEN TRAC_T01	29,3	39,6	15,5

Tabla 10: Porcentajes de linfocitos T TCR negativos después de transfección de polinucleótidos que expresan nucleasa TALE de TRBC.

ARN transfectado	% de células TCR negativas
sin ARN	1,22
TALEN TRBC_T01	6,52
TALEN TRBC_T02	23,5

Análisis funcional de linfocitos T con gen CD52 dirigido

El objetivo de la inactivación del gen CD52 es hacer que los linfocitos T sean resistentes a inmunosupresión mediada por anticuerpo anti-CD52. Como se describe en el párrafo anterior, los linfocitos T se transfectaron con ARNm que codifica nucleasa TALE que escinde CD52. A los 7 días después de la transfección, las células se trataron con 50 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD52 (o IgG de rata como control) con o sin complemento de conejo al 30 % (Cedrlane). Después de 2 horas de incubación a 37 °C, las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD52 conjugado con fluorocromo junto con un colorante de viabilidad fluorescente (eBioscience) y se analizaron por citometría de flujo para medir la frecuencia de células CD52 positivas y CD52 negativas entre las células vivas. La figura 6 muestra el resultado de un experimento representativo, que demuestra que las células CD52 negativas son completamente resistentes a la toxicidad por anticuerpos anti-CD52 mediada por el complemento.

Análisis funcional de linfocitos T con gen TRAC dirigido

El objetivo de la inactivación del gen TRAC es hacer que los linfocitos T no respondan a la estimulación del receptor de células T. Como se describe en el párrafo anterior, los linfocitos T se transfectaron con ARNm que codifica nucleasa TALE que escinde TRAC o CD52. 16 días después de la transfección, las células fueron tratadas con hasta 5 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich), un mitógeno de linfocitos T que actúa a través del receptor de células T. Las células con un receptor funcional de linfocitos T deben aumentar de tamaño después del tratamiento con PHA. Después de tres días de incubación, las células se marcaron con un anticuerpo anti-CD52 o anti-TCR conjugado con fluorocromo y se analizaron por citometría de flujo para comparar la distribución del tamaño celular entre las células TCR positivas y TCR negativas, o entre las células CD52 positivas y CD52 negativas. La figura 7 muestra que las células TCR positivas aumentan significativamente de tamaño después del tratamiento con PHA, mientras que las células TCR negativas tienen el mismo tamaño que las células no tratadas, lo que indica que la inactivación de TRAC las hizo insensibles a la señalización de TCR. Por el contrario, las CD52 positivas y CD52 negativas aumentaron de tamaño en la misma medida.

Análisis funcional de linfocitos T con genes CD52 y TRAC dirigidos

Para verificar que la manipulación genómica no afectaba a la capacidad de los linfocitos T de presentar actividad antitumoral cuando estaban provistos de un receptor quimérico de antígenos (CAR), se transfectaron linfocitos T que se habían dirigido con nucleasa CD52-TALE y nucleasa TRAC-TALE con 10 µg de ARN que codifica un CAR anti-CD19 (SEQ ID NO: 73). Despues de 24 horas, Los linfocitos T se incubaron durante 4 horas con células Daudi que expresan CD19. La regulación por aumento en superficie celular de CD107a, un marcador de liberación de gránulos citotóxicos por los linfocitos T (denominado desgranulación) se midió por análisis de citometría de flujo (Betts, Brenchley *et al.* 2003). Los resultados se incluyen en la figura 8 y muestran que las células CD52 negativas/TCR $\alpha\beta$ negativas y las CD52 positivas/TCR $\alpha\beta$ positivas tienen la misma capacidad de desgranular en respuesta a PMA/ionomicina (control positivo) o células Daudi CD19+. La regulación por aumento de CD107 es dependiente de la presencia de CD19+. Estos datos sugieren que la manipulación genómica no tiene impacto negativo en la capacidad de los linfocitos T de montar una respuesta antitumoral controlada.

Seguridad genómica de la nucleasa CD52-TALE y la nucleasa TRAC-TALE en linfocitos T primarios

Como nuestras construcciones incluyen subunidades de nucleasa, Una pregunta importante es si la transfección múltiple de nucleasa de TALE puede conducir a la genotoxicidad y a la escisión inespecífica en secuencias diana de "coincidencia estrecha" o al emparejar mal las seminucleasas TALE. Para estimar el impacto de la nucleasa TRAC-TALE y la nucleasa CD52-TALE en la integridad de los genomas celulares, enumeramos secuencias en el genoma humano que presentaban potencial de escisión inespecífica. Para generar esta lista, identificamos todas las secuencias en el genoma con hasta 4 sustituciones en comparación con las semidianas originales y luego identificamos los pares de semidianas potenciales en una orientación cabeza a cabeza con un espaciador de 9 a 30 pb entre sí. Este análisis incluyó sitios potencialmente dirigidos por homodímeros de una molécula de seminucleasa TALE o heterodímeros formados por una seminucleasa TALE de CD52 y una seminucleasa TALE de TRAC. Los inventores puntuaron las posibles dianas inespecíficas en función de los datos de especificidad teniendo en cuenta el costo de las sustituciones individuales y la posición de las sustituciones (donde los apareamientos erróneos se toleran mejor para las bases en el extremo 3' de la semidiana). Se obtuvieron 173 secuencias únicas con una puntuación que refleja una estimación de la probabilidad de escisión. Se seleccionaron las 15 puntuaciones más altas y se analizó por secuenciación profunda la frecuencia de mutaciones encontradas en estos locus en linfocitos T transfectados simultáneamente con nucleasa TALE de CD52 y TRAC y se purificaron mediante separación magnética como negativos para CD52, negativos para TCR $\alpha\beta$. Los resultados se encuentran en la figura 9. La frecuencia más alta de inserción/delección es 7×10^{-4} . Estos resultados hacen que la supuesta diana inespecífica sea al menos 600 veces menos propensa a sufrir mutación que las dianas previstas. Los reactivos de nucleasa TALE utilizados en este estudio, por lo tanto, parecen extremadamente específicos.

Ejemplo 3: Nucleasas TALE que escinden el gen CTLA4 humano y el gen PDCD1 humano.

Como se describió en el ejemplo 1, se diseñaron y produjeron nucleasas TALE heterodiméricas dirigidas respectivamente a los genes PDCD1 y CTLA4. Las secuencias genómicas diana consisten en dos secuencias de 17 pb de longitud (denominadas semidianas) separadas por un espaciador de 11 o 15 pb. Cada semidiana se reconoce por repeticiones de las seminucleasas TALE enumeradas en la 11.

Tabla 11: Descripción de las nucleasas TALE de CTLA4 y PDCD1 y secuencias de los sitios diana de las nucleasas TALE en los genes correspondientes humanos.

Diana	Secuencia diana	Secuencia de repetición	Seminucleasa TALE
CTLA4_T01	TGGCCCTGCACTCTCCT gtttttcttcctt CATCCCTGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 74)	Repetición CTLA4_T01-L (SEQ ID NO: 79)	CTLA4_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 89)
		Repetición CTLA4_T01-R (SEQ ID NO: 80)	CTLA4_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 90)
CTLA4_T03	TTTCCATGCTAGCAAT gcacgtggccagcc TGCTGTGGTACTGGCCA (SEQ ID NO: 75)	Repetición CTLA4_T03-L (SEQ ID NO: 81)	CTLA4_T03-L TALEN (SEQ ID NO: 91)
		Repetición CTLA4_T03-R (SEQ ID NO: 82)	CTLA4_T03-R TALEN (SEQ ID NO: 92)
CTLA4_T04	TCCATGCTAGCAATGCA cgtggcccgctgc TGTGGTACTGGCCAGCA (SEQ ID NO: 76)	Repetición CTLA4_T04-L (SEQ ID NO: 84)	CTLA4_T04-L TALEN (SEQ ID NO: 93)
		Repetición CTLA4_T04-R (SEQ ID NO: 85)	CTLA4_T04-R TALEN (SEQ ID NO: 94)

(continuación)

Diana	Secuencia diana	Secuencia de repetición	Seminucleasa TALE
PDCD1_T01	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAAACGCCACCTCA (SEQ ID NO : 77)	Repetición PDCD1_T01-L (SEQ ID NO: 86)	PDCD1_T01-L TALEN (SEQ ID NO: 95)
		Repetición PDCD1_T01-R (SEQ ID NO: 87)	PDCD1_T01-R TALEN (SEQ ID NO: 96)
PDCD1_T03	TACCTCTGTGGGGCCAT ctccctggcccaa GGCGCAGATCAAAGAGA (SEQ ID NO : 78)	Repetición PDCD1_T03-L (SEQ ID NO: 88)	PDCD1_T03-L TALEN (SEQ ID NO: 97)
		Repetición PDCD1_T03-R (SEQ ID NO: 89)	PDCD1_T03-R TALEN (SEQ ID NO: 98)

Actividad de la nucleasa CTLA4-TALE y la nucleasa PDCD1-TALE en células HEK293

5 Cada construcción de nucleasa TALE se subclonó usando digestión con enzimas de restricción en un vector de expresión de mamífero bajo el control de un promotor largo de pEF1alfa. Un día antes de la transfección se sembraron un millón de células HEK293. Las células se cotransfectaron con 2,5 µg de cada uno de los dos plásmidos que codifican las nucleasas TALE que reconocen las dos semidianas en la secuencia genómica de interés en el gen PDCD1 y CTLA-4 bajo el control del promotor EF1-alfa o 5 µg de un vector pUC de control (pCLS0003) usando 25 µl de Lipofectamine (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 La escisión bicatenaria generada por las nucleasas TALE en las secuencias codificantes de PDCD1 o CTLA-4 se repara en células vivas mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ), que es un mecanismo propenso a errores. La actividad de las nucleasas TALE en células vivas se mide por la frecuencia de inserciones o delecciones en el locus 15 genómico diana. 48 horas después de la transfección, Se aisló el ADN genómico de las células transfectadas y se realizaron PCR específicas de locus utilizando los siguientes cebadores: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCCGACTCAG (secuencia adaptadora directa)- 10N (TAG)- secuencia directa específica de locus para CTLA4_T01: 5'-CTCTACTTCTGAAGACCTG-3' (SEQ ID NO: 99), para CTLA4_T03/T04: 20 5'-ACAGTTGAGAGATGGAGGG-3' (SEQ ID NO: 100), para PDCD1_T01: 5'-CCACAGAGGTAGGTGCCGC-3' (SEQ ID NO: 101) o para PDCD1_T03: 5'-GACAGAGATGCCGGTCACCA-3' (SEQ ID NO: 102) y el cebador inverso 5'-CCTATCCCTGTGCCTTGGCAGTCTCAG (secuencia adaptadora inversa)- secuencia inversa específica de locus endógena para CTLA4_T01: 5'-TGGAATACAGAGCCAGCAA-3' (SEQ ID NO: 103), para CTLA4_T03/T04: 5'-GGTCCCCGTGCAGATGGAAT-3' (SEQ ID NO: 104), para PDCD1_T01: 5'-GGCTCTGCAGTGGAGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 105) o para PDCD1_T03: 5'-GGACAACGCCACCTCACCT-3' (SEQ ID NO: 106).

25 Los productos de PCR se analizaron por ensayo no endonucleasa T7: en resumen, después de la desnaturación y rehidratación del producto de PCR, la endonucleasa T7 digerirá específicamente el ADN emparejado incorrectamente compuesto de hebras de tipo silvestre y mutadas. El producto de digestión entonces se resuelve por electroforesis en gel de poliacrilamida. La presencia de un producto digerido es indicativa de secuencias mutadas 30 inducidas por la actividad de nucleasa TALE. Los resultados se presentan en la figura 10, donde las flechas apuntan a los productos de PCR digeridos. Demuestran que las nucleasas TALE PDCD1_T1, PDCD1_T3, CTLA4_T1, CTLA4_T3 y CTLA4_T4 muestran todas actividad nucleasa mutagénica en sus sitios diana.

Inactivación de CTLA4 en linfocitos T primarios:

35 Se activaron linfocitos T primarios humanos con microesferas CD3/28. Cinco días después, se electroporaron 5×10^6 células con 20 µg de ARN codificante de una de tres TALEN™ (T1, T2 y T3) diseñadas con respecto al gen CTLA4 o sin ARN como control. Tres días después de la electroporación, se midió la expresión de CTLA4 por tinción intracelular usando anticuerpo fluorescente y análisis de citometría de flujo (figuras 27 y 28).

40 40 Las tres TALEN™ indujeron regulación por disminución de la expresión de CTLA4 de una manera correlacionada con su eficacia en líneas celulares HEK293 (T1 fue más eficaz que T3 y T4).

45 45 El análisis por secuenciación profunda de ADN genómico aislado de células transfectadas usando tecnología 454 (Roche) puso de manifiesto que un 96 % de los alelos de CTLA4 estaban mutados en células tratadas con TALEN T1 en comparación con un 0,1 % en la muestra de control sin TALEN.

Inactivación de PD1 en linfocitos T primarios:

50 50 Se activaron linfocitos T primarios humanos con microesferas CD3/28. Cinco días después, se electroporaron 5×10^6 células con 20 µg de ARN codificante de una de dos TALEN específicas del gen PD1 humano o sin ARN como control. Diez días después, las células se reactivaron y 3 días después de la reactivación, se midió la expresión de PD1 por

tinción superficial usando anticuerpo fluorescente y análisis por citometría de flujo (véase la figura 29).

Ambas TALEN indujeron regulación por disminución significativa de la expresión de PD1. El análisis por secuenciación profunda de ADN genómico aislado de células transfectadas con TALEN T1 y TALEN T03 respectivamente usando tecnología 454 (Roche) reveló que un 34 % y un 39 % de alelos PD1 se mutaron respectivamente (resultados mostrados en la figura 30).

Actividad antitumoral potenciada de células tratadas con PD1-TALEN:

- 10 Se activaron linfocitos T primarios humanos con microesferas CD3/28. Cinco días después, se electroporaron 5×10^6 células con 20 µg de ARN codificante de una TALEN específicas del gen PD1 humano o sin ARN como control. Una semana después, las células se electroporaron con ARNm que codifica un receptor quimérico de antígenos específico para CD19 o sin ARN como control negativo. Al día siguiente, su actividad antitumoral se midió en ensayo de citotoxicidad celular usando células Daudi CD19+ (frente a K562 como control) o células HCT116, que expresan PD1ligando 1 (PDL1) transducido con vector de expresión de CD19 (frente a células HCT116 originales como control). La actividad citotóxica se determinó comparando la viabilidad de células diana y células de control. Los resultados se muestran en los diagramas de la figura 31. La transfección de TALEN de PD1 restableció la actividad citotóxica contra células HCT116 que expresan PDL1 y mejoró la actividad citotóxica contra células Daudi.
- 15

- 20 **Ejemplo 4: pTalfa permite la expresión en superficie de CD3 en linfocitos T con TCR alfa inactivado:**

Descripción de las diferentes versiones de preTalfa:

- 25 El gen pTalfa humano codifica una glucoproteína transmembranaria que comprende un dominio extracelular de tipo Ig, un dominio transmembranario hidrófobo y una cola intracitoplásica C terminal grande. Se han diseñado diferentes versiones derivadas de la glucoproteína pTalfa humana y se describen en la tabla 12 y se representan en la figura 11.

Tabla 12: Descripción de un subconjunto de construcciones de pTalfa

Versiones de pTalfa	Descripción	SEQ ID
pTalfa-FL	Longitud completa de glucoproteína pTalfa humana	107
pTalfa-Δ 18	Glucoproteína pTalfa humana truncada que carece de 18 residuo del extremo C.	108
pTalfa-Δ 48	Glucoproteína pTalfa humana truncada que carece de 48 residuo del extremo C.	109
pTalfa-Δ 62	Glucoproteína pTalfa humana truncada que carece de 62 residuo del extremo C.	110
pTalfa-Δ 78	Glucoproteína pTalfa humana truncada que carece de 78 residuo del extremo C.	111
pTalfa-Δ92	Glucoproteína pTalfa humana truncada que carece de 92 residuo del extremo C.	112
pTalfa-Δ110	Glucoproteína pTalfa humana truncada que carece de 110 residuo del extremo C.	113
pTalfa-Δ 114	Glucoproteína pTalfa humana truncada que carece de 114 residuo del extremo C.	114
pTalfa-FL-CD28	Longitud completa de glucoproteína pTalfa humana fusionada en el extremo C con dominio de activación de CD28.	115
pTalfa-FL-CD8	Longitud completa de glucoproteína pTalfa humana fusionada en el extremo C con dominio de activación de CD8.	116
pTalfa-FL-4-1BB	Longitud completa de glucoproteína pTalfa humana fusionada en el extremo C con dominio de activación de 4-1BB.	117
pTalfa-Δ48-CD28	Glucoproteína pTalfa-Δ 48 fusionada en el extremo C con dominio de activación de CD28.	118
pTalfa-Δ48-CD8	Glucoproteína pTalfa-Δ 48 fusionada en el extremo C con dominio de activación de CD8.	119
pTalfa-Δ48-41BB	Glucoproteína pTalfa-Δ 48 fusionada en el extremo C con dominio de activación de 4-1BB.	120
pTalfa-Δ114/TCRα.IC	Glucoproteína pTalfa-Δ 114 fusionado en el extremo C con el dominio intracelular de TCRalfa	121
pTalfa-EC/TCRα.TM.IC	Dominio extracelular pTalfa fusionado en el extremo C con el dominio transmembranario e intracelular de TCRalfa.	122
pTalfa-Δ 48-1xMUT	Glucoproteína pTalfa-Δ 48 con residuo mutado W46R.	123
preTalfa-Δ48-4xMUT	Glucoproteína pTalfa-Δ 48 con residuos mutados D22A, K24A, R102A, R117A	124

- 30 Las diferentes construcciones de preTalfa ensayadas incluyen:

1) **Mutantes de delección de pTalfa:** Se generaron diferentes delecciones en la cola citoplasmática intracelular de la proteína pTalfa humana (que comprende 114 aminoácidos) (SEQ ID NO: 107). Las construcciones ensayadas incluyen la versión de longitud completa de la proteína (FL) y mutantes en que se delecionaron 18, 48, 62, 78, 92, 110 y 114 aminoácidos del extremo C de la proteína (SEQ ID NO: 108 a SEQ ID NO: 114).

5 2) **Mutantes de pTalfa que contienen dominios de activación intracelulares:** Las variantes FL y Δ48 se fusionaron a los dominios de activación intracelulares CD8, CD28 o 41BB en su extremo C (SEQ ID NO: 115 a SEQ ID NO: 120).

10 3) **Mutantes quiméricos de pTalfa/TCRa:** En una de las construcciones, el dominio intracelular TCRα (IC) se fusionó a una versión sin cola (Δ114) de pTalfa (SEQ ID NO: 121). También se generó una segunda construcción en que el dominio extracelular pTalfa se fusionó a los dominios transmembranario (TM) e IC de TCRα (SEQ ID NO: 122).

15 4) **Mutantes de dimerización de pTalfa:** En la bibliografía se han descrito algunas mutaciones que pueden alterar la capacidad de oligomerización/dimerización del complejo preTCR. Estos mutantes se proponen para permitir la expresión de preTCR en la superficie celular, sin inducir la señalización constitutiva (supuestamente inducida tras la oligomerización de preTCR). Las mutaciones se han introducido en la variante pTalfaΔ48 y son:

- 1xMUT: W46R (SEQ ID NO: 123)
- 4x MUT: D22A, K24A, R102A, R117A (SEQ ID NO: 124)

20 Actividad de diferentes construcciones preTalfa en células Jurkat con TRAC inactivado:

Para cribar diferentes variantes de pTalfa por su capacidad de restablecer la expresión en superficie de CD3 en células con TCRalfa inactivado, se generó una línea celular en que se alteró el gen de TCRalfa usando TALEN dirigida a TRAC. Se transfecaron células Jurkat (una línea celular de leucemia de linfocitos T) con plásmidos que codifican la TALEN que escinde TRAC usando electroporación CytoPulse, y las células KO (TCR α / β ^{NEG}, CD3^{NEG}) entonces se purificaron por selección negativa usando microesferas magnéticas CD3. La población KO (células JKT_KOx3) se amplificó y usó para cribar las diferentes variantes de pTalfa. Se realizó cribado por transfección de un millón de células JKT_KOx3 con 15 μ g de plásmido codificante de las diferentes variantes de pTalfa bajo el control del promotor EF1 α , seguido de análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie celular de CD3 48 h después de la transfección.

30 La figura 12 es un ejemplo representativo de las eficacias de transfección (% de células BFP+) y la actividad de las construcciones de pTalfa FL, Δ18 and Δ48 en células JKT_KOx3, basadas en el % de células CD3+, determinadas por citometría de flujo. Los resultados de las diferentes construcciones se agrupan en la tabla 13.

Mutante	ID	% CD3BAJA	DT
0	NEG	4,69	1,53
1	preTCR α -FL	31,18	4,15
2	preTCR α -Δ18	20,13	4,56
3	preTCRα-Δ48	44,86	3,90
4	preTCR α -Δ62	32,42	2,95
5	preTCR α -Δ78	24,75	3,87
6	preTCR α -Δ92	20,63	3,70
7	preTCR α -Δ110	18,18	3,49
8	preTCR α -Δ114	4,29	2,74
9	preTCR α -FL-CD8	18,16	5,30
10	preTCR α -FL-CD28	5,67	2,77
11	preTCR α -FL-41BB	27,27	3,66
12	preTCR α -Δ48-CD8	11,56	6,01
13	preTCR α -Δ48-CD28	12,22	4,72
14	preTCR α -Δ48-41BB	35,93	4,55
15	preTCR α -Δ114/TCR α .IC	3,94	1,95
16	preTCR α -EC/TCR α .TM.IC	17,80	4,47
17	preTCR α -Δ48-1xMUT	26,88	4,37
18	preTCR α -Δ48-4xMUT	7,59	1,06

35 **Tabla 13:** Actividad de las diferentes construcciones pTalfa en células Jurkat con TCR alfa inactivado. Se midió la actividad por análisis de citometría de flujo de expresión de CD3 en células Jurkat con TCR alfa inactivado transfecadas con las construcciones preTalfa diferentes.

Actividad de pTalfa-FL y pTalfa-Δ48 en linfocitos T primarios con TCR alfa inactivado:

Para ensayar la capacidad de las versiones pTalfa-FL y pTalfa-Δ48 de inducir la expresión en superficie de CD3 en linfocitos T con TCR alfa inactivado, se clonaron las secuencias codificantes de pTalfa-FL y pTalfa-Δ48 en un vector lentivírico pLV-SFFV-BFP-2A-PCTRA de autoinactivación que codifica la proteína azul fluorescente (BFP) bajo el promotor SFFV seguido del péptido T2A de autoescisión (figura 13).

5 Los linfocitos T aislados de la sangre periférica se activaron durante 72 horas usando microesferas activadoras anti-CD3/CD28 (Life Technologies) y se transfectaron 4,5 millones de células mediante electroporación con 10 µg de ARNm que codifica las nucleasas TALE dirigida a la región de cadena constante de TCR alfa (TRAC) usando un 10 instrumento CytoLVT-S (BTX-Harvard Harbour). Dos días después de la electroporación, se transdijeron los linfocitos T con los vectores lentivíricos LV-SFFV-BFP-2A-pTalfa-Δ48 o LV-SFFV-BFP-2A-control. Entonces se purificaron los linfocitos T CD3 negativos y CD3bajo usando microesferas magnéticas anti-CD3 (Miltenyi Biotech). Este protocolo 15 experimental se representa en la figura 14A.

15 La figura 14B representa el análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie celular de TCRalfa/beta, CD3, y la expresión de BFP en linfocitos T con TCRalfa inactivado (KO) transducidos con vector lentivírico BFP-2A-pTalfaΔ48 (KO/Δ48) o de BFP de control (KO/BFP) antes y después de la purificación con microesferas de CD3. Las 20 células con TCRalfa inactivado transducidas con el vector BFP-T2A-pTalfa-Δ48 (células BFP+) mostraron mayores niveles de CD3 en comparación con células no transducidas (células BFP-). No se observan diferencias entre las células transducidas con el vector de BFP de control. Estos resultados indican que pTalfa media el restablecimiento 25 de la expresión de CD3 en la superficie celular de células con TCRalfa inactivado. Por el contrario, permanece la tinción de TCRalfa/beta, como se esperaba, inalterada en células transducidas o no con el vector que expresa pTalfa-Δ48.

25 La expresión de CD3 mediada por pTalfa mantiene la activación de linfocitos T deficientes de TCR:

Para determinar la capacidad de pTalfa de transducir las señales de activación celular, se analizó la expresión de los marcadores de activación temprana y tardía en linfocitos T con TCR alfa inactivado transducidos con pTalfa-Δ48 y pTalfa-Δ48.41BB. Los linfocitos T con TCR alfa inactivado transducidos con pTalfa-Δ48 y pTalfa-Δ48.41BB se 30 generaron a partir de linfocitos T humanos primarios como se describe en la sección previa y en la figura 14A.

35 Para detectar la señalización mediante CD3, las células se reactivaron usando microesferas recubiertas anti-CD3/CD28 3 días antes de la purificación de los linfocitos T con TCR alfa inactivado con microesferas CD3 (figura 14A). Las células se tiñeron con anticuerpos anti-CD69 conjugado con fluorocromo (marcador de activación temprana) y anti-CD25 (marcador de activación tardía), 24 y 48 horas después de la reactivación, respectivamente, y se analizaron por citometría de flujo (figura 15A-B). Como se representa en la figura 15A-B, las células con TCR alfa inactivado que expresan pTalfa-Δ48 (KO/pTα-Δ48) o pTalfa-Δ48.41BB (KO/pTα-Δ48.BB) muestran regulación por aumento de los marcadores de activación, hasta niveles similares a los observados en células que expresan TCRalfa/beta (NEP: células no electroporadas). 40 Otro indicador de activación de linfocitos T es un aumento en el tamaño celular que a veces se denomina "explosión". La capacidad de los complejos preTCR de inducir "explosión" se midió por análisis de citometría de flujo del tamaño celular 72 horas después de la reactivación usando microesferas anti-CD3/CD28 (figura 15C). La estimulación con microesferas anti-CD3/CD28 indujo aumentos comparables en el tamaño celular en células que expresaban complejos TCRalfa/beta frente a células que expresaban pTalfa-Δ48 o pTalfa-Δ48.41BB. Tomados conjuntamente, estos 45 resultados sugieren que los complejos preTCR son competentes para transducir señales que se acoplan de forma eficaz a los mecanismos que median la regulación por aumento del marcador de activación.

La expresión de CD3 mediada por pTalfa mantiene la expansión de linfocitos T primarios deficientes de TCR usando anticuerpos anti-CD3/CD28 estimuladores

50 Para evaluar la capacidad de los complejos preTCR de mantener la proliferación celular a largo plazo, se midió la proliferación de células como se describe previamente. Diez días después de la activación inicial, las células se mantuvieron en IL2 (sin react.) o en IL2 con microesferas anti-CD3/CD28 (react.). Para cada condición, las células se contaron y analizaron por citometría de flujo en los diferentes puntos temporales para estimar el número de células BFP+. El crecimiento de células con TCRalfa inactivado (KO) transducidas con vectores de BFP o BFP-T2A-preTCRα-Δ48 se comparó, y se estimado la inducción factorial de estas células con respecto al valor obtenido en el día 2 después de la reactivación. La figura 16 muestra los resultados obtenidos con dos donantes independientes. En ambos casos, las células con TCRalfa inactivado que expresaban pTalfa-Δ48 presentaban mayor expansión que las células con TCR alfa inactivado que expresan únicamente el vector de control de BFP. Para el segundo donante, también se 55 incluyeron células con TCRalfa inactivado que expresaban pTalfa-Δ48.41BB o pTalfa de longitud completa, que presentaban también mayor expansión que las células con TCRalfa inactivado que expresaban solamente el vector de control de BFP.

60 **Ejemplo 5: optimización de la transfección de ARNm en linfocitos T usando tecnología Cytopulse.**

65 Determinación del programa de Cytopulse optimizado

ES 2 828 669 T3

Se realizó un primer conjunto de experimentos en PBMC no activados para determinar un intervalo de tensión en que las células pudieran transfectarse. Se ensayaron cinco programas diferentes como se describe en la tabla 14.

Tabla 14: Programas de Cytopulse diferentes usados para determinar la tensión mínima necesaria para electroporación en linfocitos T procedentes de PBMC.

Programa de cyto-pulse	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3					
	Pulsos	V	duración (ms)	Intervalo (ms)	Pulsos	V	duración (ms)	Intervalo (ms)	Pulsos	V	duración (ms)	Intervalo (ms)
1	1	600	0,1	0,2	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2
2	1	900	0,1	0,2	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
3	1	1200	0,1	0,2	1	1200	0,1	100	4	130	0,2	2
4	1	1200	0,1	10	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
5	1	900	0,1	20	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2

Se electroporaron 3 o 6 millones de células en cubeta de 0,4 cm de hueco (30 o 15×10^6 células/ml) con 20 µg de plásmidos que codifican GFP y plásmidos pUC de control usando los diferentes programas de Cytopulse. 24 horas después de la electroporación, se analizó la expresión de GFP en células electroporadas por citometría de flujo para determinar la eficacia de transfección. Los datos mostrados en la figura 17 indican la tensión mínima requerida para la electroporación de plásmidos en los linfocitos T derivados de PBMC. Estos resultados demuestran que el programa de Cytopulse 3 y 4 permiten una transformación eficaz de linfocitos T (EP n.º 3 u n.º 4).

Electroporación de ARNm de linfocitos T purificados activados

5 10 Despues de determinar el mejor programa de cytopulse que permita una electroporación de ADN eficiente de los linfocitos T, los inventores probaron si este método era aplicable a la electroporación de ARNm.

15 Se resuspendieron 5×10^6 linfocitos T purificados preactivados durante 6 días con PHA/IL2 en tampón de citoporación T (aparato BTX-Harvard) y se electroporaron en cubetas de 0,4 cm con 10 µg de ARNm que codifica GFP o 20 µg de plásmidos que codifican GFP o pUC usando el programa de Cytopulse preferido como se determina en la sección previa (tabla 15).

Tabla 15: Programa de Cytopulse usado para electroporar linfocitos T purificados.

Programa de cyto-pulse	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3					
	Pulso	V	duración (ms)	Intervalo (ms)	Pulso	V	duración (ms)	Intervalo (ms)	Pulso	V	duración (ms)	Intervalo (ms)
3	1	1200	0,1	0,2	1	1200	0,1	100	4	130	0,2	2

48 horas después de la transfección, las células se tiñeron con colorante de viabilidad (eFluor-450) y se determinó la viabilidad celular y el % de células GFP+ viables mediante análisis de citometría de flujo (figura 18).

5 Los datos mostrados en la figura 18 indican que la electroporación de ARN con la condición óptima determinada en la presente es atóxica y permite la transfección de más de un 95 % de las células viables.

En síntesis, todo el conjunto de datos muestra que los linfocitos T pueden transfectarse eficientemente con ADN o ARN. En particular, la transfección de ARN no tiene impacto en la viabilidad celular y permite niveles de expresión uniformes del gen transfecido de interés en la población celular.

10 La transfección eficiente se puede lograr temprano después de la activación celular, independientemente del método de activación utilizado (cuentas recubiertas con PHA/IL-2 o CD3/CD28). Los inventores han logrado transfectar células desde 72 horas después de la activación con eficiencias de > 95 %. Además, la transfección eficiente de los linfocitos T después de la descongelación y activación también se puede obtener utilizando el mismo protocolo de 15 electroporación.

Electroporación de ARNm en linfocitos T humanos primarios para la expresión funcional de la nucleasa TALE

20 Después de demostrar que la electroporación de ARNm permite la expresión eficiente de GFP en linfocitos T humanos primarios, los inventores probaron si este método era aplicable a la expresión de otras proteínas de interés. Las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (nucleasa TALE) son nucleasas específicas del sitio generadas por la fusión de un dominio de unión de ADN TAL a un dominio de escisión de ADN. Son poderosas herramientas de edición del genoma, ya que inducen roturas de doble cadena en prácticamente cualquier secuencia de ADN deseada. Estas roturas de doble cadena activan la unión de extremos no homólogos (NHEJ), un mecanismo de reparación de ADN propenso a errores, potencialmente llevando a la inactivación de cualquier gen de interés deseado. Como alternativa, si se introduce un molde de reparación adecuado en las células al mismo tiempo, las roturas de ADN inducidas por nucleasa TALE pueden repararse mediante recombinación homóloga, ofreciendo así la 25 posibilidad de modificar a voluntad la secuencia del gen.

30 Se ha utilizado la electroporación de ARNm para expresar una nucleasa TALE modificada por ingeniería para escindir específicamente una secuencia en el gen humano que codifica la cadena alfa del receptor de antígeno de linfocitos T (TRAC). Se espera que las mutaciones inducidas en esta secuencia den como resultado la inactivación génica y la pérdida del complejo TCR $\alpha\beta$ de la superficie celular. El ARN de nucleasa TALE de TRAC o ARN no codificante como control se transfecan en linfocitos T humanos primarios activados usando la tecnología Cytopulse. La secuencia de 35 electroporación consistió en 2 pulsos de 1200 V seguidos de cuatro pulsos de 130 V como se describe en la tabla 15.

Por análisis de citometría de flujo de la expresión de superficie de TCR 7 días después de la electroporación (figura 19, panel superior), se observó que el 44 % de los linfocitos T perdieron la expresión de TCR $\alpha\beta$. Se analizó el ADN genómico de las células transfectadas mediante amplificación por PCR del locus TRAC seguido de 454 secuenciación 40 de alto rendimiento. El 33 % de los alelos secuenciados (727 de 2153) contenían inserción o delección en el sitio de escisión de la nucleasa TALE. La figura 19 (panel inferior) muestra ejemplos de los alelos mutados.

Estos datos indican que la electroporación de ARNm usando tecnología de cytopulse da como resultado la expresión funcional de la nucleasa TALE TRAC.

45 Electroporación de linfocitos T con un ARNm monocistrónico que codifica un receptor de antígeno químérico de cadena sencilla (CAR) anti-CD19:

50 Se resuspendieron 5×10^6 linfocitos T preactivados varios días (3-5) con microesferas recubiertas anti-CD3/CD28 e IL2 en tampón T para citoporación y se realizó electroporación en cubetas de 0,4 cm sin ARNm o con 10 μ g de ARNm que codifica un CAR monocatenario (SEQ ID NO: 73) usando el programa descrito en la tabla 15.

55 24 horas después de la electroporación, las células se tiñeron con un colorante de viabilidad reparable eFluor-780 y un fragmento de IgG F (ab')2 de cabra anti-ratón conjugado con PE específico para evaluar la expresión en la superficie celular del CAR en las células vivas. Los datos se muestran en la figura 20. A indica que la gran mayoría de los linfocitos T vivos electroporados con el ARNm monocistrónico descrito anteriormente expresan el CAR en su superficie. 24 horas después de la electroporación, los linfocitos T se cultivaron conjuntamente con células Daudi (CD19+) durante 6 horas y se analizaron por citometría de flujo para detectar la expresión del marcador de desgranulación CD107a en su superficie (Betts, Brenchley *et al.*, 2003).

60 60 Los datos mostrados en la figura 20 indican que la mayoría de las células electroporadas con el ARNm monocistrónico descrito anteriormente se desgranulan en presencia de células diana que expresan CD19. Estos resultados demuestran claramente que el CAR expresado en la superficie de los linfocitos T electroporados está activo.

65 Electroporación de linfocitos T con un ARNm policistrónico que codifica un receptor químérico de antígenos (CAR) monocatenario anti-CD19:

5 Se electroporaron 5×10^6 linfocitos T preactivados varios días (3-5) con microesferas recubiertas anti-CD3/CD28 e IL2 en tampón T para citoporación y se realizó electroporación en cubetas de 0,4 cm sin ARNm o con 45 µg de ARNm que codifica un CAR multicatenario (SEQ ID NO: 125, codificado por SEQ ID NO: 126, figura 21A y figura 4B (csm4)) usando el programa que se describe en la tabla 15.

10 24 horas después de la electroporación, las células se tiñeron con un colorante de viabilidad reparable eFluor-780 y un fragmento de IgG F (ab')2 de cabra anti-ratón conjugado con PE específico para evaluar la expresión en la superficie celular del CAR en las células vivas. Los datos mostrados en la figura 21 indican que la gran mayoría de los linfocitos T electroporados con el ARNm policistrónico descrito previamente expresan el CAR en su superficie.

15 24 horas después de la electroporación, los linfocitos T se cultivaron conjuntamente con Daudi (CD19+) durante 6 horas y se analizaron por citometría de flujo para detectar la expresión del marcador de desgranulación CD107a en su superficie. Los datos mostrados en la figura 21 indican que la mayoría de las células electroporadas con el ARNm policistrónico descrito anteriormente se desgranulan en presencia de células diana que expresan CD19. Estos resultados demuestran claramente que el CAR expresado en la superficie de los linfocitos T electroporados está activo.

Lista de referencias citadas en la descripción

- 20 Arimondo, P. B., C. J. Thomas, *et al.* (2006). "Exploring the cellular activity of camptothecin-triple-helix-forming oligonucleotide conjugates". *Mol Cell Biol* 26(1): 324-33.
- 25 Arnould, S., P. Chames, *et al.* (2006). "Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets". *J Mol Biol* 355(3): 443-58.
- 30 Ashwell, J. D. y R. D. Klusner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor". *Annu Rev Immunol* 8: 139-67.
- 35 Betts, M. R., J. M. Brenchley, *et al.* (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation". *J Immunol Methods* 281(1-2): 65-78.
- 40 Boch, J., H. Scholze, *et al.* (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors". *Science* 326 (5959): 1509-12.
- 45 Boni, A., P. Muranski, *et al.* (2008). "Adoptive transfer of allogeneic tumor-specific T cells mediates effective regression of large tumors across major histocompatibility barriers". *Blood* 112(12): 4746-54.
- 50 Brahmer, J. R., C. G. Drake, *et al.* (2010). "Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates". *J Clin Oncol* 28 (19): 3167-75.
- 55 Cambier, J. C. (1995). "Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)". *J Immunol* 155(7): 3281-5.
- 60 Carrasco, Y. R., A. R. Ramiro, *et al.* (2001). "An endoplasmic reticulum retention function for the cytoplasmic tail of the human pre-T cell receptor (TCR) alpha chain: potential role in the regulation of cell surface pre-TCR expression levels". *J Exp Med* 193(9): 1045-58.
- 65 Cermak, T., E. L. Doyle, *et al.* (2011). "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting". *Nucleic Acids Res* 39(12): e82.
- 70 Chames, P., J. C. Epinat, *et al.* (2005). "*In vivo* selection of engineered homing endonucleases using double-strand break induced homologous recombination". *Nucleic Acids Res* 33(20): e178.
- 75 Choulika, A., A. Perrin, *et al.* (1995). "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol Cell Biol* 15(4): 1968-73.
- 80 Christian, M., T. Cermak, *et al.* (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases". *Genetics* 186(2): 757-61.
- 85 Coutinho, A. E. y K. E. Chapman (2011). "The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights". *Mol Cell Endocrinol* 335(1): 2-13.
- 90 Critchlow, S. E. y S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man". *Trends Biochem Sci* 23(10): 394-8.
- 95 Deng, D., C. Yan, *et al.* (2012). "Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors". *Science* 335(6069): 720-3.
- Eisenschmidt, K., T. Lanio, *et al.* (2005). "Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage". *Nucleic Acids Res* 33(22): 7039-47.
- 100 Epinat, J. C., S. Arnould, *et al.* (2003). "A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells". *Nucleic Acids Res* 31(11): 2952-62.
- 105 Geissler, R., H. Scholze, *et al.* (2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity". *PLoS One* 6(5): e19509.
- 110 Howard, F. D., H. R. Rodewald, *et al.* (1990). "CD3 zeta subunit can substitute for the gamma subunit of Fc epsilon receptor type I in assembly and functional expression of the high-affinity IgE receptor: evidence for interreceptor complementation". *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(18): 7015-9.
- 115 Huang, P., A. Xiao, *et al.* (2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs". *Nat Biotechnol* 29(8): 699-700.
- 120 Jena, B., G. Dotti, *et al.* (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor". *Blood* 116(7): 1035-44.
- 125 Kalish, J. M. y P. M. Glazer (2005). "Targeted genome modification via triple helix formation". *Ann N Y Acad Sci*

- 1058: 151-61.
- Li, L., M. J. Piatek, *et al.* (2012). "Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification". *Plant Mol Biol* 78(4-5): 407-16.
- 5 Li, T., S. Huang, *et al.* (2011). "TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain". *Nucleic Acids Res* 39(1): 359-72.
- Li, T., S. Huang, *et al.* (2011). "Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes". *Nucleic Acids Res* 39(14): 6315-25.
- 10 Ma, J. L., E. M. Kim, *et al.* (2003). "Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences". *Mol Cell Biol* 23(23): 8820-8.
- Mahfouz, M. M., L. Li, *et al.* (2012). "Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein". *Plant Mol Biol* 78(3): 311-21.
- 15 Mahfouz, M. M., L. Li, *et al.* (2011). "De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks". *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2623-8.
- Mak, A. N., P. Bradley, *et al.* (2012). "The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target". *Science* 335(6069): 716-9.
- 20 Metzger, H., G. Alcaraz, *et al.* (1986). "The receptor with high affinity for immunoglobulin E". *Annu Rev Immunol* 4: 419-70.
- Miller, J. C., S. Tan, *et al.* (2011). "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing". *Nat Biotechnol* 29(2): 143-8.
- 25 Morbitzer, R., P. Romer, *et al.* (2011). "Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors". *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(50): 21617-22.
- Moscou, M. J. y A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors". *Science* 326 (5959): 1501.
- 30 Mussolini, C., R. Morbitzer, *et al.* (2011). "A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity". *Nucleic Acids Res* 39(21): 9283-93.
- 35 Pang, S. S., R. Berry, *et al.* (2010). "The structural basis for autonomous dimerization of the pre-T-cell antigen receptor". *Nature* 467(7317): 844-8.
- Paques, F. y P. Duchateau (2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy". *Curr Gene Ther* 7(1): 49-66.
- Pardoll, D. y C. Drake (2012). "Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy". *J Exp Med* 209(2): 201-9.
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy". *Nat Rev Cancer* 12(4): 252-64.
- Park, T. S., S. A. Rosenberg, *et al.* (2011). "Treating cancer with genetically engineered T cells". *Trends Biotechnol* 29(11): 550-7.
- Pingoud, A. y G. H. Silva (2007). "Precision genome surgery". *Nat Biotechnol* 25(7): 743-4.
- Porteus, M. H. y D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases". *Nat Biotechnol* 23(8): 967-73.
- Robert, C. y C. Mateus (2011). "[Anti-CTLA-4 monoclonal antibody: a major step in the treatment of metastatic melanoma]". *Med Sci (París)* 27(10): 850-8.
- 40 Rouet, P., F. Smith, *et al.* (1994). "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease". *Mol Cell Biol* 14(12): 8096-106.
- Saint-Ruf, C., O. Lechner, *et al.* (1998). "Genomic structure of the human pre-T cell receptor alpha chain and expression of two mRNA isoforms". *Eur J Immunol* 28(11): 3824-31.
- Sander, J. D., L. Cade, *et al.* (2011). "Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs". *Nat Biotechnol* 29(8): 697-8.
- 45 Smith, J., S. Grizot, *et al.* (2006). "A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences". *Nucleic Acids Res* 34(22): e149.
- Stoddard, B. L. (2005). "Homing endonuclease structure and function". *Q Rev Biophys* 38(1): 49-95.
- Tesson, L., C. Usal, *et al.* (2011). "Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs". *Nat Biotechnol* 29(8): 695-6.
- 50 von Boehmer, H. (2005). "Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate". *Nat Rev Immunol* 5(7): 571-7.
- Waldmann, H. y G. Hale (2005). "CAM PATH: from concept to clinic". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1461): 1707-11.
- Weber, E., R. Gruetzner, *et al.* (2011). "Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning". *PLoS One* 6(5): e19722.
- 55 Yamasaki, S., E. Ishikawa, *et al.* (2006). "Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development". *Nat Immunol* 7(1): 67-75.
- Zhang, F., L. Cong, *et al.* (2011). "Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription". *Nat Biotechnol* 29(2): 149-53.

LISTADO DE SECUENCIAS

65 <110> GALETTO ROMAN
GROSSE STEPHANIE
GOUBLE AGNES

MANNIOUI CECILE
 POIROT LAURENT
 SMITH JULIANNE
 SCHARENBERG ANDREW
 5 CELLECTIS

<120> MÉTODOS PARA GENOMODIFICACIÓN DE LINFOCITOS T ALOGÉNICOS Y ALTAMENTE ACTIVOS
 PARA INMUNOTERAPIA

10 <130> 435147WO (DI2013-18PCT)

<160> 126

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> GRex2

<400> 1

25 **tattcactga tggactccaa agaatcatta actcctggta gagaagaaa**

49

<210> 2

<211> 49

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> GRex3T2

35 <400> 2

tgcctggtgt gctctgatga agttcagga tgtcattatg gagtcttaa

49

<210> 3

<211> 49

40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> GRex3T4

45 <400> 3

tgcctctgatg aagttcagg atgtcattat ggagtcttaa cttgtggaa

49

<210> 4

50 <211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> GRex5T1

<400> 4

tggtgtcact gttggaggtt attgaacctg aagtgttata tgcaggata

49

60 <210> 5

<211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220> 5
 <223> GReX5T2
 10 <210> 6
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> GReX5T3
 20 <210> 7
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Repetición-GReX2-LPT9-L1
 <400> 7
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 35 40 45
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

ES 2 828 669 T3

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

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305 310 315 320

ES 2 828 669 T3

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 8
<211> 530
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

ES 2 828 669 T3

<223> Repetición-GReX2-LPT9-R1

<400> 8

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

ES 2 828 669 T3

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
340 345 350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

485

490

495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 9

<211> 530

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición-GReX3T2-L1

10

<400> 9

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

ES 2 828 669 T3

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
340 345 350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala

405

410

415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 10
 <211> 530
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Repetición-GReX3T2-R1
 10 <400> 10

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80

ES 2 828 669 T3

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys

ES 2 828 669 T3

325

330

335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 11
<211> 530
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Repetición-GReg3T4-L1

<400> 11

5

10

ES 2 828 669 T3

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

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

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala

ES 2 828 669 T3

245

250

255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

ES 2 828 669 T3

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 12

<211> 530

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición-GReX3T4-R1

10

<400> 12

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

ES 2 828 669 T3

165

170

175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 13
 <211> 530
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Repetición-GReX5T1-LPT8-L1

 10 <400> 13

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

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

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

ES 2 828 669 T3

85

90

95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 14

<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición-GReX5T1-LPT8-R1

10

<400> 14

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys

ES 2 828 669 T3

1

5

10

15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

ES 2 828 669 T3

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

ES 2 828 669 T3

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

5 <210> 15
<211> 530
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Repetición-GReX5T2-L1
<400> 15

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

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

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

ES 2 828 669 T3

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

ES 2 828 669 T3

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 16
<211> 530
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Repetición-GREx5T2-R1
10 <400> 16

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

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

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

ES 2 828 669 T3

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

ES 2 828 669 T3

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 17
<211> 530
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Repetición-GREx5T3-L1

10 <400> 17

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
1 5 10 15

ES 2 828 669 T3

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

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

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

ES 2 828 669 T3

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

ES 2 828 669 T3

Leu Glu
530

5 <210> 18
<211> 530
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Repetición-GRex5T3-R1

10 <400> 18

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

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

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

ES 2 828 669 T3

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 19
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN GReX2-L

<400> 19

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60	
gctatcgata	tcgccc	atct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaa	agg	ttcg	ttcgac	agtggcgc	caccacgagg	cactggcgg	180
acacacgc	gc	acat	cg	ttgc	cacccggc	cg	240
aagtatc	agg	acat	gat	cg	gaggc	gacac	300
ggcaaa	acagt	gttccggc	gc	acgcgtct	gaggc	cgttgc	360
agaggtcc	ac	cgtt	ac	atc	gttgc	ggagat	420
gtgaccgc	ag	ttgagg	ca	gatgc	atgc	gggtgc	480
ttgaccccg	gg	gcat	gttgc	cg	caatgc	tgacgg	540
acgg	ttgt	gttgc	cc	gttgc	atgc	ggctggag	600
gtggccat	cg	ccag	caat	gttgc	cg	ccagcagg	660
ccgg	gtct	gttgc	cc	gttgc	atgc	gttgc	720
ggcgttgg	ca	ccagg	cc	gttgc	cg	ccagcaat	780
cacgg	ctt	gttgc	cc	gttgc	atgc	ccaggcg	840
ctgg	gagac	ggc	cc	gttgc	cg	ccaggctt	900
cagg	gttgc	gttgc	cc	gttgc	atgc	ccaggctt	960
ctgt	ttgt	gttgc	cc	gttgc	cg	ccaggctt	1020
agcc	acgt	gttgc	cc	gttgc	atgc	ccaggctt	1080
cagg	cccac	gttgc	cc	gttgc	cg	ccaggctt	1140
cagg	cgct	gttgc	cc	gttgc	atgc	ccaggctt	1200
cccc	agg	gttgc	cc	gttgc	cg	ccaggctt	1260
tgg	ggccat	gttgc	cc	gttgc	atgc	ccaggctt	1320
cagg	ggct	gttgc	cc	gttgc	cg	ccaggctt	1380
atgc	ccac	gttgc	cc	gttgc	atgc	ccaggctt	1440
ttgac	ccccc	gttgc	cc	gttgc	cg	ccaggctt	1500
ggca	agg	gttgc	cc	gttgc	atgc	ccaggctt	1560

acggtcacgc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggccccacg gcttgcaccc ccagcaggtg	1620
gtggccatcg ccagcaataa tggtgcaag caggcgctgg agacggtcca goggctttg	1680
ccgggtgtgt gcccaggccca cggcttgacc cggagcagg tggtgccat cgccagcaat	1740
atggtgtggca agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccgtgtgt gtgccaggcc	1800
cacggcttga ccccgagca ggtggggcc atcgccagcc acgtatgggg caagcaggcg	1860
ctggagacgg tccagcggtc gttgcgggtg ctgtgccagg cccacggctt gaccccccag	1920
cagggtggtgg ccatcgccag caatgcggt gcgaagcagg cgctggagac ggtccaggcg	1980
ctgttgcggg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccctc agcaggtgtt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcaggcc ggcgtggag acgtatgtt cccagttatc tggccctgtat	2100
ccggcggtgg cccgttgac caacgaccac ctcgtcgct tggcctgtat cggcggcg	2160
cctgcgttgg atgcagtgaa aaaggattt ggggatccta tcagccgttc ccagctggtg	2220
aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtgccccac	2280
gagtagatcg agctgtatcg gatccccgg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aaggtgatgg agttcttcat gaagggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc	2400
aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcg	2460
gacaccaagg cctactcggg cggctacaac ctgccccatcg gccaggccga cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aacacatca accccaaacga gtggtggaa	2580
gtgtacccct coagcgtgac cgagtcaag ttctgttgc tgccggccat tttcaaggcc	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgtgtat	2700
tccgtggagg agctctgtat cggcgccgag atgatcaagg cggcaccctt gaccctggag	2760
gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814

<210> 20

<211> 2832

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN GReX2-R

10 <400> 20

atgggcgatc ctaaaaagaa acgtaaggc atcgataagg agaccggccgc tgccaagttc	60
gagagacacgc acatggacag catcgatatac gccgatctac gcacgctgg ctacagccag	120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cgttcgacag tggcgacga ccacgaggca	180
ctggcgcc acgggtttac acacgcgcac atcggtgtgt taagccaaca cccggcagcg	240
ttagggaccc tgctgtcaa gtatcggac atgatcgac cggttgcaga ggcgacacac	300
gaagcgatcg ttggcgctgg caaaacagtgg tccggcgac ggcgtctggg ggccttgc	360
acggtggcg gagagtgtgg aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
attgcaaaac ttggcgccgt gaccgcgtg gaggcgtgtc atgcgtggcg caatgcactg	480
acgggtggcc cgttcaactt gaccccccacg cagggtgggg ccatcgccag caatggcg	540
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg gggttgcgg tgctgtgc ggcacccacggc	600
ttgacccccc agcagggtgg ggccatcgcc agcaatgggg gtggcaagca ggcgtggag	660
acggtcacgc ggctgttgcg ggtgtgtgc caggccccacg gcttgcaccc ggagcagggt	720
gtggccatcg ccagccacga tggcgcaag caggcgctgg agacggtcca gcccgttgc	780
ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc ccccgacggg tggtgccat cggccacaa	840
ggcggtggca agcaggcgat ggagacggc tggcgctgt tgccgtgtgt gtgccaggcc	900
cacggcttga ccccccacga ggtggggcc atcgccacga atggcggtgg caagcaggcg	960
ctggagacgg tcacagcggtt gttgcgggtg ctgtgcaccc cccacggctt gaccccg	1020
caggtgtgtt ccacgcggcc acacgtggc ggcacggccgg cgctggagac ggtccaggcg	1080
ctgttgcggg tgctgtgcca ggccacggc ttgacccccc agcagggtgtt ggccatcgcc	1140
agcaatggcg ttggcaagca ggctgtggag acgggtccacg ggctgtgtgc ggtgtgtgc	1200
caggccccacg gttgacccccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagccacga tggcgccaa	1260
caggcgctgg agacgggtcca gctggctgtt cccgtgtgtt gccaggccca cggcttgacc	1320
ccccacggcagg tggtgccat cgccacgtt ggcgggtggca agcaggcgat ggagacggc	1380
caggcgctgt tgccgtgtgtt gtcggcaggcc acgggtttttt ccccgacggca ggtgggtggcc	1440
atcgccacga atattgggtt caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgat gttgcccgg	1500
ctgtgcacgg cccacggctt gaccccgag cagggtgggg ccatcgccac ccacgtatggc	1560
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcg gggttgcgg tgctgtgc ggcacccacggc	1620
ttgacccccc agcagggtggt ggccatcgcc agccacgtt gggcaagca ggcgtgtggag	1680
acggtcacgc ggctgttgcg ggtgtgtgc caggccccacg gcttgcaccc ggagcagggt	1740
gtggccatcg coagcaatat tggtgcaag caggcgctgg agacgggtca ggcgtgttg	1800

ccgggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	1860
aatggggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgggtct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	ggtggggcc	atgcggcagca	ataatgggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggct	gttgcgggtg	ctgtgcccagg	cccacggctt	gacccttcag	2040
cagggtgtgg	ccatcgccag	caatggccgc	gcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gcctgtatcc	ggcgttggcc	gcgttgcacca	acgaccacct	cgtcgcccttg	2160
gcctgcctcg	gccccgtcc	tgcgttggat	gcagtaaaaa	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctgggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtagc	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgccccggaa	cagcacccag	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgtatggag	tttttcatgaa	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gccccgtccag	gaagccgac	ggcgcacatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgtatcggtt	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gccccatcggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccagaaccaa	gcacatcaac	2580
cccaacgggt	gttggaaaggt	gtacccttc	agcgtgaccc	agttcaagtt	cctgttctgt	2640
tccggccact	tcaaggggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgtgtc	cgtggaggag	ctccgtatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcaccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcggc	2820
gcccactgtatcc	aa					2832

<210> 21

<211> 2814

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN GReX3T2-L

10

<400> 21

atgggcgatc	ctaaaaaagaa	acgtaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgcccgtatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttgcac	agtggcgccag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggttgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgtatcg	agcgttgcac	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcg	300
ggcaaacagt	gttccggcg	acgcgtctg	gaggccttgc	tcacgggtgc	gggagagttg	360
agaggttccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcg	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcac	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgacccccc	aggcagggtt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acgggtccac	ggctgttgc	gtgtgtgtgc	caggcccacg	gcttgcaccc	ggagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttg	660
ccgggtctgt	gcacggccca	cggtgttgc	ccggagcagg	tggtgccat	cccgacccac	720
gatggccggca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggtgt	tggcggtgt	gtggcaggcc	780
cacggcttga	ccccccagca	gttggggcc	atgcggcagca	atggcggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgcgggtg	ctgtgcccagg	cccacggctt	gaccccccag	900
caggtgggtgg	ccatcgccag	caataatgg	ggcaaggcagg	cgctggagac	gttccagcgg	960
ctgttgcgg	tgttgcacca	ggccacggc	ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	1020
agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccacg	ggctgttgc	gtgtgtgtgc	1080
cagggccacg	gttgcaccc	ccagcagggt	gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	gggggtgtt	ccgggtgtgt	gcccaggcca	cggttgcacc	1200
ccccacgg	tgttggccat	cgccacaa	aatgggtggca	agcaggcgct	ggagacggc	1260
caggcgctgt	tggcggtgt	gtgcacggcc	cacggcttga	ccccccagca	gttgggtggcc	1320
atgcggcagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgcacgg	1380
ctgtgcacgg	ccacggctgt	gaccccccag	cagggtgggg	ccatcgccag	caataatgg	1440
ggcaaggcagg	cgctggagac	ggtccacgg	ctgttgcgg	tgctgtgc	ggcccacggc	1500
ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agccacatg	gcccacggca	ggcgctggag	1560
acgggtccac	ggctgttgc	gtgtgtgtc	caggcccacg	gcttgcaccc	ccagcagggt	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	cggtgttgc	1680
ccgggtctgt	gcacggccca	cggtgttgc	ccggagcagg	tggtgccat	cgccacccac	1740
gatggccggca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggtgt	tggcggtgt	gtggcaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	gttggggcc	atgcggcagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgcacgg	ctgtgcccagg	ccccacggctt	gaccccccag	1920
caggtgggtgg	ccatcgccag	caataatgg	ggcaaggcagg	cgctggagac	gttccagcgg	1980

ctgttgcggg	tgctgtgc	cca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcagggtgg	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gccccaggcc	ggcgctggag	agcattgtt	cccagttatc	tcgcctgtat	2100	
ccggcgttgg	ccgcgttgc	caacgaccac	ctcgctgc	tggctgcct	ggcggggt	2160	
cctgcgttgg	atgcagtgaa	aaaggattt	ggggatccta	tcagccgtt	ccagctgg	2220	
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtccccac	2280	
gagtagatcg	agctgatcg	gatccccgg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340	
aagggtatgg	agtttcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggcggttcc	2400	
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgt	ggctccccca	tgcactacgg	cgtgatcg	2460	
gacaccaagg	cctactccgg	cggctacaac	ctgcccatacg	gccaggccga	cgaaatcg	2520	
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accacaaacga	gtggtggaa	2580	
gtgtacccct	ccagcggtac	cgagttcaag	ttctgttgc	tgtccggca	tttcaagggc	2640	
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgct	2700	
tccgtggagg	agctcctgtat	cggcgccgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760	
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814	

<210> 22

<211> 2832

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN GReX3T2-R

10 <400> 22

atgggcgatc	ctaaaaaagaa	acgtaagg	tc atcgataaagg	agaccggccgc	tgccaagt	tc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgat	atc gatctac	gcacgctcg	ctacagccag	120	
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	ttt acgttgcacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180	
ctggcgtggcc	acgggtttac	acacg	gac acatcggt	taagccaa	ccggcagcg	240	
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcagg	ac gatcg	cg	tttgcacac	300	
gaagcgatcg	ttggcgtcg	caa	acagtgg	ccggcgcac	g	360	
acgggtggcg	gagagtttgg	agg	tcc	gctctgg	ggc	420	
attgcaaaac	gtggcggcgt	gacc	cg	acttctcaag	gtt	480	
acgggtggcc	cgttcaactt	gac	cccc	caatcg	cc	540	
ggcaagcagg	cgttggagac	gttcc	ca	ggc	ac	600	
ttgacccccc	aggagggtgt	ggccat	cg	ctgg	gg	660	
acgggtgcagg	cgttggc	gttgc	gt	ggcaag	gg	720	
gtggccatcg	ccagcaat	tgg	ggc	acttgg	gg	780	
ccgggtgtgt	gcaaggccca	ccg	cc	gg	gg	840	
aatggggca	agcaggcg	ggag	acgg	gg	gg	900	
cacggcttga	ccccggagca	gg	gg	gg	gg	960	
ctggagacgg	tgcaggcg	gtt	cc	gg	gg	1020	
cagggtgtgg	ccatcgcc	cc	ac	gg	gg	1080	
ctggcgtgg	tgtgtgc	gg	cc	gg	gg	1140	
agcaatggcg	gtggcaag	gg	gg	gg	gg	1200	
caggccca	gttggac	gg	gg	gg	gg	1260	
caggcgctgg	agacgg	gg	gg	gg	gg	1320	
caggagcagg	tgg	gg	gg	gg	gg	1380	
caggcgctgt	tgg	gg	gg	gg	gg	1440	
atcgccagca	atattgg	ca	ac	gg	gg	1500	
ctgtgc	cagg	cc	ac	gg	gg	1560	
ggcaagcagg	cgttggagac	gg	gg	gg	gg	1620	
ttgacccccc	aggagggtgt	gg	gg	gg	gg	1680	
acgggtgcagg	cgttggc	gg	gg	gg	gg	1740	
gtggccatcg	ccagcaat	tgg	gg	gg	gg	1800	
ccgggtgtgt	gcaaggccca	ccg	cc	gg	gg	1860	
ggcggtggca	aggaggcg	gg	gg	gg	gg	1920	
cacggcttga	ccccccagca	gg	gg	gg	gg	1980	
ctggagacgg	tccagcg	gtt	cc	gg	gg	2040	
cagggtgtgg	ccatcgcc	ca	at	gg	gg	2100	
cagtatata	gcctgtat	gg	gg	gg	gg	2160	
gcctgc	ggggcg	tt	gg	gg	gg	2220	

agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagta	ctgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccagg	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcccgtccag	gaagcccac	ggcccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacatggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccagaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacagt	ggttggaaagg	gtaccctcc	agcgtgaccc	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctccgtatcg	gccccggagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcqcg	2820
gccgactgat	aa					2832

<210> 23

<211> 2814

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN GReX3T4-L

<400> 23

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgcccgtatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggttcgac	agtggcgac	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	caccggcgac	cgtagggac	cgtagctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcg	acgcttgcca	gaggcgcacac	acgaagcgat	cgtagggcg	300
ggccaaacagt	ggtccggcg	acgcgtctg	gaggccttgc	tcacggtg	gggagagttg	360
agaggttccac	cgttacagt	ggacacaggc	caacttctca	agattgc	acgtggcg	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgatgg	cgcaatgcac	tgacgggt	cccgctcaac	480
ttgacccccc	agcaggtgtt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctgag	540
acggtcacg	ggctgttgcc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gttgcacccc	ggagcaggt	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcgc	caggcgcttgc	agacggtca	cgccgttgc	660
ccgggtctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	720
ggcggtggca	agcaggcg	ggagacggc	cagcggtgt	tgccgtgt	tgccag	780
caeggcttga	ccccggagca	ggtggggcc	atcgccagcc	acgatggcg	caagcagg	840
ctggagacgg	tccagggcgt	gttgcgg	ctgtgccc	cccacgg	gccccccag	900
caggtgg	ccatcgccag	caatggcg	ggcaagcagg	cgctggagac	ggccagcg	960
ctgttgcgg	tgctgtgcca	ggccacggc	ttgacccccc	agcaggtgt	ggccatcg	1020
agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctgg	acggtccac	ggctgtgt	gtgtgt	1080
caggccacg	gttgcacccc	ggagcagg	gtggccat	ccagaat	tggggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtca	ggcgctgtt	ccgggtctgt	gccaggccca	cggttgc	1200
ccccagcagg	tgtgtggccat	cgccagca	ggcggtgg	agcaggcg	ggagacgt	1260
cagcggtgt	tgccgtgt	gtgccc	cacggcttga	ccccca	ggtgggtg	1320
atcgccagca	ataatggtg	caagcagg	ctggagacgg	tccaggg	gttgcgt	1380
ctgtgcagg	ccacggc	gacccgg	cagggtgt	ccatcgcc	caatattgt	1440
ggcaaggcagg	cgtggagac	ggtgcagg	ctgttgc	tgctgtg	ggcccacgg	1500
ttgacccccc	agcaggtgtt	ggccatcg	agcaatatt	gtggcaag	ggcgctgg	1560
acggtgagg	cgctgtgc	gtgtgt	caggcccac	gttgcacccc	ccagcagg	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtgc	caggcg	agacggtca	cgccgttgc	1680
ccgggtctgt	gcccggccca	cggttgacc	ccggagg	tggtggccat	cgccagccac	1740
gatggccgca	agcaggcg	ggagacgg	caggcg	tgccgtgt	gtgcag	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggggcc	atcgcc	atggcg	caagcagg	1860
ctggagacgg	tccagggcgt	gttgcgg	ctgtgccc	cccacgg	gccccccag	1920
caggtgg	ccatcgccag	caatggcg	ggcaagcagg	cgctggagac	ggccagcg	1980
ctgttgcgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtgt	ggccatcg	2040
agcaatggcg	gccccggcc	ggcgctgg	agcattgt	cccagttatc	tcggccgt	2100
ccggcggtgg	cccggttgc	caacgacc	ctcgctgc	tggctgt	cgccgggg	2160
cctgcgtgt	atcgactgaa	aaaggatt	ggggatccta	tcagccgtt	ccagctgt	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccg	tggaggaca	agctgaagta	cgtgcccac	2280
gagtagatcg	agctgatcg	gatccccgg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagat	2340
aaggtatgg	agttttcat	gaaggtgt	tgacagg	gcaagcac	ggccggctcc	2400

	aggaagcccg acggcgccat ctacaccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcgtg	2460
	gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccatacg gccaggccga cgaaatgcag	2520
	aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtggaaag	2580
	gtgtaccctt ccacgtgac cgagtcaag ttctgttgc tgtccggcca cttcaaggcc	2640
	aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgtctg	2700
	tccgtggagg agtcctgtat cggcgccgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag	2760
	gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttgc cggccgactg ataa	2814
	<210> 24	
	<211> 2832	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> TALEN GReX3T4-R	
10	<400> 24	
	atgggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgataaagg agaccggccgc tgccaagttc	60
	gagagacagc acatggacagc catcgatatac gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag	120
	cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cgttcgacag tggcgccagca ccacgaggca	180
	ctggtcggcc acgggtttac acacgcccac atcggtgcgt taagccaaca cccggcagcg	240
	ttagggaccc tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgacag cggtgcgcaga ggcgacacac	300
	gaagcgatcg ttggcgctgg caaacagtgg tccggcgccac ggcgtctggaa ggccttgc	360
	acgggtggcg gagagtttag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag	420
	attgcaaaac gtggcgccgt gaccgcagtg gaggcagtgatc atgcattggcg caatgcactg	480
	acgggtgccc cgctcaactt gaccccccag cagggtggtg ccatcgccag caatggcggt	540
	ggcaagcagg cgctggagac ggtccagccgg ctgttgcggg tgctgtgcgc gggccacggc	600
	ttgaccggcggc acagggtgtt ggccatcgcc acggccacgtg gggcaagca ggcgctggag	660
	acgggtccacg ggctgttgcc ggtctgtgc caggcccacg gcttgcaccc ggagcaggtg	720
	gtggccatcg ccagccacga tggcgcaag caggcgctgg agacgggtcca gggctgtttg	780
	ccgggtgtgt gccaggcccc cggcttgacc cgggagccagg tggtggccat gggccagcaat	840
	attggtggca acgaggcgct ggagacgggtg caggcgctgt tgccgggtgt gtggccaggcc	900
	cacggcttga ccccgaggca ggtggggcc atcgccagcc acgtggccgg caagcaggcc	960
	ctggagacgg tccagcggtc gttgcgggtg ctgtgcagg cccacggctt gacccggag	1020
	cagggtgtgg ccatcgccag caatattggt ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcc	1080
	ctgttgcggg tgctgtgcgc ggcccacggc ttgacccggg agcagggtgtt ggccatcgcc	1140
	agcaatattg gtggcaagca ggctgtggag acgggtgcagg cgctgttgcc ggtctgtgc	1200
	caggcccacg gcttgcaccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagaataa tggtgccaaag	1260
	caggcgctgg agacgggtcca gggctgttg cgggtgtgt tgccaggcccc cggcttgacc	1320
	cccccaggagg tggtggccat cgccagcaat ggggggtggca agcaggcgct ggagacggc	1380
	caggcgctgt tgccgggtgt gtggccaggcc caggcgcttg ccccccaggca ggtgggtggcc	1440
	atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggtt gttgcgggtg	1500
	ctgtgcagg cccacggctt gacccggag cagggtggtg ccatcgccag caatattggt	1560
	ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcc ctgttgcggg tgctgtgcgc ggcccacggc	1620
	ttgaccggcggc acagggtgtt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag	1680
	acgggtgcagg cgctgttgcc ggtctgtgc caggcccacg gcttgcaccc ccagcagggtg	1740
	gtggccatcg ccagcaataa tggtgccaaag caggcgctgg agacgggtcca gggctgttg	1800
	cogggtgtgt gcaggcccc cggcttgacc cgggaggccagg tggtggccat cgccagcaat	1860
	attggtggca acgaggcgct ggagacgggtg caggcgctgt tgccgggtgt gtggccaggcc	1920
	cacggcttga ccccgaggca ggtggggcc atcgccagcc acgtggccgg caagcaggcc	1980
	ctggagacgg tccagcggtc gttgcgggtg ctgtgcagg cccacggctt gacccctcag	2040
	cagggtgtgg ccatcgccag caatggccgg ggcaggccgg cgctggagag cttgttgcc	2100
	cagttatctc gcctgtatcc ggcgttggcc ggcgttgcacca acgaccaccc cgtcgcccttgc	2160
	gcctgcctcg gggggcgtcc tgcgttggat gcaatggaaa agggattggg ggatccatc	2220
	agccgttccc agtgggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag	2280
	ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccggaa cagcaccacag	2340
	gaccgtatcc tggagatgaa ggtgttgcggat ttcttcatcg aggtgtacgg ctacaggggc	2400
	aagcacctgg gcccgtccacg gaagccccac ggcggccatct acaccgtggg ctccccccatc	2460
	gactacggcg tgatcggttgc caccaggccc tactccggcg gtcacaacct gcccacccggc	2520
	caggcccacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac	2580
	cccaacggat ggtggaaagggt gtacccttcc agcgtgaccc agttcaagtt cctgttgcgt	2640

tccggccact tcaaggccaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac	2700
tgcaacggcg cctgtgtgc cgtggaggag ctccgtatcg gggcgagat gatcaaggcc	2760
ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgac	2820
gcccactgat aa	2832

5 <210> 25

<211> 2814

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> TALEN GReX5T1-L

<400> 25

atggggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
gctatcgata tcgcccgtat acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
aaacccgaagg ttcggtcgac agtggcgac caccacgagg cactggcg ccacgggttt	180
acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa caccacggcag cgtagggac cgtcgctgtc	240
aagtatcagg acatgatcg c acgttgccaa gaggcggac acgaagcgat cgttggcg	300
ggcaaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tcacgggtgc gggagagtg	360
agagggtccac cggttacagt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcg	420
gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcattt cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
ttgacccccc agcagggtgtt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgctggag	540
acgggtccagc ggctgttgc ggtgtgtgc caggcccacg gcttacccccc ccagcagg	600
gtggccatcg ccagcaataa ttgtgcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	660
ccgggtctgt gccaggcccc cggctgtacc cccacggcagg ttgtggccat cggcagcaat	720
ggcgggtggca agcaggcgct ggagacggc caggggtgt tgccgggtgt gtcgcagg	780
cacggcttgc ccccccacgca ggtgtgtggc atcgccagca ataattgggtt caagcagg	840
ctggagacgg tccagcggtt gttccgggtt ctgtgtccagg cccacggctt gaccccccacg	900
cagggtgtgg ccacgtccacg caatggcggtt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagg	960
ctgttgcggg tgctgtgcac ggccccacggc ttgacccccc acgggtgtt ggccatcgcc	1020
agccacgatg gcccggcaaggc ggcgttggag acgggtccacg ggctgtgtcc ggtgtgtgc	1080
caggcccacg gtttacccccc ggagcagggtg gtggccatcg ccagcaatat ttgtggcaag	1140
caggcgctgg agacgggtca ggcgttggc cccgggtgt tgccggccat cggcttgcacc	1200
ccggagcagg tgggtggccat cggccacccac gatggcgccca agcaggcgct ggagacgg	1260
cagcgctgt tgccgggtgt tgccggggcc caccgggttg ccccccacgca ggtgtgtgg	1320
atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccaggcggtt gttggcggt	1380
ctgttgcagg cccacggctt gaccccccacg cagggtgtgg ccacgtccacg caataatgg	1440
ggcaaggcagg cgctggagac ggtccaggcg ctgttgcgg tgctgtgcac ggccccacgg	1500
ttgacccccc acgggtgtgtt ggccatcgcc acgaatggcg gtggcaagca ggcgttggag	1560
acgggtccacg ggctgtgtcc ggtgtgtgc caggccccacg gtttacccccc ccagcagg	1620
gtggccatcg ccacgtatgg cgggtggcaag caggcgctgg agacggtcca gggctgttg	1680
cgggtgtgtt gccaggcccc cggctgtacc cccacggcagg ttgtggccat cggcagcaat	1740
aatttgggtca agcaggcgct ggagacggc caggggtgt tgccgggtgt gtcgcagg	1800
cacggcttgc ccccccacgca ggtgtgtggc atggccacgca ataattgggtt caagcagg	1860
ctggagacgg tccagcggtt gttccgggtt ctgtgtccagg cccacggctt gaccccccacg	1920
cagggtgtgg ccacgtccacg caatattggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcagg	1980
ctgttgcggg tgctgtgcac ggccccacggc ttgacccccc acgggtgtt ggccatcgcc	2040
agcaatggcg gggcgaggcc ggcgttggag acgttggtgc cccagttatc tggccctgtat	2100
ccggcggtgg ccccggttgc acacgaccac ctgtgtcgcc tggccgttgc cggcggttgc	2160
cctgcgttgc atgcgtgtaa aaaggattt gggatccca tcagccgttc ccagctgttg	2220
aagtccgacg tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
gagtacatcg agctgtatcg gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
aaggtgtatgg agtttccat gaagggtgtac ggttacaggg gcaaggcaccc gggcggttcc	2400
aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtt ggttcccccac tcgactacgg cgtgtatgt	2460
gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctggccatcg gccaggccga cggaaatcg	2520
aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aacgacatca accccaacga gtgggtgg	2580
gtgttccctt ccacgtgtac cgagttcaag ttctgttgc tggccggccca cttcaagg	2640
aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcggttgc	2700
tccgtggagg agcttccat cgccggcgag atgatcaagg cggccaccctt gaccctggag	2760
gagggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814

5 <210> 26
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> TALEN GReX5T1-R
 <400> 26

atggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagt	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgatctac	gcacgctcg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	ttcgacag	tggcgac	ccacgagg	180
ctggctggcc	acgggttac	acacgcac	atcggtcg	taagccaaca	ccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgac	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtgg	tccggcgac	gcgctctgg	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttgag	aggtccac	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgccgt	gaccgcagt	gaggcagtgc	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgc	taact	gaccccg	cagg	gtggccat	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtcaggc	ctgttgc	tgctgtgca	ggcccacggc	600
ttgacc	cccc	acaggtgtt	gccc	atcg	gtggcaagca	660
acgg	tc	cagg	gtc	ggcc	ggcgtggag	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcgcaag	caggcgctt	agacgttca	gcccgtt	780
cgg	gt	gtgt	gtgt	gggt	ggccagccac	840
gatggcgca	ac	aggcg	gtgt	ggcc	gtgcccagg	900
cacgg	ct	tt	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	960
ctggagacgg	tcc	agcg	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1020
cagg	gtgt	ccat	cgcc	ccat	gtgtgtgt	1080
ctgttgc	cc	atgtt	ggca	ggca	gtgtgtgt	1140
agccacatg	gc	ggca	ggcg	ggcg	gtgtgtgt	1200
cagg	cc	acat	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1260
cagg	cg	gtgt	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1320
cccc	agg	gtgt	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1380
cagg	cg	gtgt	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1440
atgc	cc	atgtt	ggca	ggca	gtgtgtgt	1500
ctgt	cc	acgg	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1560
ggca	ac	ggcg	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1620
ttgacc	cc	agg	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1680
acgg	gt	gtgt	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1740
gtggccatcg	cc	agcaat	tgg	gggt	gtgtgtgt	1800
ccgg	gt	gtgt	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1860
gatggcgca	ac	aggcg	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1920
cacgg	ct	ggag	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	1980
ctggagacgg	tgc	aggcg	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	2040
cagg	gt	gtgt	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	2100
cagg	at	cgcc	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	2160
gcct	cg	gtgt	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	2220
agcc	gt	gtgt	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	2280
ctga	at	cgac	gtac	gtac	gtgtgtgt	2340
gacc	gt	atcg	atcg	atcg	gtgtgtgt	2400
aag	cac	tgg	gat	gat	gtgtgtgt	2460
gact	ac	ggcg	gtat	gtat	gtgtgtgt	2520
cagg	cc	ac	cg	cg	gtgtgtgt	2580
ccca	ac	gg	gtat	gtat	gtgtgtgt	2640
tcc	gg	gg	gg	gg	gtgtgtgt	2700
tgca	ac	gg	gg	gg	gtgtgtgt	2760
ggc	ac	cc	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	2820
ggc	ac	ct	gtgt	gtgt	gtgtgtgt	2832

15 <210> 27
 <211> 2814

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> TALEN GReX5T2-L

<400> 27

atgggcgatc	ctaaaaaagaa	acgtaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgcccgtatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgac	caccacgagg	caactggtcgg	ccacgggtt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgtgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgtc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgtctg	gaggccttgc	tcacgggtgc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagt	ggacacagge	caacttctca	agatgtcaaa	acgtggcgac	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgaccggcg	agcaggtgg	gcccattcgcc	agcaatattt	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acgggtgcagg	cgtgttgc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgcaccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtgcaag	caggcgctgg	agacgggtca	gcccgtgtt	660
ccgggtgtgt	gcccggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	ttgtggccat	cccgctcaac	720
aatggtgca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggtgt	tgccgggtgc	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtgtggcc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgcgggt	ctgtgccaagg	cccacggctt	gaccccccag	900
caggtgttgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	gttccagcgg	960
ctgttgcgg	tgtgtgtcca	ggcccacggc	ttgacccccc	agcaagggtgt	ggccatcgcc	1020
agcaatattt	gtggcaagca	ggcgctggag	acgggtgcagg	cgctgttgc	gtgtgtgtgc	1080
cagggccacg	gcttgcaccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	ttgtggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgtt	ccgggtgt	gccaggccca	ccgcttgacc	1200
coggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	gatggcgcc	agcaggcgct	ggagacggc	1260
cagcggtgt	tggcggtgt	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	gttggtgcc	1320
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	ttgtccgggt	1380
ctgtgcagg	ccacaggctt	gaccccgag	caggtgggtt	ccatcgccag	ccacgatggc	1440
ggcaagcagg	cgttggagac	ggccagcgg	ctgttgcgg	tgctgtgc	ggcccacggc	1500
ttgacccccc	agcagggtgt	gcccattcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtccagg	ggctgttgc	ggtctgtgc	caggcccacg	gcttgcaccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	cagggcgctt	agacggtcca	gcccgtgtt	1680
cgggtgtgt	gcccaggccca	cggttgcacc	ccccagcagg	ttgtggccat	ccccagcaat	1740
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggtgt	tgccgggtgc	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtgtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggt	ctgtgccaagg	cccacggctt	gaccccgagg	1920
caggtgttgg	ccatcgccag	ccacgttggc	ggcaagcagg	cgctggagac	gttccagcgg	1980
ctgttgcgg	tgtgtgtcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaagggtgt	gcccattcgcc	2040
agcaatggcg	gccccaggcc	ggcgctggag	agcattgtt	cccagttatc	tcgcccctgtat	2100
coggcggtgg	cccgcttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggctctgcct	ccggggggcgt	2160
cctgcgttgg	atgcagtgaa	aaaggattt	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctgggt	2220
aagtccgagg	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgcccccac	2280
gagtagatcg	agctgatcg	gatccccgg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtatgg	agtttttcat	gaaggtgtac	ggctacagg	gcaagcacct	ggcggtgtcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacacgtt	ggctccccca	tcgactacgg	cggtatgt	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggttacaac	ctggccatcg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtgggtggaa	2580
gtgttacccct	ccagcggtac	cgagtcaag	ttcctgttgc	tgtccggcca	tttcaagggc	2640
aactacaagg	cccgactgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgt	2700
tccgtggagg	agctcctgtat	cggcgccgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttgc	cgcccgactg	ataaa	2814

10

<210> 28
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> TALEN GReX5T2-R

<400> 28

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagg	tc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgat	atc	gcacgctcg	ctacagcc	ag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	tt	cgatcgac	ggcgcag	ccacgagg	180
ctggcggcc	acgggttac	acacgcgc	atcg	taagccaa	cccggcag	cg	240
ttaggaccg	tcgctgtcaa	gtatcagg	atgatcg	cg	ttgc	ccaga	300
gaagcgatcg	ttggcgtcg	caa	acagtgg	tccggcgc	g	gc	360
acggtggcg	gagagttag	agg	tcac	ttac	ac	acaggcc	420
attcaaaac	gtggcggcgt	gacc	gc	atcg	at	gcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gac	cccccc	cagg	ccat	cgcc	540
ggcaagcagg	cgctggagac	gttcc	ca	gttgc	tg	ctgtcc	600
ttgacc	ccgg	agcagg	ttgt	ccat	gc	ggccac	660
acggtgcagg	cgctgtgc	gttgc	gtgt	ccagg	cc	agg	720
gtggccatcg	ccagcaataa	tgg	ggcaag	cagg	ccat	gctgtt	780
ccgg	gtgt	ccat	ggc	ccat	cc	ccag	840
gatggcggca	agcaggcg	ggag	acgg	tc	tg	ccgtgt	900
cacggcttga	ccccccagca	gtt	gggt	ggcc	at	atgttgg	960
ctggagacgg	tccagcg	gtt	ggc	gttgc	cc	acgg	1020
cagg	gg	ccat	ggc	gg	cc	ccag	1080
ctgttgc	tgctgtgc	gg	cc	ttgt	gg	ccat	1140
agcaatattt	gtggcaag	ggc	gc	tc	gg	ccat	1200
caggcccac	gttgcac	cc	ag	tc	cc	caataa	1260
cagg	gtgt	agac	gg	tc	cc	tggcaag	1320
cccc	gg	gg	gg	tc	cc	ggccat	1380
cagcgg	gtgg	ccat	gg	tc	cc	ggc	1440
atcgccag	acgatggc	caag	cg	tc	cc	atgttgg	1500
ctgt	ccagg	cccac	gg	tc	cc	ccat	1560
ggcaagcagg	cgctggag	gtt	gc	tc	cc	ggccac	1620
ttgacc	ccat	ggc	tc	tc	cc	ggctgttgc	1680
acgg	gtgt	ggc	tc	tc	cc	ccag	1740
gtggccatcg	ccagcaataa	tgg	ggcaag	cagg	ccat	ggctgttgc	1800
ccgg	gtgt	ccat	gg	tc	cc	ccat	1860
atgg	ggca	agcagg	gttgc	tc	cc	ggccag	1920
cacgg	gtgt	ccat	gg	tc	cc	ccat	1980
ctggagacgg	tccagcg	gtt	gc	tc	cc	ccat	2040
cagg	gg	ccat	gg	tc	cc	ccat	2100
catttatc	gcctgat	ggc	gttgc	tc	cc	ccat	2160
gcctgcctcg	gggg	gttgc	tc	tc	cc	ccat	2220
agccgttccc	agctgg	gttgc	tc	tc	cc	ccat	2280
ctgaagtac	tgcccac	gt	acat	tc	cc	ccat	2340
gaccgtatcc	tggagat	gg	tgat	tc	cc	ccat	2400
aagcacctgg	gggg	tc	tc	tc	cc	ccat	2460
gactacggcg	tgat	tc	tc	tc	cc	ccat	2520
caggccgac	aaat	tc	tc	tc	cc	ccat	2580
cccaac	gttgg	tc	tc	tc	cc	ccat	2640
tccggccact	tcaagg	tc	ac	tc	cc	ccat	2700
tgcaacggcg	ccgt	tc	tc	tc	cc	ccat	2760
ggcac	ccct	tc	tc	tc	cc	ccat	2820
gcccactgat	aa						2832

5

<210> 29

<211> 2814

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN GReX5T3-L

15 <400> 29

atgggcgatc	ctaaaaaagaa	acgtaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60	
gctatcgata	tcgcccgtatct	acgcacgc	tc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggttcgac	agtggc	gag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacggg	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgttagggac	cgtcgctg	240	
aagtatcagg	acatgatcg	acgcgtgcca	gaggc	gacac	acgaagcgat	cgttggcg	300
ggcaaaacagt	ggtccggcgc	acgcgtctg	gaggcc	ttgc	tcacgg	ttgc	360
agaggtccac	cgttacagt	ggacacag	gc	caacttctca	agattgc	aaa	420
gtgaccgcag	tgaggc	gat	gcat	gat	tgacgg	gtc	480
ttgacccccc	agcagg	gtt	ggccat	ogcc	gcaat	ggcg	540
acgg	cc	gtt	ggc	gg	gtt	gg	600
gtggccatcg	ccagcaat	at	ttgt	gcaag	gag	ggc	660
cgg	gt	gt	cc	gg	gg	gtt	720
ggcgttgc	ggcagg	gg	gg	gg	gg	gg	780
cacgg	ctt	gtt	gg	gg	gg	gg	840
ctggagacgg	tgcaagg	gtt	gg	gg	gg	gg	900
cagg	gtt	gg	gg	gg	gg	gg	960
ctgttgc	ccatcg	caat	gg	gg	gg	gg	1020
ggcagg	ggc	gg	gg	gg	gg	gg	1080
agcaataat	gtgg	caag	gg	gg	gg	gg	1140
cagg	cc	at	ttgt	gg	gg	gg	1200
cagg	gt	gt	gg	gg	gg	gg	1260
ccgg	gag	gg	gg	gg	gg	gg	1320
cagg	cg	gt	gg	gg	gg	gg	1380
ctgt	gc	cc	gg	gg	gg	gg	1440
ggca	agc	gg	gg	gg	gg	gg	1500
ttgaccc	cc	gg	gg	gg	gg	gg	1560
acgg	gt	gt	gg	gg	gg	gg	1620
gtggccatcg	ccag	caat	gg	gg	gg	gg	1680
ccgg	gt	gt	gg	gg	gg	gg	1740
att	gg	gg	gg	gg	gg	gg	1800
cacgg	ctt	ga	gg	gg	gg	gg	1860
ctggagacgg	tcc	aggg	gt	gg	gg	gg	1920
cagg	gtt	gg	gg	gg	gg	gg	1980
ctgttgc	cc	gg	gg	gg	gg	gg	2040
agcaat	gg	gg	gg	gg	gg	gg	2100
cgg	gtt	gg	gg	gg	gg	gg	2160
cctgc	gt	gg	gg	gg	gg	gg	2220
aagg	gt	gg	gg	gg	gg	gg	2280
aagt	cc	gg	gg	gg	gg	gg	2340
gatc	cc	gg	gg	gg	gg	gg	2400
agg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	2460
gac	cc	gg	gg	gg	gg	gg	2520
agg	gt	gg	gg	gg	gg	gg	2580
gtgt	accc	cc	gg	gg	gg	gg	2640
aact	aca	cc	gg	gg	gg	gg	2700
tcc	gt	gg	gg	gg	gg	gg	2760
gagg	gt	gg	gg	gg	gg	gg	2814

5 <210> 30
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> TALEN GReX5T3-R
 <400> 30

atgggcgatc	ctaaaaaagaa	acgtaaggc	atcgataagg	agaccgcgc	tgccaagt	60
gagagac	acatggac	ac	tg	ccat	ac	120

cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgttcgacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtgcgt	taagccaaca	cccgccagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cgttgcaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgcctctgga	ggccttgc	360
acggtgtggcg	gagagttgag	aggttcaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgccgt	gaccgcagtg	gaggcagtgc	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgcgtcaactt	gacccccag	cagggtggtg	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgcgtggagac	ggtccagcg	ctgttgc	tgctgtgc	ggcccacggc	600
ttgaccggcg	agcaggtgtt	ggccatcgcc	agcaatattt	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acggtgtcagg	cgcgttgc	ggtgcgtgtc	caggcccacg	gtttgacccc	ccagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	ggggctgttg	780
ccgggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtgccat	cgccagccac	840
gatggccggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtctgt	tgccgggtct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggggcc	atcgccagcc	acgtggcg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggt	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccacg	1020
caggtgggt	ccatcgccag	caatgcgg	gcggcagg	cgctggagac	gttccagcg	1080
ctgttgc	tgctgtgc	ggcccacggc	ttgaccccg	agcaggtgtt	ggccatcgcc	1140
agccacatg	gcggcaagca	ggcgctggag	acggtccacg	ggctgttgcc	gtgcgtgtc	1200
cagggccacg	gtttgacccc	ggagcagg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	1260
cagggcgtgg	agacggtcca	ggcgctgtt	ccgggtctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
ccggagcagg	tgtggccat	cgccagcaat	attgtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	1380
cagggcgtgt	tggcgggt	gtggcaggcc	cacggcttga	ccccggagca	gttggtgcc	1440
atcgccagca	atattggtg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgcgggt	1500
ctgtgcccagg	ccacggctt	gacccccacg	cagggtggtg	ccatcgccag	caataatggt	1560
ggcaagcagg	cgcgtggagac	ggtccagcg	ctgttgc	tgctgtgc	ggcccacggc	1620
ttgacccccc	agcaggtgtt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgcgtgtc	caggcccacg	gtttgacccc	ccagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	ggggctgttg	1800
ccgggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	1860
aatgtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtctgt	tggcgggt	gtgcagggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtggggcc	atcgccagca	atattggtg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tgaggcgct	gttgcgggt	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccttcag	2040
caggtgggt	ccatcgccag	caatgcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gcctgtatcc	ggcggtggcc	gcgttgcacca	acgaccac	cgtcgccttg	2160
gcctgcctcg	gggggggtcc	tgcgttgc	gcagtga	aggattggg	ggatccatc	2220
agccgttccc	agctgtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagatcg	tggccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccagg	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	ggggctccag	gaagcccac	ggcgcacatc	acaccgtgg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcggtt	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaac	gcccacatcg	2520
caggcccacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccagaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacacgt	gttggaaagg	gtaccctcc	agcgtgaccc	agttcaagtt	cctgttcgt	2640
tccggccact	tcaaggccaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacacggcg	ccgtgtgtc	cgtggaggag	ctctgtatcg	gcccggagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgagggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcg	2820
ggcgactgtat	aa					2832

5 <210> 31
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Cebador directo GR exón 2

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n es a o c o t o g

 <400> 31

	ccatctcatac cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ggttcattta acaagctgcc	60
5	<210> 32 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo GR exón 3	
15	<220> <221> misc_feature <222> (31)..(40) <223> n es a o c o t o g	
20	<400> 32 ccatctcatac cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn gcattctgac tatgaagtga	60
25	<210> 33 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador directo GR exón 5	
35	<220> <221> misc_feature <222> (31)..(40) <223> n es a o c o t o g	
40	<400> 33 ccatctcatac cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn tcagcaggcc actacaggag	60
45	<210> 33 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial	69
50	<220> <223> Cebador inverso GR exón 2	
55	<400> 34 cctatccct gtgtgccttg gcagtcctcag agccagttag ggtgaagacg	50
60	<210> 35 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso GR exón 3	
	<400> 35 cctatccct gtgtgccttg gcagtcctcag gggctttgca tataatggaa	50
	<210> 36 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>			
	<223>	Cebador inverso GR exón 5		
5	<400> 36	cctatccccct gtgtgccttg gcagtcttag ctgactctcc ccttcatagt ccccagaac		59
	<210> 37			
	<211> 49			
10	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	TRAC_T01		
15	<400> 37	ttgtccccaca gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgaga		49
	<210> 38			
	<211> 49			
20	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
25	<223>	TRBC_T01		
	<400> 38	tgtgttttag cc当地cagaag cagagatctc cc当地ccaa aaggccaca		49
	<210> 39			
30	<211> 50			
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
35	<223>	TRBC_T02		
	<400> 39	ttcccacccg aggtcgctgt gttttagccca tc当地agcag agatctccca		50
	<210> 40			
40	<211> 49			
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
45	<223>	CD52_T02		
	<400> 40	ttcctcttac tc当地catcag cctcctggtt atggtacagg taagagcaa		49
	<210> 41			
50	<211> 530			
	<212>	PRT		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
55	<223>	Repetición TRAC_T01-L		
	<400> 41			

ES 2 828 669 T3

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

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

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

ES 2 828 669 T3

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val

ES 2 828 669 T3

435

440

445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 42
<211> 530
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Repetición TRAC_T01-R
10 <400> 42

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

ES 2 828 669 T3

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val

ES 2 828 669 T3

355

360

365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 43
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Repetición TRBC_T01-L
 <400> 43

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

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

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys

ES 2 828 669 T3

275

280

285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
340 345 350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 44
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Repetición TRBC_T01-R

<400> 44

10

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

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

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190

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

ES 2 828 669 T3

195

200

205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

ES 2 828 669 T3

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 45

<211> 530

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición TRBC_T02-L

10

<400> 45

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu

ES 2 828 669 T3

115

120

125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 46
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Repetición TRBC_T02-R
 <400> 46

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly

ES 2 828 669 T3

35

40

45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

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

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
275 280 285

ES 2 828 669 T3

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 47
<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Repetición CD52_T02-L

<400> 47

Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Lys
1					5				10						15

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

His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly
						35			40				45		

Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys
						50		55				60			

Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His
65					70				75				80		

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

Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala
						100			105				110		

Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu
						115		120				125			

Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala
						130		135			140				

Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg
145							150			155			160		

Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val
						165		170			175				

Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val
						180		185			190				

Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Gln
							195		200			205			

ES 2 828 669 T3

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
340 345 350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 48

<211> 530

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición CD52_T02-R

10

<400> 48

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350

Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 49

<211> 2814

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN TRAC_T01-L

10

<400> 49

atggcgatc	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60	
gctatcgata	tcgcccgc	atctcgatct	acgcacgc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggtcgac	atgtggcg	cagc	caccacgagg	caactggcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggac	cgtagctgtc	240	
aagtatcagg	acatgatcgc	acgttgccaa	gaggcgacac	acgaagcgat	cggtggcg	300	
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgc	ctgtgc	tcacgggtgc	gggagagttg	360	
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcg	420	
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgc	atgcac	tgacgggtgc	cccgc	480	
ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcg	540	
acggtccac	ggctgttgc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgc	ccagc	600	
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtgcaag	caggcg	ctgg	agacgg	660	

ccgggtctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	720
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggtgt	tgccggtgt	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggggcc	atcgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggt	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccggag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	gcaagcagg	cgctggagac	gttccagcg	960
ctgttccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gccccaaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	gtgtgtgtgc	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcagggt	gtggccatcg	ccagcaatat	ttgtggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtca	ggcgctgtt	ccgggtgtgt	gcccggcca	cggttggacc	1200
ccggagcagg	tggtgccat	cgccagccac	gatggcggca	agcaggcgct	gagagacggc	1260
cagcggtgt	tgccgggtgt	gtgcccaggc	cacggcttga	ccccggagca	gttgggtggcc	1320
atcgccagca	atattgggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaaggcgct	gttccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatgtt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgcgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccg	agcaggtgg	ggccatcgcc	agcaatattt	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acgggtcagg	cgctgttgcc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggt	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgtg	1680
ccgggtgtgt	gcccggcca	cggtctgacc	ccggagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	1740
attggtgca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgctgt	tgccgggtgt	gttccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggt	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccggag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	gcaagcagg	cgctggagac	gttccagcg	1980
ctgttccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gccccggcc	ggcgctggag	agcattgtt	cccagttatc	tcggccctgt	2100
ccggcggtgg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggctgcct	cgccggggcgt	2160
cctgcgtgg	atgcagtgaa	aaaggattt	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctgggt	2220
aagtccgago	tggaggagaa	aaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgcccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcg	gatcccccg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aagggtatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	gtctacaggg	gcaagcacct	ggccggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgt	gtctccccca	tcgactacgg	cggtatcg	2460
gacaccagg	cctactccgg	cggttacaac	ctgcccattcg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gttggtggaa	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagtcaag	ttctgttgc	tgtccggcca	tttcaaggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgtc	2700
tccgtggagg	agctctgtat	cgccggcgag	atgatcaagg	cgccacccct	gaccctggag	2760
gagggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttgc	cgcccgactg	ataaa	2814

<210> 50

<211> 2832

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN TRAC_T01-R

10 <400> 50

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgatctac	gcacgctgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	cttgcacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtgtgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tgcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgac	cgttgcccaga	ggcgcacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctgg	caaacagtgg	tcggcgccac	ggtctctgg	ggccttgc	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtcaccg	ttacagttt	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgccgt	gaccgcagt	gaggcagtgc	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgtccc	cgctcaactt	gacccggag	cagggtggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgcgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgcaccc	ggagcagggt	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgtt	780
ccgggtgtgt	gccaggccca	cggttgcacc	ccggagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	840
attggtgca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgctgt	tgccggtgt	gtgccaggcc	900

cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg 960
 ctggagacgg tccagcggct gttgcgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 1020
 caggtgtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 1080
 ctgttgcggg tgctgtgcca gccccacggc ttgacccccc agcaggtggt ggccatcgcc 1140
 agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggccatcg ggctgttgc ggtgtgtgc 1200
 caggcccacg gcttgcaccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagaataa tggtgccaaag 1260
 caggcgttgg agacggtcca gcccgttgc cgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc 1320
 ccccagcagg tggtgccat cggccatcg aatggtgcc agcaggcgct ggagacggtc 1380
 cagggctgt tgccgggtgt gtgcaggcc cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc 1440
 atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg tccagcggct gttgcccgg 1500
 ctgtgcagg cccacggctt gacccggag caggtggtgg ccatcgccag caatattgt 1560
 ggcaaggcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctgttgcggg tgctgtgcca ggcccaegg 1620
 ttgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgtg gcccgttggag 1680
 acggccatcg ggtgttgc ggtgtgtgc caggccacg gcttgcaccc ggagcagggt 1740
 gtggccatcg ccagcaatat tggtgccaaag caggcgttgc agacggtgc ggcgtgttgc 1800
 cgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc cggagccagg tggtgccat cggccatcg 1860
 gatggccggca agcaggcgct ggagacggtc cagggctgt tgccgggtgt gtgcaggcc 1920
 cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg 1980
 ctggagacgg tccagcggct gttgcgggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag 2040
 caggtgtgg ccatcgccag caatggccgc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgc 2100
 cagttatctc gcctgtatcc ggcgttggcc ggcgttgcacca acgaccaccc cgtcgcc 2160
 gctgtctcg gggggcgttc tgcgttggat gcaatggaaa agggattggg ggatcttac 2220
 agccgttccc agctggtcaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
 ctgaagtaag tggccacca gtacatcgag ctgatcgaga tgcggccggaa cagcaccc 2340
 gaccgtatcc tggagatgaa ggtgttggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacagg 2400
 aagcacctgg gcccgttccag gaagccgcac ggcgttccatct acaccgtggg ctccccatc 2460
 gactacggcg tgcgttggca caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccattcc 2520
 cagggccacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccagaacaa gacatcaac 2580
 cccaaacagt ggtggaaaggt gtaccctcc agcgttgcaccc agttcaagtt cctgttgc 2640
 tccggccact tcaaggccaa ctacaaggcc cagctgcacca ggctgaacca catcaccaac 2700
 tgcaacccggc cctgtgtgtc cgtggaggag ctctgtatcg gggccgagat gatcaaggcc 2760
 ggcaccctga ccctggagga ggtggaggag aagttcaacaa acggcgagat caacttcg 2820
 gggactgat aa 2832

<210> 51
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN TRBC_T01-L

10

<400> 51

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggcc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
 gctatcgata tccggcgatct acgcacgctc gggtacagcc agcagcaaca ggagaagatc 120
 aaacccgaagg ttctgttgcac agtggcgccag caccacgagg cactggtcgg ccacgggttt 180
 acacacgcgc acatcggtgc tttaagccaa caccggccag cggttagggac cgtcgctgtc 240
 aagtatcagg acatgtatcg acgcgttgcac gaggccacac acgaacgtat cgttggcg 300
 ggcaaaacagt gtcggccgc acgcgttgc gggcccttgc tcacgggtgc gggagagttg 360
 agaggtccac ctgttgcac ggacacaggc caacttctca agattgcata acgtggcg 420
 gtgacccgcac tggaggcagt gcatgtatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgttcaac 480
 ttgacccccc agcagggtggt ggccatcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgttggag 540
 acggccatcg gggttgc ggtgtgtgc caggccacg gtttgcaccc ccaggcagggt 600
 gtggccatcg ccagcaatgg cgggtggcaag caggccatcg agacggtcca gggctgttgc 660
 cccggctgt gccaggccca cggccatcgacc cccaggccag tggtgccat cccaggcaat 720
 aatggtggca agcaggccat ggagacggcc caggccatcg tgccgggtgt gtgcaggcc 780
 cacggcttga ccccccagca ggtggtggcc atcgccatcg atggcggtgg caagcaggcg 840
 ctggagacgg tccagcggct gttgcgggtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccc 900
 caggtgtgg ccacatcgccag caatggccgt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg 960
 ctgttgcggg tgctgtgcca ggccacggc ttgacccccc agcagggtggt ggccatcgcc 1020
 agcaatggcg gtggcaagca ggcgttggag acggccatcg ggtgttgc ggtgtgtgc 1080

caggcccacg	gcttgacc	ccagcagg	tgggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	gcggotgtt	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgcacc	1200
ccggagcagg	tgttggccat	cggcagcaat	attggtgcc	agcaggcgct	ggagacggtg	1260
caggcgctgt	tggcagggtgt	gtggcaggcc	cacggcttga	ccccccagca	gttggtggcc	1320
atcgccagca	ataatggtg	caagoaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	tttggcgggt	1380
ctgtgcagg	ccacaggctt	gaccggag	caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	1440
ggcaagcagg	cgttggagac	gttccagcgg	ctgttgcgg	tgctgtgc	ggcccacggc	1500
ttgacc	cccg	aggagggt	ggccatcgcc	agccacgt	ggggcaagca	1560
acggtccacg	ggctgttgc	gtgtgtgt	caggcccacg	gttggacccc	ggagcagggt	1620
gtggccatcg	ccagcaataat	tggtggcaag	caggcgctgg	agacggtca	ggcgctgtt	1680
ccggtgctgt	gcccaggccca	cggcttgc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggc	cagggctgt	tggcagggt	gtggcaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	gttggtggcc	atcgccagcc	acatggcg	caaggcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgcgggt	ctgtgcagg	cccacggctt	gaccggag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	caatattgt	ggcaagcagg	cgttggagac	gttgcaggcg	1980
ctgttgcgg	tgtgtgc	ggccacggc	ttgacc	aggagggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	ggggcaggcc	ggcgctggag	agcattgt	cccagtata	tgcctgtat	2100
ccggcgttgg	cccggttgc	caacgaccac	ctcg	tggcctgc	ccggcggcgt	2160
cctgcgttgg	atgcagtgaa	aaaggatt	ggggatcota	tca	ccagctgg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcg	gatcggccgg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaagggtac	ggctacagg	gcaagcacct	gggcggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgt	ggctccccc	tgcactacgg	cgtgatcg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	eggctacaac	ctgcccac	ggcaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaa	2580
gtgtacccct	ccagcgtac	cgagtcaag	ttcctgtt	tgtccggca	tttcaagg	2640
aactacaagg	ccca	ggctgac	cacatcacca	actgcaacgg	cccgctgct	2700
tccgtggagg	agtcctgtat	ggcggcgg	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggc	gatcaactt	cgcccact	ataa	2814

<210> 52

<211> 2832

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN TRBC_T01-R

5

<400> 52

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgttaagg	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagtt	60
gagagacacg	acatggac	catcgat	ccgatctac	gcacgctgg	ctacagcc	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	cttgcac	tggcgcagca	ccacgagg	180
ctggtccgg	acgggtttac	acacgc	gcac	atcg	ccggcagcg	240
ttagggacc	tcgtgtca	gtatc	aggac	atgatcg	cg	300
gaagcgatc	ttggcgtcg	caa	acagt	ggc	ccgac	360
acggtgcgg	gagagtt	agg	tcacc	ct	gc	420
attgc	aaaac	gtggcgg	gacc	cgat	tc	480
acgggtgccc	cg	ctcaact	gac	ccat	cg	540
ggcaagcagg	cg	ctggagac	gg	ct	cc	600
ttgacc	cc	cc	ct	tg	cc	660
acggtcacg	gg	ctgttgc	gg	tgc	cc	720
gtggccatcg	cc	agcaataa	tg	ggc	cc	780
cgg	gg	cc	gg	cc	gg	840
aatggtggca	agc	agg	gg	cc	gg	900
cacggcttga	cc	cc	gg	cc	gg	960
ctggagacgg	tc	ca	gg	cc	gg	1020
caggtgg	cc	atcg	cc	gg	cc	1080
ctgttgcgg	tc	gtgt	cc	gg	cc	1140
agcaatggcg	gt	ggcaag	cc	gg	cc	1200
caggcccacg	gtt	ggc	cc	gg	cc	1260
caggcgctgg	agac	ggt	cc	gg	cc	1320

ccccagcagg	tggggccat	cgccagcaat	ggcggtggca	agcagggcgt	ggagacggtc	1380
cagcggctgt	tgccgggtct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	gttggtgccc	1440
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccccag	cagggtggtgg	ccatcgccag	caataatgg	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	gttccagcgg	ctgttgcgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgacccccc	agcaggggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acggtccagg	ggctgttgc	gttgctgtgc	caggcccacg	gtttgacccc	ccagcagggt	1740
gtggccatcg	ccagcaataa	tggggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgtt	1800
ccggtgctgt	gcaaggccca	cggttgcacc	ccccagcagg	tggggccat	gcccagcaat	1860
ggcggtggca	agcagggcgt	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgggtct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	gttggtgccc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccttcag	2040
caggtgggtgg	ccatcgccag	caatggcgcc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgc	2100
cagttatctc	gcctgtatcc	ggcggtggcc	gogttgacca	acgaccacct	cgtegcctt	2160
gcctgcctcg	gcgggctgtcc	tgcgctggat	gcaagtaaaa	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgcggcacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccagg	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	gttgatggag	tttttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccgac	ggggccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcggtgg	caccaaggcc	taatccggcg	gctacaacct	gcccataggc	2520
caggccgacg	aatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggttggaggt	gtaccctcc	agcgtgaccc	agttaagtt	cctgttcgt	2640
tccggccact	tcaaggccaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgtctgtc	cgtggaggag	ctccgtatcg	gcccggagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcggagat	caacttcg	2820
gcccactgtaa						2832

<210> 53

<211> 2814

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN TRBC_T02-L

10

<400> 53

atgggcgatc	ctaaaaaagaa	acgtaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgcccgtat	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggtcgac	agtggcgac	caccacgagg	cactgtcg	ccacggggtt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgtatgc	agcggtgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcg	300
ggcaaaacagt	ggtccggcg	acgcgtctg	gaggccttgc	tcacggtgg	gggagagtt	360
agaggttccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgc	acgtggcg	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgtatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgaccccg	agcaggtgg	gcccattcgcc	agccacgatg	gcccgaagca	ggcgctggag	540
acggtcacgc	ggctgttgc	gggtgtgtgc	caggcccacg	gtttgacccc	ggagcagggt	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgtt	660
ccgggtgtgt	gcaggcccc	cggtgttgc	cggagcagg	tggggccat	cgccagccac	720
gatggcgca	agcaggcg	ggagacggc	cagcgctgt	tgccgggt	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggggcc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tgcaggcg	gttgcgggt	ctgtgc	ccacggctt	gacccggag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgttgc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcg	960
ctgttgcgg	tgtgtgtcc	ggcccaacggc	ttgaccccg	agcaggtgg	ggccatcgcc	1020
agccacatcg	ggggcaagca	ggcgctggag	acggtccacg	ggctgttgc	gtgtgtgt	1080
cagggccacg	gtttgacccc	ggagcagggt	gtggccatcg	ccagccacga	tggcgcaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	ggggctgtt	cggtgtctgt	gccaggccca	cggttgcacc	1200
ccccagcagg	tgtgtggccat	cgccagcaat	aatggtgcc	agcagggcgt	ggagacggc	1260
cagggctgt	tgcgggtgt	gtgcaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggcc	1320
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcg	gttgcgggt	1380
ctgtgcagg	cccacggctt	gaccccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatgg	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	gttccagcgg	ctgttgcgg	tgctgtgcca	gcccacggc	1500

ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtcacgc	ggctgttgc	ggtgctgtgc	caggccccacg	gtttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgttgc	1680
ccgggtgtgt	gccaggcccc	cggcttgacc	cgggagcagg	tggtgccat	cgccagccac	1740
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcgctgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtgcc	atcgccagca	ataatggtg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgg	cccacggctt	gaccccgag	1920	
caggtgggt	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagccg	1980
ctgttgcgg	tgctgtgc	ggccccacggc	ttgacccctc	agcaggtgg	gcccattgc	2040
agcaatggcg	gccccaggcc	ggcgctggag	agcattgttgc	cccagttatc	tcgcctgtat	2100
ccggcgttgg	ccgcgttgc	caacgaccac	ctcgctgc	tggctgc	cgccggcg	2160
cctgcgttgg	atgcagtgaa	aaaggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctgtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtagatcg	agctgatoga	gatccccgg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aagggtatgg	agttcttcat	gaagggttac	ggttacagg	gcaagcacct	gggcggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgt	ggttccccc	tcgactacgg	cgtgatcgt	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggctacaac	ctgcccattcg	gcccggccg	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaa	2580
gtgtacccct	ccagcgttgc	cgagtcaag	ttcctgttgc	tgtccggcc	cttcaaggc	2640
aactacaagg	cccagcttgc	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgt	2700
tccgtggagg	agctcctgtat	cgccggcg	atgtcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtggagga	ggaagttcaa	caacggcg	atcaacttgc	cggccgactg	ataaa	2814

<210> 54
<211> 2832

5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TALEN TRBC_T02-R

10 <400> 54

atgggcgtatc	ctaaaaagaa	acgttaagg	atcgataagg	agaccggcc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gcccgtatc	gcacgc	ctacagcc	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	gttgcacag	tggc	cacagg	180
ctgggtggcc	acgggtttac	acacgc	atcggtcg	taagcc	ccggc	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcagg	atgcgtc	cggt	ccac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcg	caaacagtgg	tccggc	gcgc	cttg	360
acgggtggcg	gagagttgg	aggttccacc	ttacagtgg	acacagg	cc	420
attgcaaaac	gtggcggcgt	gaccgc	gaggcagt	atgc	atggc	480
acgggtggcc	cgctcaactt	gacccccc	cagggtgg	ccatgc	caat	540
ggcaagcg	cgctggagac	ggtcc	cgg	ctgt	ggcc	600
ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatgc	agcaataat	gtgg	caag	660
acgggtcc	gtgtgttgc	gtgtgt	caggccc	gctt	ccag	720
gtggccatcg	ccagcaataa	ttgtgg	gaggcgt	agacgg	ctgtgt	780
ccgggtgtgt	gcccaggcc	cggtt	ccgg	tgg	ccat	840
attgggtggc	agcaggcg	ggagacgg	caggcgt	tgc	ccagg	900
cacggcttga	ccccccagca	ggtgtgg	atcgcc	ataat	ggtg	960
ctggagacgg	tccagcggt	gttgg	caggcgt	cccacgg	gacccgg	1020
caggtgggt	ccatcgcc	caatatt	ggcaag	cgctgg	aggc	1080
ctgttgcgg	tgctgtgc	ggccacgg	ttgaccc	agcagg	gttgc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcg	acgg	ggctt	gtgt	1200
cagggccacg	gtttgacccc	ggagcagg	gtgg	ccagcc	tggcg	1260
cagggcgtgg	agacggtca	cggtt	ccgg	ccat	ggcc	1320
ccccacgg	ttgtggccat	cgcc	ggcgtt	ggcagg	ccgg	1380
cagggcgtgt	tgccgggt	gtgc	cagg	gttgc	ggat	1440
atcgccagcc	acgtatggcg	caagcagg	ctgg	ccat	gggt	1500
ctgtgccc	cccacgg	gaccc	cagg	gttgc	ccat	1560
ggcaagcg	cgctggagac	ggtcc	cgg	tgc	ggcc	1620
ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatgc	agcaataat	gtgg	caag	1680
acgggtcc	ggctgttgc	ggtgt	caggccc	gctt	ggagcagg	1740

gtggccatcg ccagccacga tggcggcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgtt 1800
 ccgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc ccccagcagg tggtgccat cgccagcaat 1860
 ggcggggca agcaggcgct ggagacggc cagcggtgt tgccgtgt gtgcaggcc 1920
 cacggcttga ccccccagca ggtggggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 1980
 ctggagacgg tccagcggt gttccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccttcag 2040
 caggtgtgg ccatcgccag caatggccgc ggcaggccgg cgctggagag cattgttgc 2100
 cagttatctc gcctgtatcc ggcgtggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcctt 2160
 gcctgcctcg gccccggcgtcc tgccgtggat gcagtaaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
 agccgttccc agctggtaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
 ctgaagtaacg tgcccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccggaa cagcaccagg 2340
 gaccgtatcc tggagatgaa ggtgtatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
 aagcacctgg gcccgtccac gaagccgcac ggcgcctatc acaccgtggg ctccccatc 2460
 gactacggcg tcatcggttga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gccccatcg 2520
 caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccagaacaa gcacatcaac 2580
 cccaaacgagt ggtggaaagggt gtaccctcc acgcgtgaccg agttcaagtt cctgttctg 2640
 tccggccact tcaaggccaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
 tgcaacggcg ccgtgtgtc cgtggaggag ctccctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
 ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcg 2820
 gccgactgtaa 2832

<210> 55

<211> 2814

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN CD52_T02-L

<400> 55

atggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggc atcgattacc catacgatgt tccagattac 60
 gctatcgata tcgcccgtatct acgcacgctc ggctacaggc agcagcaaca ggagaagatc 120
 aaaccgaagg ttcgttcgac agtggcgacg caccacagg cactggcgcc acacgggtt 180
 acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa caccggcag cgtagggac cgtcgcgtc 240
 aagtatcagg acatgatcgcc agcgttgccca gaggcgacac acgaagcgat cgttggcg 300
 ggc当地acgt ggtccggcgcc acgcgtctgc gaggccttgc tcacgggtgc gggagatgt 360
 agaggtccac cggttacagg ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcg 420
 gtgaccgcag tggaggcagt gcatcgatgg cgcaatcgac tgacgggtgc cccgctcaac 480
 ttgacccccc agcagggtgt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggccgtggag 540
 acgggtccacg ggctgttgc ggtgtgtgc caggcccacg gcttacccc ggagcagggt 600
 gtggccatcg ccagccacga tggccgcaag caggcgctgg agacggtcca gcggctgtt 660
 cccggctgtgt gccaggccca cggcttgacc cggagcagg tggtgccat gcggcagccac 720
 gatggccgca agcaggcgct ggagacggc cagcggtgt tgccgtgt gtgcggcc 780
 cacggcttga ccccccagca ggtggggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg 840
 ctggagacgg tccagcggt gttccgggt ctgtgccagg cccacggctt gacccggag 900
 cagggtgtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg cgctggagac ggtccagccg 960
 ctgttgcggg tgctgtgc gcccacggc ttgacccccc agcagggtgt ggccatcgcc 1020
 agccacgtg gggcaagca ggegtggag acgggtccacg ggctgttgc ggtgtgtgc 1080
 caggccccacg gtttacccc ccacgagggt gtggccatcg ccacaaatgg cgggtggcaag 1140
 caggcgctgg agacggtcca gggctgttg cgggtgtgt gccaggccca cggcttgacc 1200
 cccggagcagg tggtgccat cggccacgat attgtggca agcaggcgct ggagacgggt 1260
 caggcgctgt tgccgtgtgt gtcggccaggc cacggcttgc cccggagca ggtggggcc 1320
 atcgccacggc acgtggccgg caacggcgct ggagacgg tccagcggt gttccgggt 1380
 ctgtgccagg cccacggcgtt gaccccccag cagggtgtgg ccatcgccag caatggcggt 1440
 ggcaaggcagg cgctggagac ggtccacggc ctgttgcgg tgctgtgc gcccacggc 1500
 ttgacccccc agcagggtgt ggccatcgcc agccacgtg gggcaagca ggccgtggag 1560
 acgggtccacg ggctgttgc ggtgtgtgc caggcccacg gtttacccc ggagcagggt 1620
 gtggccatcg ccacaaatgg tggtgccag caggcgctgg agacgggtca ggccgtgtt 1680
 cccggctgtgt gccaggccca cggcttgacc cggagcagg tggtgccat gcggcagccac 1740
 gatggccgca agcaggcgct ggagacggc cagcggtgt tgccgtgt gtgcggcc 1800
 cacggcttga cccggagca ggtggggcc atcgccacggc acgtggccgg caagcaggcg 1860
 ctggagacgg tecagcggt gttccgggt ctgtgccagg cccacggcgtt gacccggag 1920

caggtggtgg	ccatcgccag	caatatttgtt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1980
ctgttgcgg	tgctgtgc	ca	ggcccacggc	ttgacccttc	agcaggttgtt	2040
agcaatggcg	gcccggcaggcc	ggcgctggag	agcattgtt	cccagttatc	tcgcctgtat	2100
ccggcggtgg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgc	tggctgcct	cgccggcg	2160
cctgcgttgttgg	atgcagtgaa	aaaggattt	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctgtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcggccgg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aagggtatgg	agttcttcat	gaagggtgtac	gctacagg	gcaagcacct	ggccggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
qacaccaagg	cctactcccg	cggctacaac	ctgcccatacq	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaa	2580
gtgtaccctt	ccagcgtgac	cgagttcaag	tccctgttc	tgtccggcca	cttcaaggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cggcgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgtat	cggcgccgag	atgatcaagg	ccggcaccc	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacgcccag	atcaacttcg	cggccgactg	ataaa	2814

<210> 56

<211> 2832

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN CD52_T02-R

10 <400> 56

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgataagg	agacccggc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgatctac	gcacgctgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	ttcgacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgc	atcggtcg	taagccaaca	ccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgca	cggtgc	ggcgcacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tccggcgcac	g	ggccttgc	360
acgggtggcgg	gagagttag	aggtccacc	ttacagttt	acacaggca	acttctca	420
attgc	aaaac	gtggcggcgt	gaccgc	gaggcagtgc	atgc	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gaccccccag	cagg	ttgg	caatggc	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgc	cc	ggcccacggc	600
ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcg	agcaataat	gtggc	ggcgtggag	660
acgg	ccccc	ggctgttgc	ggtgtgtc	caggcccac	g	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggca	caggcgttgg	ccatcgcc	ggggctgtt	780
ccgg	gtgt	gca	ccggcgtt	cccagcagg	ttggcgtt	840
ggcgg	ggca	agcagggcgt	ggagacggc	caggcgtt	cccccagca	900
cacgg	ttga	cccccggagca	ggtgg	ccatcg	gtggcaggcc	960
ctgg	gac	ggctcggt	gttgc	ccacgg	caagcaggc	1020
cagg	gtgt	ccatcgcc	caatggc	ggcaagcagg	ggccatcg	1080
ctgt	ggcc	ggccacggc	ttgac	ggcgttgc	ggccatogcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcg	acgg	ggctgttgc	gtgtgt	1200
caggcccacg	gttt	ggagcagg	gtggc	ccagcaat	tggcggaa	1260
caggcgttgg	agacgg	ggcg	ttgg	ccgg	ccggcgtt	1320
ccgg	ggcc	ggcg	ccgg	gttgc	ggagacggc	1380
cagg	gtgt	ccgg	ccgg	ccgg	gtggcggcc	1440
atcgcc	acgatggc	caagcagg	ctgg	ccgg	gttgcgg	1500
ctgt	ggcc	ccacgg	gac	ccgg	gttgcgg	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgt	gttgc	ggcccacggc	1620
ttgacccccc	agcaggtgg	ggccatcg	agcaataat	gtggc	ggcgtggag	1680
acgg	ttgt	gtgtgtc	cagg	ccgg	ccagcagg	1740
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgg	gtgtgt	ccgg	ggggctgtt	1800
ccgg	gtgtgt	ccgg	ccgg	ccgg	ccggcgtt	1860
atgg	ggca	agcaggcgt	ggagacgg	cagg	gtggcaggcc	1920
cacgg	ttga	cccccggagca	ggtgg	ccgg	caagcaggc	1980
ctgg	gac	ggcg	gttgc	ccgg	ccggcgtt	2040
cagg	ggcc	ccatcgcc	caatggc	ggcagg	gttgcgg	2100
cagt	atctc	ggccatcg	ggcg	ccgg	ccggcgtt	2160

5	gcctgcctcg gccccgcgtcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccgaa cagcaccagg gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc aagcacctgg gcccgtccag gaagccgcac ggcgcctactt acaccgtggg ctccccatc gactacggcg tgatcgatggc caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gccccatcgcc caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccagaacaa gcacatcaac cccaaacgagt ggtggaaagggt gtaccctcc agcgtgaccc agttcaagtt cctgttcgtg tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctccgtatcg gcccgcgagat gatcaaggcc ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgag gccgactgat aa	2220 2280 2340 2400 2460 2520 2580 2640 2700 2760 2820 2832
10	<210> 57 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> TRAC_T02	
20	<400> 57 ttttagaaagt tcctgtatg tcaagctggc cgagaaaagc tttgaaaca	49
25	<210> 58 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> TRAC_T03	
35	<400> 58 tccagtgaca agtctgtatg cctattcacc gattttgatt ctcaaacaa	49
40	<210> 59 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> TRAC_T04	
50	<400> 59 tatatcacag acaaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaaga <210> 60 <211> 49 <212> ADN <213> Secuencia artificial	49

5	<220> 61	
	ttcctcttcc tcctaccacc atcagcctcc tttacctgta ccataac	47
10	<210> 62	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> CD52_T04	
	<400> 62	
	ttcctcctac tcaccacagc ctccctggct tacctgtacc ata	43
20	<210> 63	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> CD52_T05	
	<400> 63	
	tcctactcac catcagctcc tggttatttg ctcttacctg tac	43
30	<210> 64	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> CD52_T06	
	<400> 64	
	ttatccact tctcctctac agatacaaac tttttgtcct gagagtc	47
40	<210> 65	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> CD52_T07	
	<400> 65	
	tggactctca ggacaaacga caccagccaa atgctgaggg gctgctg	47
50	<210> 66	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador directo CD52	
60	<220>	
	<221> misc_feature	

<222> (31)..(40)
 <223> n es a o c o t o g

5 <400> 66
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn cagatctgca gaaaggaagc 60

<210> 67
 <211> 61
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo TRAC

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n es a o c o t o g

20 <400> 67
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn atcactggca tctggactcc 60
 a 61

<210> 68
 <211> 62

25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo TRBC1

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n es a o c o t o g

35 <400> 68
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn agagcccccta ccagaaccag 60
 ac 62

<210> 69
 <211> 62

40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo TRBC2

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n es a o c o t o g

<400> 69
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ggacctagta acataattgt 60
 gc 62

55 <210> 70
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>		
<223> Cebador inverso GR CD52		
5	<400> 70	
	cctatccct gtgtgccttg gcagtcctag cctgttggag tccatctgtct g	51
10	<210> 71	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador inverso GR TRAC	
20	<400> 71	
	cctatccct gtgtgccttg gcagtcctag cctcatgtct agcacagttt	50
	<210> 72	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador inverso GR TRBC1-2	
30	<400> 72	
	cctatccct gtgtgccttg gcagtcctag accagctcag ctccacgtgg t	51
	<210> 73	
	<211> 495	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> CAR anti-CD19	
	<400> 73	

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile
 20 25 30

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
 35 40 45

Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly
 50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr
 65 70 75 80

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met
 145 150 155 160

Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser
 165 170 175

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr
 180 185 190

Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
 195 200 205

Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 210 215 220

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu
 225 230 235 240

ES 2 828 669 T3

Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro
245 250 255

Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro
260 265 270

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
275 280 285

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
290 295 300

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
305 310 315 320

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
325 330 335

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
340 345 350

Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
355 360 365

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu Arg
370 375 380

Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
385 390 395 400

Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
405 410 415

Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro
420 425 430

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
435 440 445

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
450 455 460

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

Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490 495

<210> 74
<211> 49

5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> CTLA4_T01
 <400> 74
 tgccctgca ctctcctgtt ttttcttctc ttcatccctg tcttctgca 49

10 <210> 75
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> CTLA4_T03
 <400> 75
 ttttccatgc tagcaatgca cgtggcccaag cctgctgtgg tactggcca 49

20 <210> 76
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> CTLA4_T04
 <400> 76
 tccatgttag caatgcacgt ggcccaagcct gctgtggtagc tggccagca 49

30 <210> 77
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> PDCD1_T01
 <400> 77
 ttctccccag ccctgcttagt ggtgaccgaa ggggacaacg ccacccatca 49

40 <210> 78
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> PDCD1_T03
 <400> 78
 tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaaga tcaaagaga 49

50 <210> 79
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Repetición CTLA4_T01-L
 <400> 79

ES 2 828 669 T3

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

ES 2 828 669 T3

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

ES 2 828 669 T3

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 80

<211> 530

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición CTLA4_T01-R

10

<400> 80

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
65 70 75 80

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

ES 2 828 669 T3

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

ES 2 828 669 T3

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 81
<211> 530
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Repetición CTLA4_T03-L
10 <400> 81

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

ES 2 828 669 T3

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

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

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
 305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 450 455 460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu

530

5 <210> 82
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Repetición CTLA4_T03-R
 <400> 82

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 130 135 140

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 195 200 205

ES 2 828 669 T3

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

450

455

460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 83

<211> 530

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición CTLA4_T04-L

10

<400> 83

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

ES 2 828 669 T3

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

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

ES 2 828 669 T3

370

375

380

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 84

<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición CTLA4_T04-R

10

<400> 84

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

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

Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
 165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

ES 2 828 669 T3

290

295

300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 85
<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Repetición PDCD1_T01-L

<400> 85

Leu	Thr	Pro	Gln	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	Asn	Gly	Gly	Gly	Lys
1					5				10					15	

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

His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly
					35			40				45			

Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys
					50			55				60			

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

Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	
					85			90				95			

Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala
						100			105				110		

Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu
					115			120				125			

Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala
					130			135				140			

Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg
145							150			155			160		

Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val
						165			170			175			

Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val
						180			185			190			

Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu
							195			200			205		

Gln	Val	Val	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 828 669 T3

210

215

220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
340 345 350

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
 530

<210> 86

<211> 529

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición PDCD1_T01-R

10

<400> 86

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys
 50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 65 70 75 80

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val
 85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

ES 2 828 669 T3

130	135	140
Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg		
145	150	155
160		
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val		
165	170	175
180		
Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val		
185	190	
195		
Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln		
200	205	
210		
Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu		
215	220	
225		
Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr		
230	235	240
245		
Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala		
250	255	
260		
Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly		
265	270	
275		
Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln		
280	285	
290		
Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His		
295	300	
305		
Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly		
310	315	320
325		
Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln		
330	335	
340		
Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly		
345	350	
355		
Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu		
360	365	
370		
Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser		
375	380	

Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro
 385 390 395 400

Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile
 405 410 415

Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu
 420 425 430

Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val
 435 440 445

Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln
 450 455 460

Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln
 465 470 475 480

Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr
 485 490 495

Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro
 500 505 510

Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala Leu
 515 520 525

Glu

<210> 87
 <211> 530
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Repetición PDCD1_T03-L

10 <400> 87

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
 1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
 35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

ES 2 828 669 T3

50

55

60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
 100 105 110

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
 130 135 140

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
 165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
 195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 210 215 220

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
 225 230 235 240

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala
 245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
 260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
 290 295 300

ES 2 828 669 T3

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 88

<211> 529

<212> PRT

ES 2 828 669 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición PDCD1_T03-R

5

<400> 88

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
1 5 10 15

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

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly
35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
50 55 60

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
65 70 75 80

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

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
100 105 110

Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
115 120 125

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

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val
165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln
195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
210 215 220

ES 2 828 669 T3

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr
225 230 235 240

Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala
245 250 255

Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly
260 265 270

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala
290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
340 345 350

Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala
370 375 380

Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu
420 425 430

Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val
435 440 445

Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln
450 455 460

Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln
465 470 475 480

Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr
 485 490 495

Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro
 500 505 510

Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Arg Pro Ala Leu
 515 520 525

Glu

<210> 89

<211> 2814

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN CTLA4_T01-L

10

<400> 89

atggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgcccgtct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggtcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	caccggcag	cgttagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgt	cgttggcgtc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgtctg	gaggccttgc	tcacggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcgcc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggttccagc	ggctgttgc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggtg	600
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgttg	660
ccgggtctgt	gccaggcccc	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtgccat	cgccagccac	720
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtgcc	atcgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggt	gttggccgt	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccggag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	gttccagccg	960
ctgtggccgg	tgctgtgcca	ggccacggc	ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggttccagc	ggctgttgc	gtgtgtgtgc	1080
caggcccacg	gtttgacccc	ccagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tggtgcaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgtt	ccgggtctgt	gccaggccca	cggttggacc	1200
ccggagcagg	tggtgccat	cgccagccac	gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggc	1260
cagcggtctgt	tcccggtgt	gtgcccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtgtggcc	1320
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttggccgtg	1380
ctgtggccagg	cccacggctt	gacccggag	caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgtatggc	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgtggccgg	tgctgtgcca	ggccacggc	1500
ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggttccagc	ggctgttgc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	1620
gtggccatcg	ccagccacga	tggcgcaag	cagggctgg	agacggtcca	gcccgtgttg	1680
ccgggtctgt	gccaggcccc	cggttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	1740
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggc	cagggctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtgcc	atcgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggt	gttggccgt	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccggag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	gttccagccg	1980
ctgtggccgg	tgctgtgcca	ggccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gccccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2100	

ccggcggttgg ccgcgttgcac caacgaccac ctgcgtgcct tggcctgcct cggcggcg 2160
 cctgcgttgg atgcagtgaa aaaggaggattt ggggatcttca tcagccgttc ccagctgg 2220
 aagtccgagc tggaggagaa gaaatccgag ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac 2280
 gagtacatcg agctgatcgat gatcgcccg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg 2340
 aaggtatgg agttttcatgaa aggtgtac ggctacagg gcaagcacct gggcggtcc 2400
 aggaagcccg accggcgccat ctacacccgtg ggctcccca tcgactacgg cgtgatcg 2460
 gacaccaagg ctactccgg cggctacaac ctgcctacg gccaggccga cgaaatgc 2520
 aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacga gtggtgg 2580
 gtgtacccct ccagcgttgcac cgagttcaag ttctgttgc tgccggcca cttaagg 2640
 aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcg 2700
 tccgtggagg agtcctgtat cggcggcgag atgatcaagg ccggcacct gaccctgg 2760
 gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa 2814

<210> 90

<211> 2832

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN CTLA4_T01-R

10 <400> 90

atgggcgatc ctaaaaagaa acgttaaggatc atcgataaagg agacccggc tgccaaatgc 60
 gagagacacgc acatggacacg catcgatatac gccgatctac gcacgctgg ctacagcc 120
 cagcaacagg agaagatcaa accgaagggtt cttcgacacg tggcgcagca ccacgagg 180
 ctggcggcc acgggtttac acacgcgcac atcggtgcgt taagccaaca cccggcag 240
 ttagggaccg tgcgtgtcaa gtatcaggac atgatcgacg cttgcaga ggcacacac 300
 gaagcgatcg ttggcgttgg caaacagtgg tccggcgcac ggcgtctgg ggccttgc 360
 acgggtggcg gagagtttag aggttccaccg ttacagttgg acacaggca acttctca 420
 attgcaaaac gtggcggcgt gaccgcgtg gaggcagtgc atgcatggcg caatgc 480
 acgggtgccc cgctcaactt gaccccccacg caggtggtgg ccacgcacg caataatgt 540
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgcgg tgctgtgcca gcccacggc 600
 ttgaccccg agcagggtgg ggcattcgcc agccacgtg gcccgaagca ggctgg 660
 acgggtccagg ggctgttgc ggtctgtgc caggcccacg gcttgcaccc ggagcagg 720
 gtggccatcg ccagcaatat tggcggcaag caggcgttgg agacgggtca ggcgtgtt 780
 cgggtgtgt gccaggccccca cggcttgacc cccacggcagg tggcggccat gcccacg 840
 aatggtggca agcaggcgct ggagacggc cagggctgt tgccgggtct gtgcagg 900
 cacggcttga cccggagca ggtggggcc atcgccagca atattgg 960
 ctggagacgg tgcaggcgct gttccggcgt ctgtgcagg cccacggctt gacccgg 1020
 caggtggtgg ccacgcacg caatattggt ggcaagcagg cgctggagac ggtcagg 1080
 ctgttgcgg tgcgtgtccca ggcacccggc ttgacccccc agcagggtgg ggcattcg 1140
 agcaataatg gtggcaagca ggcgtggag acgggtccacg ggctgttgc ggtctgt 1200
 caggccccacg gcttgcggc ggagcagggtg tgccggatcg ccacgcacg atttgg 1260
 caggcgctgg agacgggtca ggcgtgttgc cgggtgtgt gccaggccccca ggcgttgc 1320
 cggagcagg tggcggccat cgccacgcac gatggcggca agcaggcgct ggagacgg 1380
 cagcggtgt tgccgggtct gtgcaggcc cccggcttgc cccggagca ggtggggcc 1440
 atcgccacgca atattggcgg caagcaggcg ctggagacgg tgcaggcgtt gttgcgg 1500
 ctgtgcagg cccacggctt gaccccccacg caggtggtgg ccacgcacg caataatgt 1560
 ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctgttgcgg tgctgtgcca ggcacccggc 1620
 ttgacccccc acgggtggat ggcattcgcc agcaataatg gtggcaagca ggcgtgg 1680
 acgggtccacg ggctgttgc ggtctgtgc cccggccacg gcttgcaccc ccacgcagg 1740
 gtggccatcg ccacgcacg tggcggcaag caggcgttgg agacgggtca gggctgtt 1800
 cgggtgtgt gccaggccccca cggcttgacc cccggagcagg tggcggccat gcccacg 1860
 atttggtggca agcaggcgct ggagacgggtg caggcgttgc tgccgggtct gtgcagg 1920
 cacggcttga cccggccacg ggtggggcc atcgccacgca atggcggtgg caagcagg 1980
 ctggagacgg tccaggcgct gttccggcgt ctgtgcagg cccacggctt gacccctc 2040
 caggtggtgg ccacgcacg caatggcggc ggcaggcccccg cgctggagag cattgttgc 2100
 cagttatctc gccctgtatcc ggcgttggcc gctgttgcacca acgaccacct cgtccctt 2160
 gctgtgtcg gggggcgctt tgcgttggat gcaatggaaaa agggattggg ggatccat 2220
 acgggttccc agctgggtgaa gtccggagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcaca 2280
 ctgaagtacg tgccccacgca gtacatcgag ctgatcgaga tcgccccggaa cagcacc 2340

gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcccgtccag	gaagccgac	ggcccatct	acaccgtggg	ctcccccattc	2460
gactaoggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gccccatcgcc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccagaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggttggaaagg	gtaccctcc	agcgtgaccc	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctccgtatcg	gccccgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgct	2820
gccgactgat	aa					2832

<210> 91

<211> 2814

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN CTLA4_T03-L

10

<400> 91

atggggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgcccgtct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggtcgac	agtggcgac	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcc	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgctc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgtctg	gaggccttgc	tcacgggtgc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcata	acgtggcgcc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgcaccc	ccagcagggt	600
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gccccgttgc	660
ccgggtctgt	gcccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtgccat	ccggcgtcaat	720
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggtgt	tggcggtgt	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtgtggcc	atcgccagcc	acgtggcg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggt	ctgtgcccagg	cccacggctt	gaccccgag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggccaggccgg	960
ctgttgcgg	tgtgtgtcc	ggcccacggc	ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	1020
agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	acgggtgcagg	cgctgttgc	gggtgtgtgc	1080
caggcccacg	gtttgacccc	ccagcagggt	gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	1140
cagggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgtt	ccgggtctgt	gccaggccca	ccgcttgacc	1200
ccccagcagg	tgtgtggccat	cgccagcaat	aatggtgcc	agcaggcgct	ggagacggc	1260
cagcggtgt	tggcggtgt	gtgcaaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtgtggcc	1320
atcgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggt	1380
ctgtgcccagg	ccacaggctt	gaccccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	aatggcggt	1440
ggcaagcagg	cgttggagac	ggtccagcg	ctgttgcgg	tgtgtgtcc	ggccacggc	1500
ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acgggtgcagg	cgttgcgtcc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgcaccc	ccagcagggt	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtgccaa	caggcgctgg	agacggtcca	gccccgttgc	1680
ccgggtctgt	gcccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtgccat	ccggcggccac	1740
gatggccggca	agcaggcgct	ggagacggc	cagcggtgt	tggcggtgt	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtgtggcc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgcgggt	ctgtgcccagg	cccacggctt	gaccccgag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	caatattgtt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1980
ctgttgcgg	tgtgtgtcc	ggcccaacggc	ttgacccctc	agcagggtgt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	ggggcaggcc	ggegetggag	agcattgttg	cccaattatc	tcgeccctgtat	2100
ccggcggtgg	cccgcttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggctgcct	ggcggggggt	2160
cctgcgttgg	atgcagtgaa	aaagggttt	ggggatcc	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccggac	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cggtccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcg	gatcgccccg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgtatgg	agttcttcat	gaagggtgtac	ggctacaggg	qcaagcacct	gggcggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgt	ggctccccc	tcgactacgg	cgtgtatcg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggttacaac	ctgcccattcg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520

aggtaacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgttacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaaggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agtcctgtat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagtcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814

<210> 92

<211> 2832

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN CTLA4_T03-R

10

<400> 92

atggcgatc	ctaaaaagaa	acgttaaggc	atcgataagg	agaccggcgc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gccgatctac	gcacgctcg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgttcgacag	tggcgagca	ccacgaggca	180
ctggcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtcggt	taagccaaca	ccggcgacgc	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctgg	caaacagtgg	tccggcgac	gcccgtctgg	ggccttgctc	360
acggtgccgg	gagagtttag	aggtccaccg	ttacagtgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgccgt	gaccgcgtg	gaggcagtgc	atgatcgacg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gaccccccag	cagggtgtgg	ccatcgccag	caataatgg	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcg	ctgttgcogg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgacccccc	agcaggtgtt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgcgtgtc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcagggt	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgtt	780
cgggtctgt	gccaggecca	cggttgcacc	ccggagcagg	tggggccat	cgccagccac	840
gatggcgca	agcagggcgt	ggagacggtc	caggcgctgt	tgccgggtct	gtgccaggcc	900
cacgcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	atcgccagca	atattgtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tgcaggcgt	gttgcgggt	ctgtgcagg	cccacggctt	gaccccccag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	caataatgg	ggcaagcagg	cgctggagac	gttccagcgg	1080
ctgttgcgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccccc	agcaggtgtt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccacg	ggtgttgc	gttgctgtc	1200
cagggccacg	gtttgacccc	ggagcagggt	gtggccatcg	ccagcaatat	tggggcaag	1260
caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgtt	ccgggtctgt	gcaaggccca	cggttgcacc	1320
ccggagcagg	tggggccat	cgccagccac	gtggcgca	agcagggcgt	ggagacggtc	1380
cagggctgt	tgccgggtct	gtggcaggcc	caggcgcttg	ccccggagca	ggtggggcc	1440
atcgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagggct	tttgcgggt	1500
ctgttgcagg	cccaacggctt	gaccccgag	cagggtgtgg	ccatcgccag	caatattgtt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	ctgttgcgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgaccccg	agcaggtgtt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcccgttgc	ggogctggag	1680
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgcgtgtc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcagggt	1740
gtggccatcg	ccagcaatat	tggggcaag	caggcgctgg	agacggtgca	ggogctgtt	1800
cgggtctgt	gccaggecca	cggttgcacc	ccccagcagg	tggggccat	cgccagcaat	1860
aatgggtggca	agcaggcgt	ggagacggtc	caggcgctgt	tgccgggtct	gtgccaggcc	1920
cacgcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	atcgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagggct	gttgcgggt	ctgttgcagg	cccaacggctt	gacccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcgcc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcggtggcc	gctgttgcacc	accgaccacct	cgtcgcctt	2160
gcctgcctcg	gccccggctcc	tgcgttggat	gcagtaaaa	aggattggg	ggatccatc	2220
agccgttccc	agctggtcaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tgcggccggaa	cagcacccag	2340
gaccgttatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacagggc	2400
aagcacctgg	gccccggctcc	gaagcccgcac	ggcgcctatc	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcggtga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gccccatcgcc	2520
caggccgacg	aatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccc	agttcaagtt	cctgttcgt	2640
tccggccact	tcaaggccaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcacaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcccgcagat	gatcaaggcc	2760

	ggcacccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgag	2820
	gccgactgat aa	2832
	<210> 93	
5	<211> 2814	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> TALEN CTLA4_T04-L	
	<400> 93	
	atggggcata ctaaaaagaaa acgtaaggta atcgattacc catacgatgt tccagattac	60
	gctatcgata tcgcccgtat acgcacgctc ggctacagcc agcagcaaca ggagaagatc	120
	aaaccgaagg ttctgtcgac agtggcgacg caccacgagg cactggcgcc ccacgggttt	180
	acacacgcgc acatcggtgc gttaagccaa caccggcagc cgtagggac cgtcgctgtc	240
	aagtatcagg acatgatcg agcgtgcca gagggcagac acgaagcgat cgttggcgtc	300
	ggcaaacagt ggtccggcgc acgcgtctg gaggccttgc tcacgggtgc gggagagttg	360
	agaggtccac cgttacagtt ggacacaggc caacttctca agattgcaaa acgtggcgcc	420
	gtgaccgcag tggaggcagt gcatgcatgg cgcaatgcac tgacgggtgc cccgctcaac	480
	ttgaccggcgg agcagggtgtt ggcacatcgcc agccacgatg gcccgaagca ggctgtggag	540
	acggtcacgc ggctgttgcc ggtgtgtgc caggccccacg gcttgacccc ggagcagggtg	600
	gtggccatcg ccagccacga tggcgcaag caggcgctgg agacggtcca gcccgtgttg	660
	ccgggtctgt gccaggcccc cggctgtacc cccggacagg tggtgccat cgccagcaat	720
	attggtgca agcaggcgat ggagacgggtg caggcgctgt tgccgggtgt gtgccaggcc	780
	cacggcttga ccccccagca ggtgtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg	840
	ctggagacgg tccagcggtc gttgcgggtg ctgtgcccagg cccacggctt gaccccccag	900
	caggtggtgg ccatcgccag caataatggt ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	960
	ctgttgcggg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccggcgg agcagggtgt ggccatcgcc	1020
	agccacatcg gcccgaagca ggctgtggag acgggtccacg ggctgttgcc ggtgtgtgc	1080
	caggccccacg gcttgacccc ccagcagggtg gtggccatcg ccagcaatgg cggtggcaag	1140
	caggcgctgg agacggtcca gcccgtgttgc cccggctgtgt gccaggcccc cggcttgacc	1200
	ccggagcagg tggtgccat cggccagcaat attggtgca agcaggcgat ggagacgggtg	1260
	caggcgctgt tgccgggtgt gtgcaggcc cccggcttga ccccccagca ggtgtggcc	1320
	atcgccagca ataatggtgg caagoaggcg ctggagacgg tccagcggtc gttgcgggtg	1380
	ctgtgcccagg cccacggctt gacccggcgg caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc	1440
	ggcaaggcagg cgttggagac ggtcaagcgg ctgttgcgg tgctgtgcca ggcccacggc	1500
	ttgaccggcgg agcagggtgtt ggcacatcgcc agcaatattt gtggcaagca ggctgtggag	1560
	acgggtccagg cgttggatcg ggtgtgtgc caggccccacg gcttgacccc ggagcagggtg	1620
	gtggccatcg ccagcaatatt tggtggcaag caggcgctgg agacgggtca ggctgtgtt	1680
	ccgggtctgt gccaggcccc cggctgtacc cccaggcagg tggtgccat cgccagcaat	1740
	ggcggtggca agcaggcgat ggagacggtc caggcgctgt tgccgggtgt gtgcaggcc	1800
	cacggcttga ccccccagca ggtgtggcc atcgccagca ataatggtgg caagcaggcg	1860
	ctggagacgg tccagcggtc gttgcgggtg ctgtgcccagg cccacggctt gacccggag	1920
	caggtggtgg ccatcgccag ccacgtatggc ggcaaggcagg cgctggagac ggtccagcgg	1980
	ctgttgcggg tgctgtgcca ggcccacggc ttgaccggc ttgaccggc acgagggtgtt ggcacatcgcc	2040
	agcaatggcg gggcaggcgg ggcgttggag acgttggatcg cccaggatcg tgcggctgtat	2100
	ccggcggtgg ccgcgttgc acacgaccac ctcgtcgcc tggcctgcct cggcgccgt	2160
	cctgcgttgc atgcagtgtaa aaaggattt gggatccata tcagccgttcc ccaagctgttgc	2220
	aagtccgagg tggaggagaa gaaatcccgat ttgaggcaca agctgaagta cgtccccac	2280
	gagtagatcg agtgcgtatcg gatcgccccgg aacagcaccc aggaccgtat cctggagatg	2340
	aaggtgtatgg agtttttcat gaaggtgtac ggctacaggg gcaagcacct gggcggtcc	2400
	aggaagcccc acggcgccat ctacaccgtt ggctccccca tcgactacgg cgtgatcg	2460
	gacaccaagg cctactccgg cggctacaac ctgcccacatcg gcccggcga cggaaatgcag	2520
	aggtacgtgg aggagaacca gaccaggaac aagcacatca accccaacgaa gtggtggag	2580
	gtgtacccct ccagcggtac cgagttcaag ttctgttgc tgccggcca cttcaaggcc	2640
	aactacaagg cccagctgac caggctgaac cacatcacca actgcaacgg cggcgctgt	2700
	tccgtggagg agtctctgtat cggcgccgag atgatcaagg ccggcaccct gaccctggag	2760
	gaggtgagga ggaagttcaa caacggcgag atcaacttcg cggccgactg ataa	2814

<210> 94
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> TALEN CTLA4_T04-R

<400> 94

10

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgataagg	agacccgcgc	tgccaagt	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgatctac	gcacgctcg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	ttcgacag	tggcgcagca	ccacgaggca	180
ctggctggcc	acgggttac	acacgcgcac	atcggtcg	taagccaaca	ccggcagcgc	240
tttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcg	cgttgcaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcg	caaacagtgg	tccggcgcac	gacgtctgg	ggccttgc	360
acggtgccgg	gagagttgag	aggtccacc	ttacagt	acacaggcca	acttctcaag	420
attgc	aaaac	gtggcggcg	gaccgcagt	gaggcagt	atgcatggc	480
acgggtgccc	cgctcaact	gacccccc	caagg	ttgg	caatgcact	540
ggcaaggcagg	cgctggagac	ggtcc	ccatcg	ccatcgcc	caataatgg	600
ttgacc	ccgg	ccatcg	agccac	gggg	ccagcagg	660
acggtc	ggctgt	gg	gagg	gac	gttgc	720
gtggccatcg	ccagcaat	gg	caagg	ttgg	ggcgttgc	780
ccgg	gtgt	ccatcg	ccac	ccat	ccatcg	840
aatgg	ggcc	atcg	agcc	ggca	ggcgtgg	900
cacgg	ccccc	ccatcg	ccatcg	gggg	ggcgtgg	960
ctggagacgg	tccagcgg	gttgcgg	ctgtgc	ccac	ggccgg	1020
cagg	gtgt	ccatcg	ccac	gg	ggccgg	1080
ctgt	ccgg	atcg	ggcc	ccat	ccatcg	1140
agcc	acat	ggcc	ccatcg	gg	ggccgt	1200
cagg	ccac	ggcc	ggcc	ccat	gg	1260
cagg	gtgt	ccatcg	ccatcg	gg	ggccgt	1320
cccc	ccgg	atcg	ggcc	gg	ggccgt	1380
cagg	gtgt	ccatcg	ccatcg	gg	ggccgt	1440
atcg	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	1500
ctgt	ccgg	atcg	ggcc	ccat	gg	1560
ggca	acat	ggcc	ggcc	ccat	gg	1620
ttgacc	ccgg	atcg	ggcc	ccat	gg	1680
acgg	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	1740
gtgg	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	1800
ccgg	gtgt	ccatcg	ccatcg	gg	ggccgt	1860
at	ggcc	atcg	ggcc	ccat	gg	1920
cacgg	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	1980
ctgg	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	2040
cagg	gtgt	ccatcg	ccatcg	gg	ggccgt	2100
cagg	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	2160
cgct	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	2220
agcc	gtgt	ccatcg	ccatcg	gg	ggccgt	2280
ctga	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	2340
gacc	gtgt	ccatcg	ccatcg	gg	ggccgt	2400
aagc	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	2460
gact	gtgt	ccatcg	ccatcg	gg	ggccgt	2520
cagg	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	2580
ccca	gtgt	ccatcg	ccatcg	gg	ggccgt	2640
tccgg	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	2700
tgca	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	2760
ggc	ccat	ggcc	ggcc	ccat	gg	2820
cccg	gtgt	ccatcg	ccatcg	gg	ggccgt	2832

<210> 95
 <211> 2814
 <212> ADN

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN PDCD1_T01-L

5

<400> 95

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgcccgc	atcgacgc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggtcgac	agtggcgc	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacaacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggac	cgtcgtgtc	240
aagtatcagg	acatgatcg	acgcgttgc	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcg	300
ggcaaaacagt	ggtccggcgc	acgcgtctg	gaggccttgc	tcacggtgc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggg	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcg	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtcacgc	ggctgttgcc	gtgtgtgtgc	caggcccacg	gcttgcaccc	ggagcagg	600
gtggcoatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgtt	660
ccgggtgtgt	gcccaggccc	cggttgc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	720
ggcggtggca	agcaggcg	ggagacggc	cagcggtgt	tgccgggtgc	gtccagg	780
cacggcttga	ccccggagca	gttgggtggc	atcgccagcc	acgatggcg	caagcagg	840
ctggagacgg	tcacgggt	gttgcgggt	ctgtgc	cccacgg	gacccggag	900
caggtggtgg	ccatcgcc	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	gtccagcg	960
ctgttgc	tgctgtgc	ggccacgg	ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcg	1020
agccacgat	goggcaagca	ggcgctgg	acggtcacgc	ggctgttg	gtgtgtgc	1080
caggcccacg	gttgcaccc	ggagcagg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	cggtgttgc	ccgggtgt	gcaaggccc	cggttgc	1200
ccggagcagg	tggtgccat	cgccagca	attggtg	agcaggcg	ggagacgg	1260
caggcgctgt	tgccgggtgc	gtgc	cacggcttga	ccccccagca	gttgggtgg	1320
atcgccagca	ataatggtgg	caagcagg	ctggagacgg	tccagcg	gttgcgg	1380
ctgtgc	ccacgg	gacccgg	caggtgg	ccatcgcc	ccacgatgg	1440
ggcaagcagg	cgctgg	ggtccagcg	ctgttgc	tgctgtgc	ggccacgg	1500
ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcg	agccacgat	gcccga	ggcgctgg	1560
acggtcacgc	ggctgtgc	gtgtgtgc	caggcccacg	gcttgcaccc	ggagcagg	1620
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgtgt	1680
ccgggtgtgt	gcccaggccc	cggttgc	ccccagcagg	tggtgccat	cgccagca	1740
ggcggtggca	agcaggcg	ggagacggc	cagcgctgt	tgccgg	gtccagg	1800
cacggcttga	ccccccagca	gttggtg	atcgccagca	ataatggtgg	caagcagg	1860
ctggagacgg	tcacgggt	gttgcgg	ctgtgc	cccacgg	gacccgg	1920
caggtggtgg	ccatcgcc	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctgg	gttccagcg	1980
ctgttgc	tgctgtgc	ggccacgg	ttgacccctc	agcagg	gcccacg	2040
agcaatggcg	goggcagg	ggcgctgg	agcattgttgc	cccgat	tcgcccgt	2100
ccggcg	ccgcgttgc	caacgacc	ctcg	tggctgc	cgccgg	2160
cctgcgttgc	atgcagt	aaaggatt	ggggatc	tcagccgt	ccagctgg	2220
aagtcc	ttggagg	gaaatcc	ttgagg	caca	agctga	2280
gagtacatcg	agctgatcg	gatcgcc	aacagc	aggacc	cctggag	2340
aagggtatgg	agttcttcat	gaagg	gtac	ggctac	ggcggt	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacacc	gttgc	ccat	cgatcg	2460
gacaccaagg	cctactc	cggttaca	ctgccc	atcg	cgaaatcg	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gacc	aggaa	aagcac	gtgg	2580
gtgtacccct	ccagcgt	cgagt	caag	ttcctgtt	tgtccgg	2640
aactacaagg	cccacgt	cagg	gtga	cacat	caac	2700
tccgtggagg	agtcct	cggttca	ac	actg	cccg	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacgg	gg	atcaact	tgg	2814

10

<210> 96

<211> 2829

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> TALEN PDCD1_T01-R

<400> 96

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgataagg	agaccgcgc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgatctac	gcaegctgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgttcgacag	tggcgacga	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccc	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacag	cggttgcaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctgg	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtccaccc	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcggcgt	gaccgcagt	gaggcagtgc	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgtcaactt	gaccggccag	caagtcgtcg	caatcgccag	caataacgga	540
gggaagcaag	ccctcgaaac	cgtcagcgg	ttgcttcctg	tgctctgcca	ggcccacggc	600
cttaccctg	acgagggtgt	ggccatcgca	agtaacattg	gaggaaagca	agccttggag	660
acagtgcagg	ccctgttgcc	cgtgtgtgc	caggcacacg	gcctcacacc	agagcaggc	720
gtggccattt	cctccaaacat	cggggggaaa	caggctctgg	agaccgtcca	ggccctgctg	780
cccgtcctct	gtcaagctca	cggcctgact	ccccaaacaag	tggtcgcac	cgccctctaatt	840
aacggcgaaa	agcaggcact	ggaaacagt	cagagactgc	tccctgtgt	ttgccaagct	900
catgggttga	ccccccaaca	ggtcgtcgct	attgcctcaa	acaacggggg	caagcaggcc	960
cttgagactg	tgcagaggct	gttgcagtg	ctgtgtcagg	ctcacgggct	cactccacaa	1020
caggtggctg	caattgccag	caacggcggc	ggaaagcaag	ctcttgcac	cgtcaacgc	1080
ctcctggcc	tgctctgtca	ggctcatggc	ctgacaccac	aacaagtgc	ggccatcgcc	1140
agtaataatg	gccccaaaaca	ggctttgag	accgtccaga	ggctgtctcc	agtgtctgc	1200
caggcacacg	ggctgacccc	ccagcagggt	gtggctatcg	ccagcaataa	tggggcaag	1260
cagggccctgg	aaacagtcac	gcccctgctg	ccagtgcattt	gccaggctca	cgggctcact	1320
cccgaacagg	tctgtggcaat	cgcccttcaac	ggaggggaaagc	aggctctgga	gaccgtgcag	1380
agactgtgc	ccgttctgt	ccaggcccc	ggactcacac	ctcagcagg	cgtcgccatt	1440
gcctctaaca	acgggggcaaa	acaagccctg	gagacagtgc	agcggctgtt	gactgtgtt	1500
tgccaaagccc	acggcttgac	tcctcaacaa	gtggtcgcac	tgcctctaaa	tggcgccgga	1560
aaacaagctc	tggagacagt	gcagagggt	ctgcccgtcc	tctgccaagc	ccacggcctg	1620
actcccaac	agtcgtcgc	cattgccagc	aacggcggag	gaaagcagge	tctcgaaact	1680
gtgcagcggc	tgcttcctgt	gctgtgtcag	gctcatggc	tgacccccc	gcaagtgg	1740
gctattgcct	ctaaacaatgg	aggcaagcaa	gcccctgaga	cagtccagag	gctgttgcca	1800
gtgctgtgcc	aggccccacgg	gctcacaccc	caggagggt	tcgcacatgc	cagtaacggc	1860
ggggggcaaaac	aggcattgga	aaccgtccag	cgccctgcttc	cagtgtctg	ccaggcacac	1920
ggactgacac	ccgaacacaggt	ggtgccatt	gcatcccatg	atggggcaaa	gcagggccctg	1980
gagaccgtgc	agagactcct	gccagtgtt	tgccaaagotc	acggcctcac	ccctcagcaa	2040
gtcgtggcca	tgcctctaaa	cggggggggc	cgccctgac	tggagagcat	tgttgcggag	2100
ttatctcgcc	ctgatccggc	gttggccgc	ttgaccaacg	accacctcgt	cgccctggcc	2160
tgcctcgcc	ggcgctctgc	gctggatgca	gtaaaaaaagg	gattggggga	tcctatcagc	2220
cgttccca	tgtgtaaagtc	cgagctggag	gagaagaaat	ccgagttgag	gcacaagctg	2280
aagtacgtgc	cccacacgat	catcgagct	atcgagatcg	cccgaaacag	cacccaggac	2340
cgtatctgg	agatgaaggt	gatggagttc	tcatgaagg	tgtacggcta	caggggcaag	2400
cacctggcc	gctccaggaa	gcccacggc	gccatctaca	ccgtgggctc	ccccatcgac	2460
tacggcgtga	tctgtggacac	caaggctac	tccggcggt	acaacctgac	catggccag	2520
gccgacaaaa	tgcagaggta	cgtggaggag	aaccagacca	ggaacaagca	catcaacccc	2580
aacgagtgg	ggaagggtgt	cccctccagc	gtgaccgagt	tcaagttct	gttcgtgtcc	2640
ggccacttca	aggcacta	caaggcccag	ctgaccagac	tgaaccacat	caccaactgc	2700
aacggcgccg	tctgtccgt	ggaggagctc	ctgatcgcc	gcaaccat	caaggccggc	2760
accctgaccc	tggaggaggt	gaggaggaag	ttcaacaacg	gcaagatcaa	cttcggggcc	2820
gactgataa						2829

5

<210> 97

<211> 2814

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> TALEN PDCD1_T03-L

<400> 97

15

atggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgcccgtatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggtcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggcg	ccacgggtt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	caccggcgag	cgtagggac	cgtcgtgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	acggttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcg	300
ggcaaacagt	gttccggcgc	acgcgtctg	gaggccttc	tcacggtg	ggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcg	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgaccggcg	acaggggtgt	ggccatcgcc	agcaatattt	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtgagg	cgtgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgcaccc	ggagcagg	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgttgc	660
ccgggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtgccat	cgccagccac	720
gatggcggtca	acagggcgct	ggagacggc	cagggcgctgt	tgcgggtgt	gtgccaggg	780
cacggcttga	ccccccagca	ggtggggcc	atcgccagca	atgggggtgg	caagcagg	840
ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggt	ctgtgc	cccacggctt	gaccccgag	900
cagggtgggg	ccatcgccag	ccacgatggc	gcgaaggagg	cgctggagac	gttccagcg	960
ctgttgcgg	tgtgtgc	ggccacggc	ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcg	1020
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccacg	ggtgttgc	gtgtgtgc	1080
caggcccacg	gcttgcaccc	ccagcagg	gtggccatcg	ccagcaataa	tggtgccag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	gcccgttgc	ccgggtgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccccagcagg	tggtgccat	cgccagcaat	gcccgtggca	agcaggcgct	ggagacggc	1260
cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgcaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtgggtgg	1320
atcgccagca	ataatggtgg	caagcagg	ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggt	1380
ctgtgc	ccacggctt	gacccccc	cagggtgg	ccatcgccag	caataatgg	1440
ggcaagcagg	cgttgagac	ggtccaggg	ctgttgc	tgcgtgc	ggcccacgg	1500
ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcg	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctgg	1560
acggtccacg	ggtgttgc	ggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgcaccc	ccagcagg	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtgcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcccgttgc	1680
ccgggtgtgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtgccat	cgccagccac	1740
gatggcggtca	acagggcgct	ggagacggc	cagggctgt	tgcgggtgt	gtgccagg	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggggcc	atcgccagcc	acgtggcg	caagcagg	1860
ctggagacgg	tccagcggt	gttgcgggt	ctgtgc	cccacggctt	gaccccgag	1920
cagggtgggg	ccatcgccag	caatattgt	ggcaagcagg	cgctggagac	gtgcagg	1980
ctgttgcgg	tgcgtgc	ggccacggc	ttgacccctc	agcagggtgt	ggccatcg	2040
agcaatggcg	gccccaggcc	ggcgctggag	agcattgtt	cccagttatc	tgcgcctgtat	2100
ccggcgttgg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctcg	tggctgtt	cgccggggt	2160
cctgcgttgg	atgcgtgaa	aaaggattt	ggggatctt	tcagccgtt	ccagctgt	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtccccac	2280
gagtacatcg	agctgtatcg	gatcgcccg	aacagcaccc	aggaccgtat	cctggagat	2340
aagggtatgg	agttcttcat	gaagggttac	gcttacagg	gcaagcacct	gggggggtcc	2400
aggaagcccc	acggcgccat	ctacaccgt	ggctccccca	tgcactacgg	cgtgtatgt	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggttacaaac	ctggccatcg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtgaaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagtcaag	ttctgttgc	tgcgggcca	tttcaagg	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatccacca	actgcaacgg	cgccgtgt	2700
tccgtggagg	agctcctgtat	cgccggcg	atgtcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcg	atcaacttcg	cggccgact	ataa	2814

<210> 98

<211> 2829

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN PDCD1_T03-R

10 <400> 98

atggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggc	atcgataagg	agaccggc	tgcgttgc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatac	gccgtatc	gcacgtcg	ctacaggcc	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagg	cggtcgac	tggcgac	ccacgagg	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgc	atcggtcg	taagcca	ccggcagcg	240

ttagggaccg	tcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatecgac	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctgg	caaacagtgg	tccggcgac	gcgcctgtgg	ggccttgc	360
acggtgtggcg	gagagtttag	aggtccaccg	ttacagtgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgccgt	gaccgcagt	gaggcagtgc	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gaccccccag	caagtcgtcg	caatgcacag	ccatgtatgg	540
gggaagcaag	ccctcgaaac	cgtgcagcgg	ttgttccctg	tgctctgcca	ggcccacggc	600
cttacccttc	agcagggtgg	ggccatcgca	agtaacggag	gaggaaagca	agccttggag	660
acagtgcage	gcctgttgc	cgtgtgtgc	caggcacac	gcctcacacc	agagcaggtc	720
gtggccattt	cctccatga	cggggggaaa	caggctctgg	agaccgtcca	gaggctgctg	780
cccgctctt	gtcaagctca	cggctgact	ccccaaacaag	tggtcggat	cgccctcta	840
ggcggcgaaa	agcaggcact	ggaaacagt	cagagactgc	tccctgtgt	ttgccaagct	900
catgggttga	ccccccaaca	ggtcgtcgct	attgcctca	acgggggggg	caagcaggcc	960
ctttagactg	tgcagaggct	ttggccagtg	ctgtgtcagg	ctcacgggt	cactccacaa	1020
caggtgtcg	caattgcccag	caacggcgcc	ggaaagcaag	cttttggaaac	cgtgcaacgc	1080
ctcctgcccc	tgtctgtca	ggctcatggc	ctgacaccac	aacaagtgt	ggccatcgcc	1140
agtaataatg	gggggaaaca	ggcttggag	accgtccaga	ggctgtccc	agtgtctgc	1200
caggcacac	ggctgacccc	cagcagggtg	ttggctatcg	ccagcaat	tggggcaag	1260
caggccctgg	aaacagtcca	ggccctgtgt	ccagtgttt	gccaggctca	cgggctcact	1320
ccccagcagg	tgttggcaat	cgcctccaac	ggcggaggg	agcaggctt	ggagacccgt	1380
cagagactgc	tgcctgtt	gtgccaggcc	cacggactca	cacctgaaca	gtcgtcgcc	1440
attgcctctc	acgatgggg	caaacaagcc	ctggagacag	tgcagcgct	tttgcctgt	1500
ttgtgccaag	cccacggctt	gactcctcaa	caagtggctg	ccatcgcc	aatggcgcc	1560
ggaaaacaag	ctctggagac	agtgcagagg	ttgctgccc	tcctctgcca	agcccacggc	1620
ctgactcccc	aacaggtcg	cgccattgca	agcaacaac	gaggaaagca	ggctctcgaa	1680
actgtgcac	ggctgtttcc	tgtgtgtgt	caggctcatg	ggctgacccc	cagcaagt	1740
gtggctattt	cctctaatgg	aggcaagcaa	gcccttgaga	cagtccagag	gtgtttgcca	1800
gtgctgtgcc	aggcccacgg	gtcacacac	cagcagggtt	tgcctatcg	cagtaacaac	1860
gggggcaaaac	aggcatttgg	aaccgtccag	cgccctgttc	cagtgtctg	ccaggcacac	1920
ggactgacac	cagaacaggt	ggtggccatt	gcateccatg	atggggca	gcaggccctg	1980
gagacgtgc	agagactctt	gccagtgtt	tgccaagctc	acggcctcac	ccctcagcaa	2040
gtcgtgcca	tgcctcaaa	cggggggggc	cgccctgcac	tggagagcat	tgttgccag	2100
ttatctcgcc	ctgatccggc	tttggcccg	ttgaccaac	accacctgt	cgcccttggcc	2160
tgcctcgcc	ggcgtcttgc	gttggatgca	gtaaaaaagg	gattgggg	tccttatcagc	2220
cgttcccagc	tgtgtaa	cgagctggag	gagaagaaat	ccgagtttag	gcacaagct	2280
aagtacgtgc	cccacagata	catcgagct	atcgagatcg	cccgaaac	cacccaggac	2340
cgtatctgg	agatgaaggt	gatggagttc	ttcatgaagg	tgtacggct	cagggcaag	2400
cacctggcg	gtccagggaa	gcccggacggc	gcacatcaca	ccgtgggtc	ccccatcgac	2460
tacggcgtga	tgttggacac	caaggcctac	tccgggggt	acaacctgc	categgccag	2520
gccgacgaaa	tgcagaggta	cgtggaggag	aaccagacca	ggaacaagca	catcaacccc	2580
aacgagtgtt	ggaaggtgt	ccccctccag	gtgaccggat	tcaatttct	gttctgttcc	2640
ggccacttca	aggcaacta	caaggcccag	ctgaccaggc	tgaaccacat	caccaactgc	2700
aacggcggcc	tgtgttccgt	ggaggagctc	ctgatcgcc	gctgatgtat	caaggccggc	2760
accctgaccc	tggaggaggt	gaggaggaag	ttcaacaac	gctgatcaa	tttcgccc	2820
gactgataa						2829

5 <210> 99
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Cebador directo CTLA4_T01

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n es a o c o t o g

 <400> 99
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ctctacttcc tgaagacctg 60

<210> 100

5 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador directo CTLA4_T03/T04
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n es a o c o t o g
 15 <400> 100
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn acagttgaga gatggagggg 60
 20 <210> 101
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo PDCD1_T01
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n es a o c o t o g
 30 <400> 101
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ccacagaggt aggtgccgc 59
 <210> 102
 <211> 60
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo PDCD1_T03
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n es a o c o t o g
 45 <400> 102
 ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn gacagagatg ccggcacca 60
 <210> 103
 <211> 50
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso CTLA4_T01
 55 <400> 103
 cctatccccgtgtgccttg gcagtctcag tggaatacag agccagccaa 50
 <210> 104
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador inverso CTLA4_T03/04
 <400> 104
 cctatccccct gtgtgccttg gcagtcctcag ggtgcccgtg cagatggaat 50
 5
 <210> 105
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador inverso PDCD1_T01
 <400> 105
 cctatccccct gtgtgccttg gcagtcctcag ggctatgcag tggaggccag 50
 15
 <210> 106
 <211> 50
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso PDCD1_T03
 25 <400> 106
 cctatccccct gtgtgccttg gcagtcctcag ggacaacgcc acttcacct 50
 <210> 107
 <211> 281
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> pTalpha-FL
 35 <400> 107
 Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

ES 2 828 669 T3

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu
225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg
245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu
260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala
275 280

<210> 108

<211> 263
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> pTalpha-Delta15

<400> 108

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
 165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
 180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
 195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu
 225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg
 245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser
 260

<210> 109

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalpha-Delta48

10 <400> 109

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Phe Lys Leu

ES 2 828 669 T3

145	150	155	160												
Leu	Leu	Phe	Asp	Leu	Leu	Leu	Thr	Cys	Ser	Cys	Leu	Cys	Asp	Pro	Ala
				165				170				175			
Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly
				180				185				190			
Ser	His	Arg	Leu	His	Pro	Ala	Thr	Glu	Thr	Gly	Gly	Arg	Glu	Ala	Thr
				195				200				205			
Ser	Ser	Pro	Arg	Pro	Gln	Pro	Arg	Asp	Arg	Arg	Trp	Gly	Asp	Thr	Pro
				210				215				220			
Pro	Gly	Arg	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Val							
	225				230										
110															
219															
PRT															
Secuencia artificial															
pTalpha-Delta62															
110															
Met	Ala	Gly	Thr	Trp	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Cys	Pro	Ala	
1				5				10					15		
Leu	Pro	Thr	Gly	Val	Gly	Gly	Thr	Pro	Phe	Pro	Ser	Leu	Ala	Pro	Pro
				20				25					30		
Ile	Met	Leu	Leu	Val	Asp	Gly	Lys	Gln	Gln	Met	Val	Val	Val	Cys	Leu
				35				40					45		
Val	Leu	Asp	Val	Ala	Pro	Pro	Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Ile	Trp	Phe	Ser
				50				55					60		
Ala	Gly	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu	Asp	Ala	Phe	Thr	Tyr	Gly	Pro	Ser	Pro
				65				70				75			80
Ala	Thr	Asp	Gly	Thr	Trp	Thr	Asn	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser
				85								90			95
Glu	Glu	Leu	Ala	Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Val	Cys	His	Thr	Gly	Pro	Gly
				100				105					110		
Ala	Glu	Gly	His	Ser	Arg	Ser	Thr	Gln	Pro	Met	His	Leu	Ser	Gly	Glu
				115									125		

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
 165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
 180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
 195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg
 210 215

<210> 111

<211> 203

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalpha-Delta78

10

<400> 111

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
 165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
 180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly
 195 200

<210> 112

<211> 189

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalpha-Delta92

10

<400> 112

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
 165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg
 180 185

<210> 113

<211> 171

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalpha-Delta110

10 <400> 113

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro

130

135

140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys
 165 170

<210> 114

<211> 167

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa-Delta114

10

<400> 114

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu
 165

ES 2 828 669 T3

5 <210> 115
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> pTalfa-FL-CD28
 <400> 115

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

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu
 225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg
 245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu
 260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser Gly Gly Val Leu Ala
 275 280 285

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
 290 295 300

Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
 305 310 315 320

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
 325 330 335

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 340

<210> 116

<211> 311

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalpha-FL-CD8

10

<400> 116

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
 165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
 180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Arg Glu Ala Thr
 195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu
 225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg
 245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu
 260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala Ala Ser His Arg Asn Arg Arg
 275 280 285

Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro
 290 295 300

Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
 305 310

ES 2 828 669 T3

<211> 325
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> pTalpha-FL-4IBB

<400> 117

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu
 225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Arg
 245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Arg Gly Asp Leu
 260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala Gly Ser Lys Arg Gly Arg Lys
 275 280 285

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
 290 295 300

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 305 310 315 320

Gly Gly Cys Glu Leu
 325

<210> 118

<211> 296

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalpha-Delta48-CD28

10 <400> 118

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser

85

90

95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
 165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
 180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
 195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Ala Ser Gly Gly Val Leu Ala
 225 230 235 240

Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg
 245 250 255

Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
 260 265 270

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
 275 280 285

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 290 295

<210> 119

<211> 263

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa-Delta48-CD8

10

<400> 119

ES 2 828 669 T3

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Ala Ser His Arg Asn Arg Arg
225 230 235 240

Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro

245

250

255

Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
260

<210> 120

<211> 277

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa-Delta48-41BB

10

<400> 120

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
 195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Gly Ser Lys Arg Gly Arg Lys
 225 230 235 240

Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr
 245 250 255

Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu
 260 265 270

Gly Gly Cys Glu Leu
 275

<210> 121

<211> 172

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalpha-Delta114-TCRalpha.IC

10

<400> 121

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 165 170

<210> 122

<211> 173

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalpha. EC-TCRalpha. TM. IC

10

<400> 122

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

ES 2 828 669 T3

Gly Gly Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 145 150 155 160

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 165 170

<210> 123

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa.EC-Delta48-1xMUT

10

<400> 123

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Asp Gly Lys Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Arg Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Arg Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Arg Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
 165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly

180

185

190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
 195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val
 225 230

<210> 124

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa.EC-Delta48-4xMUT

10

<400> 124

Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
 20 25 30

Ile Met Leu Leu Val Ala Gly Ala Gln Gln Met Val Val Val Cys Leu
 35 40 45

Val Leu Asp Val Ala Pro Pro Gly Leu Asp Ser Pro Ile Trp Phe Ser
 50 55 60

Ala Gly Asn Gly Ser Ala Leu Asp Ala Phe Thr Tyr Gly Pro Ser Pro
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Gly Thr Trp Thr Asn Leu Ala His Leu Ser Leu Pro Ser
 85 90 95

Glu Glu Leu Ala Ser Trp Glu Pro Leu Val Cys His Thr Gly Pro Gly
 100 105 110

Ala Glu Gly His Ser Ala Ser Thr Gln Pro Met His Leu Ser Gly Glu
 115 120 125

Ala Ser Thr Ala Ala Thr Cys Pro Gln Glu Pro Leu Arg Gly Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Leu Trp Leu Gly Val Leu Arg Leu Leu Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Asp Leu Leu Leu Thr Cys Ser Cys Leu Cys Asp Pro Ala
 165 170 175

Gly Pro Leu Pro Ser Pro Ala Thr Thr Thr Arg Leu Arg Ala Leu Gly
 180 185 190

Ser His Arg Leu His Pro Ala Thr Glu Thr Gly Gly Arg Glu Ala Thr
 195 200 205

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
 210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val
 225 230

<210> 125

<211> 848

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR multicatenario

10 <400> 125

Met Ala Pro Ala Met Glu Ser Pro Thr Leu Leu Cys Val Ala Leu Leu
 1 5 10 15

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

Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys
 35 40 45

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn
 65 70 75 80

Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 85 90 95

Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr
 100 105 110

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr
 115 120 125

ES 2 828 669 T3

Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
130 135 140

Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro
165 170 175

Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn
180 185 190

Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln
195 200 205

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
210 215 220

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg
225 230 235 240

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
245 250 255

His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
260 265 270

Lys Arg Ala Asp Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
275 280 285

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
290 295 300

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
305 310 315 320

Asp Phe Phe Ile Pro Leu Leu Val Val Ile Leu Phe Ala Val Asp Thr
325 330 335

Gly Leu Phe Ile Ser Thr Gln Gln Val Thr Phe Leu Leu Lys Ile
340 345 350

Lys Arg Thr Arg Lys Gly Phe Arg Leu Leu Asn Pro His Pro Lys Pro
355 360 365

Asn Pro Lys Asn Asn Arg Ala Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys
370 375 380

ES 2 828 669 T3

Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Asp Thr Glu Ser Asn Arg
385 390 395 400

Arg Ala Asn Leu Ala Leu Pro Gln Glu Pro Ser Ser Val Pro Ala Phe
405 410 415

Glu Val Leu Glu Ile Ser Pro Gln Glu Val Ser Ser Gly Arg Leu Leu
420 425 430

Lys Ser Ala Ser Ser Pro Pro Leu His Thr Trp Leu Thr Val Leu Lys
435 440 445

Lys Glu Gln Glu Phe Leu Gly Val Thr Gln Ile Leu Thr Ala Met Ile
450 455 460

Cys Leu Cys Phe Gly Thr Val Val Cys Ser Val Leu Asp Ile Ser His
465 470 475 480

Ile Glu Gly Asp Ile Phe Ser Ser Phe Lys Ala Gly Tyr Pro Phe Trp
485 490 495

Gly Ala Ile Phe Phe Ser Ile Ser Gly Met Leu Ser Ile Ile Ser Glu
500 505 510

Arg Arg Asn Ala Thr Tyr Leu Val Arg Gly Ser Leu Gly Ala Asn Thr
515 520 525

Ala Ser Ser Ile Ala Gly Gly Thr Gly Ile Thr Ile Leu Ile Ile Asn
530 535 540

Leu Lys Lys Ser Leu Ala Tyr Ile His Ile His Ser Cys Gln Lys Phe
545 550 555 560

Phe Glu Thr Lys Cys Phe Met Ala Ser Phe Ser Thr Glu Ile Val Val
565 570 575

Met Met Leu Phe Leu Thr Ile Leu Gly Leu Gly Ser Ala Val Ser Leu
580 585 590

Thr Ile Cys Gly Ala Gly Glu Leu Lys Gly Asn Lys Val Pro Glu
595 600 605

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
610 615 620

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

ES 2 828 669 T3

625	630	635	640
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Gly Ser Gly Val Lys Gln			
645		650	655
Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn			
660		665	670
Pro Gly Pro Met Ile Pro Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Val			
675		680	685
Glu Gln Ala Ala Ala Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp			
690		695	700
Ala Ile Leu Phe Leu Tyr Gly Ile Val Leu Thr Leu Leu Tyr Cys Arg			
705		710	715
Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser			
725		730	735
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly			
740		745	750
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr			
755		760	765
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys			
770		775	780
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys			
785		790	795
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg			
805		810	815
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala			
820		825	830
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
835		840	845

<210> 126
 <211> 2547
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> CAR multicatenario

 <400> 126

5

10

atggctcctg	ccatggaatc	ccctactcta	ctgtgtgtag	ccttactgtt	cttcgctcca	60
gatggcgtgt	tagcagaggt	gcagttgcag	cagtccaggc	cagagtttat	taagccccga	120
gcctccgtca	agatgtcctg	caaggccagc	gggtacactt	tcaccagcta	cgtcatgcat	180
tgggtgaagc	agaagccagg	ccaggggctt	gagtggattt	ggtacatcaa	ccccctacaac	240
gacgggacca	aatacaacga	gaaattcaag	ggcaaagcca	caactcaccc	cgataagtcc	300
tcctctaccc	cctacatgga	gctcagctcc	ctgacccctcg	aggatagcgc	tgtgttattac	360
tgcgcaaggg	gcacatacta	ctatgctct	agggtgttcc	actactgggg	gcagggcact	420
actctcacag	ttagctcagg	cggaggaggc	agtggccggag	ggggaaagtgg	ggccggccggc	480
agcgatattt	tcatgaccca	ggcagccctt	agtatccctt	tgactccagg	cgagagcgtg	540
agcatcagct	gccggtccag	caagagccctg	ctgaacagta	acggaaacac	atacctctac	600
tggtttctgc	agaggcccg	ccagagccct	cagctgctga	tttaccgcac	gtcaaatttt	660
gcctctgggg	tggccgataa	atttatgtgg	agcggatccg	gcacagctt	tacattgcgg	720
atctccagag	tgcaggccga	agacgtgggg	gtctattact	gtatgcaaca	cctggaataac	780
ccctttaccc	tcggagccgg	cacaagactg	gagctgaagc	gggctgacac	cacaaccccc	840
gctccaaaggc	ccccctacccc	cgcaccaact	attgcctccc	agccactctc	actgcggcct	900
gaggccctgtc	ggcccgctgc	tggaggcgca	gtgcatacaa	ggggctcga	tttcgcctgc	960
gatttttta	tccattttt	gggtgttatt	ctgtttgtt	tggacacacagg	attattttatc	1020
tcaactcagc	agcagggtcac	atttctctt	aagattaaga	gaaccaggaa	aggcttcaga	1080
cttctgaacc	cacatcctaa	gccaaccccc	aaaaacaaca	gagccgaggg	cagaggcagc	1140
ctgctgaccc	gccccgacgt	ggaggagaac	ccaggccccc	tggacacaga	aagtaatagg	1200
agagcaatc	ttgtctcc	acaggagcc	tccagtgtc	ctgcatttga	agtcttggaa	1260
atatctcccc	agaagttatc	tgcaggcaga	ctattttaat	cgccctcattc	cccaccactg	1320
catacatggc	ttagctttt	aaaaaaagag	caggagttcc	tggggtaac	acaaatttctg	1380
actgctatga	tatgccttt	tttttggaaaca	tttgcgttct	ctgtacttga	tatttcacac	1440
attgagggag	acatttttt	atcattttaa	gcagggttate	cattctgggg	agccatattt	1500
ttttctattt	cttggatgtt	gtcaatttata	tcttggaaagga	gaaatgcaac	atatctggtg	1560
agaggaagcc	tgggagcaaa	cactgccagc	agcatagctg	ggggaaacggg	aattaccatc	1620
ctgatcatca	acttgaagaa	gagcttggcc	tatatccaca	tccacagttt	ccagaaattt	1680
tttgagacca	agtgccttt	ggcttccctt	tccactgttt	tttgcgtt	tttgcgtt	1740
ctcaccattt	tgggacttgg	tagtgcgtt	tcactcacaa	tcttgcgtt	tggggaaagaa	1800
ctcaaaggaa	acaagggtcc	agagaaacgg	ggccggaaaga	agctccctta	catttttaag	1860
cagccttca	tgcggccagt	gcagacaacc	caagaggagg	atgggtgtt	ctgcagattc	1920
cctgagaaag	agaaggccgg	gtgcagctg	gtttctggcg	tgtttttttt	tttgcgtt	1980
gaccttctca	agttggccgg	agacgtggag	tccaaacccag	ggcccatgat	tccagcgtt	2040
gtcttgcctt	tactcccttt	gttttgcataa	gcagccggcc	tggggagggcc	tcagctctgc	2100
tatatcctgg	atgcctatcc	gttttgcata	ggtttttttt	tcacccttct	ctactgtcga	2160
ctgaagatcc	aagtgcgaaa	ggcagctata	accagctatg	agaaatcaag	agtgtttttt	2220
tccaggagcg	cagatgcccc	cgcctatcaa	caggccaga	accagctata	caacgagctt	2280
aacctccggg	ggccggaaaga	atacgacgtt	ttggataaga	gaagggggcg	ggccccccgg	2340
atgggaggaa	agccccggag	gaagaaccct	caggaggccc	tgtacaacga	gctgcagaag	2400
gataagatgg	ccgaggcccta	ctcagagatc	gggtatgtt	gggagccggc	ccggccggaaag	2460
gggcacatgt	ggcttccacc	ggggctgtt	acagccacaa	aggacacata	cgacgcctt	2520
cacatgcagg	cccttccacc	ccgggtt				2547

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de uno o más linfocitos T humanos para inmunoterapia, que comprende:
 - 5 (a) proporcionar uno o más linfocitos T humanos de un cultivo celular o de una muestra de sangre;
 - (b) modificar genéticamente dicho uno o más linfocitos T inactivando al menos:
 - un primer gen que codifica una proteína del punto de control inmunitario y
 - un segundo gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR);
 - 10 (c) introducir en dicho uno o más linfocitos T un receptor quimérico de antígenos (CAR); y
 - (d) expandir dicho uno o más linfocitos T,
en donde dicho gen del punto de control inmunitario se selecciona del grupo que consiste en: PD1, CTLA-4, LAG3, Tim3, BTLA, BY55, TIGIT, B7H5, LAIR1, SIGLEC10 y 2B4.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende modificar linfocitos T:
 - (a) introduciendo en dicho linfocito T al menos una endonucleasa de sitio de corte infrecuente que pueda inactivar selectivamente por escisión de ADN respectivamente:
 - 20 - dicho gen que codifica una proteína del punto de control inmunitario y
 - al menos un gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR); y
 - (b) expandiendo dichos linfocitos T.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen del punto de control inmunitario es PD1 o CTLA-4.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el al menos un primer y un segundo gen inactivados se seleccionan del grupo que consiste en PD1 y TCR alfa, PD1 y TCR beta, CTLA-4 y TCR alfa, CTLA-4 y TCR beta, LAG3 y TCR alfa, LAG3 y TCR beta, Tim3 y TCR alfa, Tim3 y TCR beta, BTLA y TCR alfa, BTLA y TCR beta, BY55 y TCR alfa, BY55 y TCR beta, TIGIT y TCR alfa, TIGIT y TCR beta, B7H5 y TCR alfa, B7H5 y TCR beta, LAIR1 y TCR alfa, LAIR1 y TCR beta, SIGLEC10 y TCR alfa, SIGLEC10 y TCR beta, 2B4 y TCR alfa, y 2B4 y TCR beta.
- 35 5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el ARNm que codifica dicha al menos una endonucleasa de sitio de corte infrecuente se introduce en dichos linfocitos T por electroporación.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha al menos una endonucleasa de sitio de corte infrecuente es una nucleasa TALE.
- 40 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos una nucleasa TALE se dirige contra una de las secuencias diana génicas de TCRalfa seleccionadas de SEQ ID NO: 37 o SEQ ID NO: 57 a SEQ ID NO: 60.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos una nucleasa TALE se dirige contra una de las secuencias diana génicas de TCRbeta seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39.
- 45 9. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos una nucleasa TALE se dirige contra una de las secuencias diana génicas de PD1 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 78.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos una nucleasa TALE se dirige contra una de las secuencias diana génicas de CTLA-4 seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 76.
- 50 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos uno o más linfocitos T en la etapa a) derivan de linfocitos T inflamatorios, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T reguladores o linfocitos T auxiliares, y/o de linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+.
- 55 12. Un linfocito T humano aislado, en que al menos dos genes se han inactivado, que son genes seleccionados del grupo que consiste en: PD1 y TCR alfa, PD1 y TCR beta, CTLA-4 y TCR alfa, CTLA-4 y TCR beta, LAG3 y TCR alfa, LAG3 y TCR beta, Tim3 y TCR alfa, Tim3 y TCR beta, BTLA y TCR alfa, BTLA y TCR beta, BY55 y TCR alfa, BY55 y TCR beta, TIGIT y TCR alfa, TIGIT y TCR beta, B7H5 y TCR alfa, B7H5 y TCR beta, LAIR1 y TCR alfa, LAIR1 y TCR beta, SIGLEC10 y TCR alfa, SIGLEC10 y TCR beta, 2B4 y TCR alfa, y 2B4 y TCR beta, comprendiendo además una secuencia polinucleotídica exógena que codifica un receptor quimérico de antígenos.
- 60 13. El linfocito T aislado de la reivindicación 12, en donde dicho receptor quimérico de antígenos es un receptor quimérico de antígenos multicatenario.
- 65 14. El linfocito T aislado de la reivindicación 13, en donde dicho receptor quimérico de antígenos comprende al menos

un dominio de transducción de señales, en donde dicho dominio de transducción de señales es CD137 (4-1BB).

15. El linfocito T aislado de la reivindicación 12 para su uso como medicamento.
- 5 16. El linfocito T aislado de la reivindicación 12 para su uso en un método de tratamiento de un cáncer o una infección vírica.
17. El linfocito T aislado de la reivindicación 12 para su uso en un método de tratamiento de linfoma.
- 10 18. Una composición farmacéutica que comprende al menos un linfocito T aislado de la reivindicación 12.
19. Una población de linfocitos T humanos modificados preparados de acuerdo con el método de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un paciente.
- 15 20. La población de acuerdo con la reivindicación 19, para el uso de la reivindicación 19, en donde dicho paciente está diagnosticado con cáncer o infección vírica.

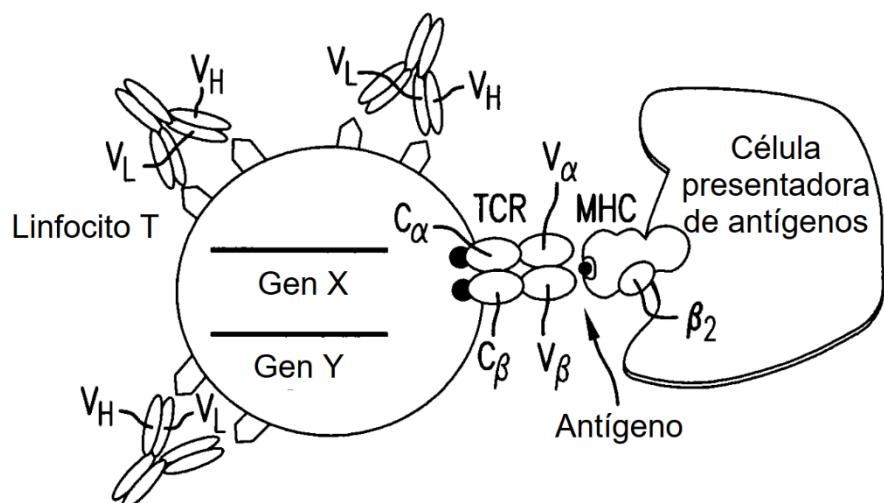


Fig.1

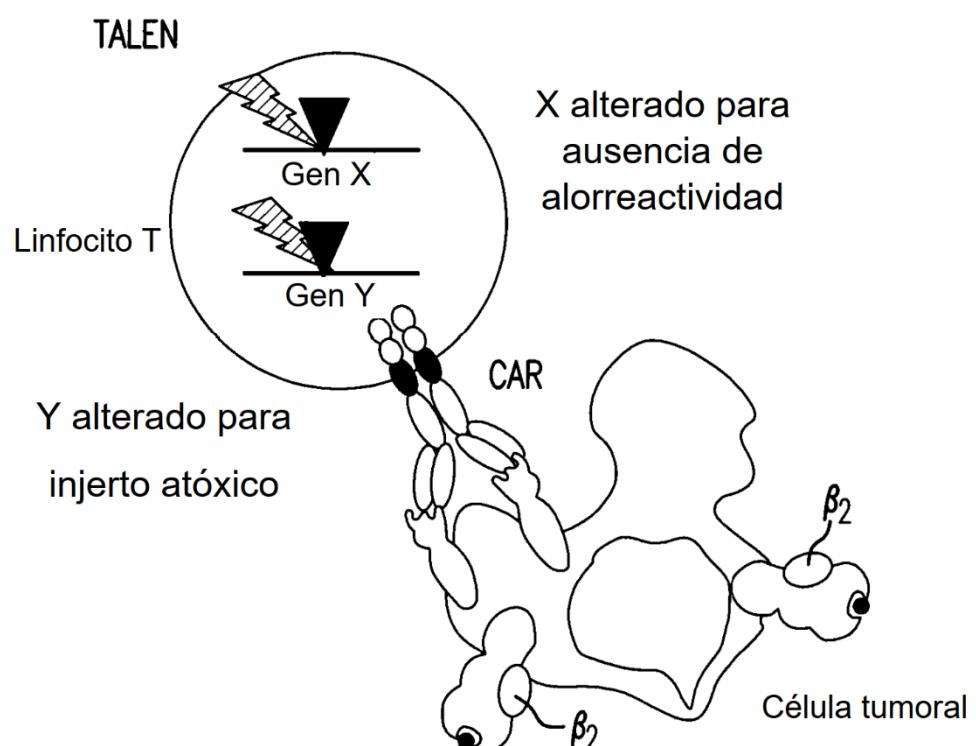


Fig.2

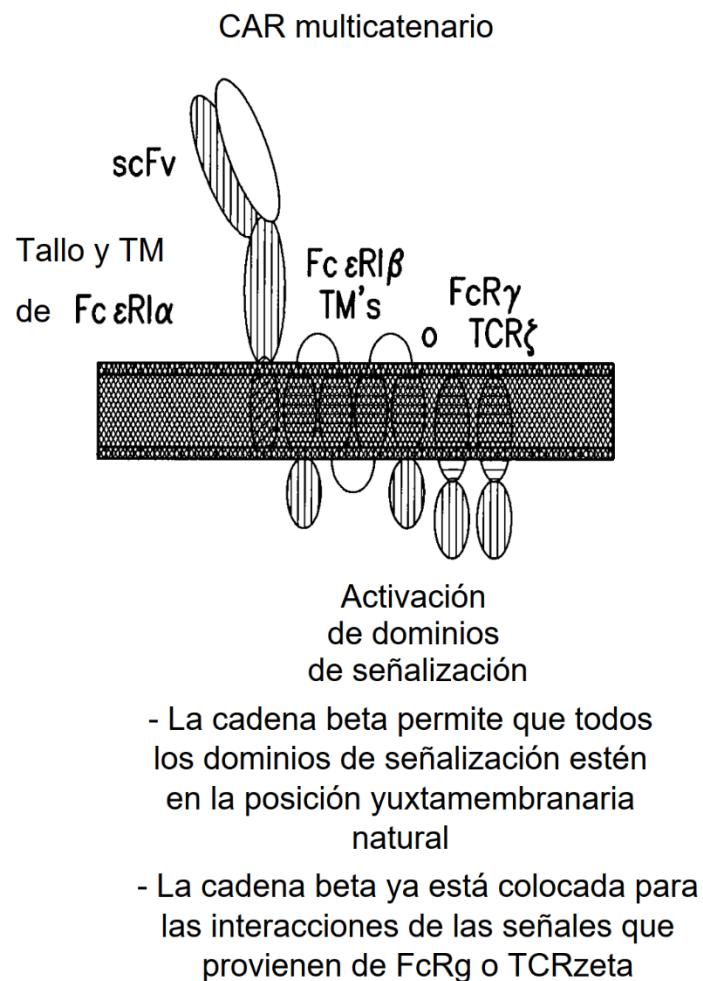


Fig.3

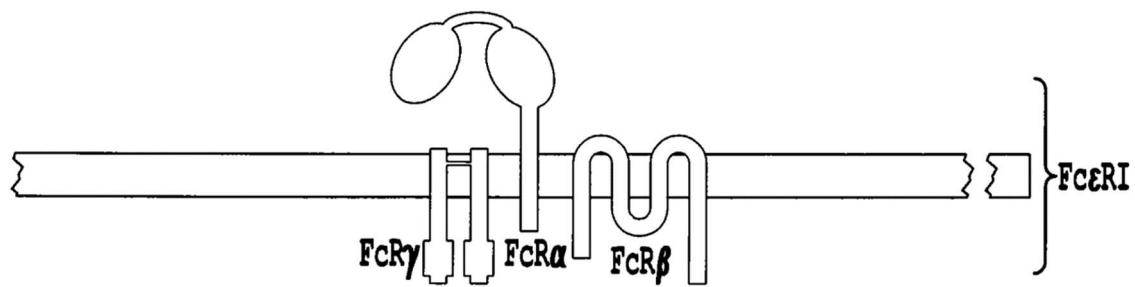
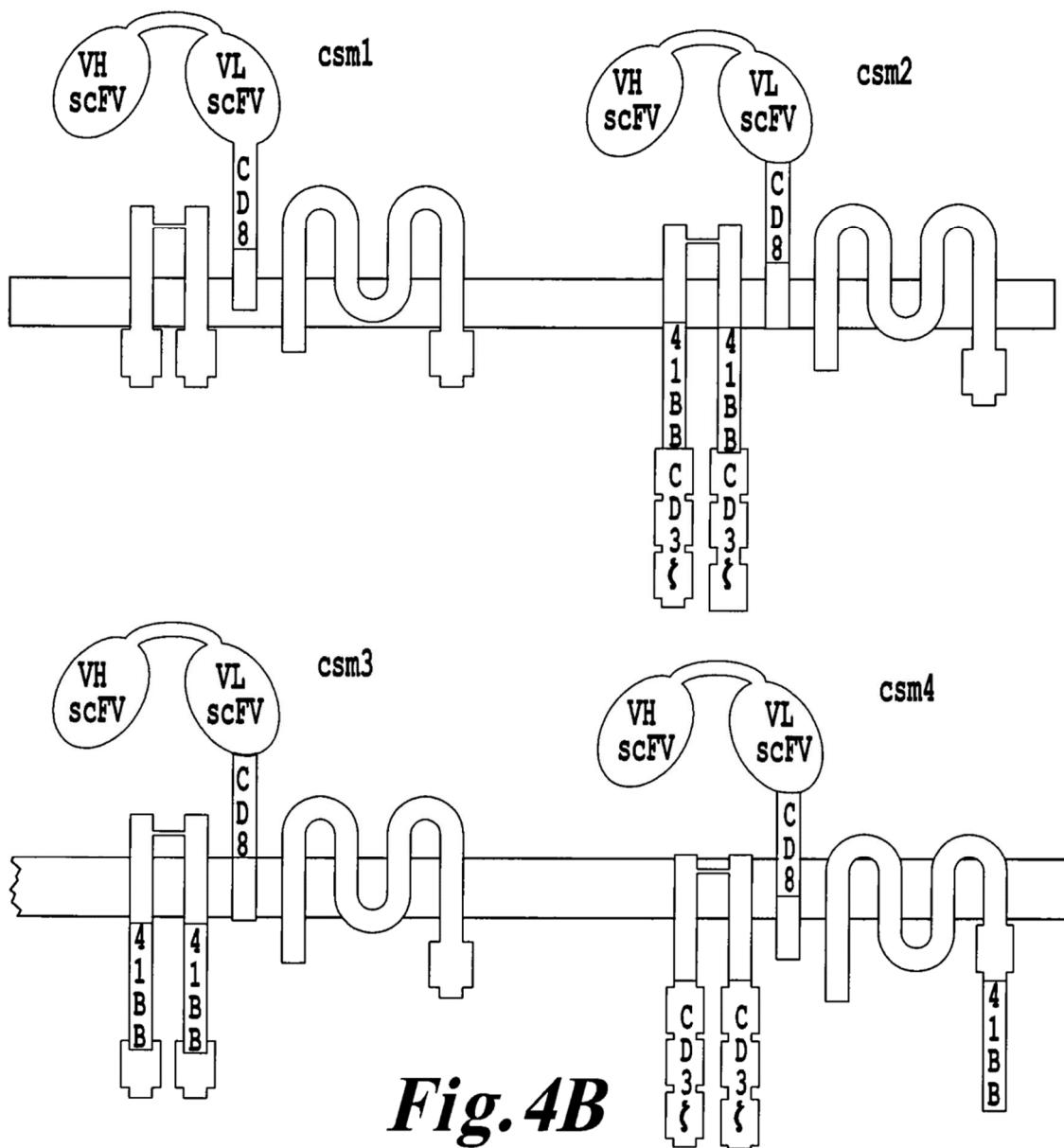
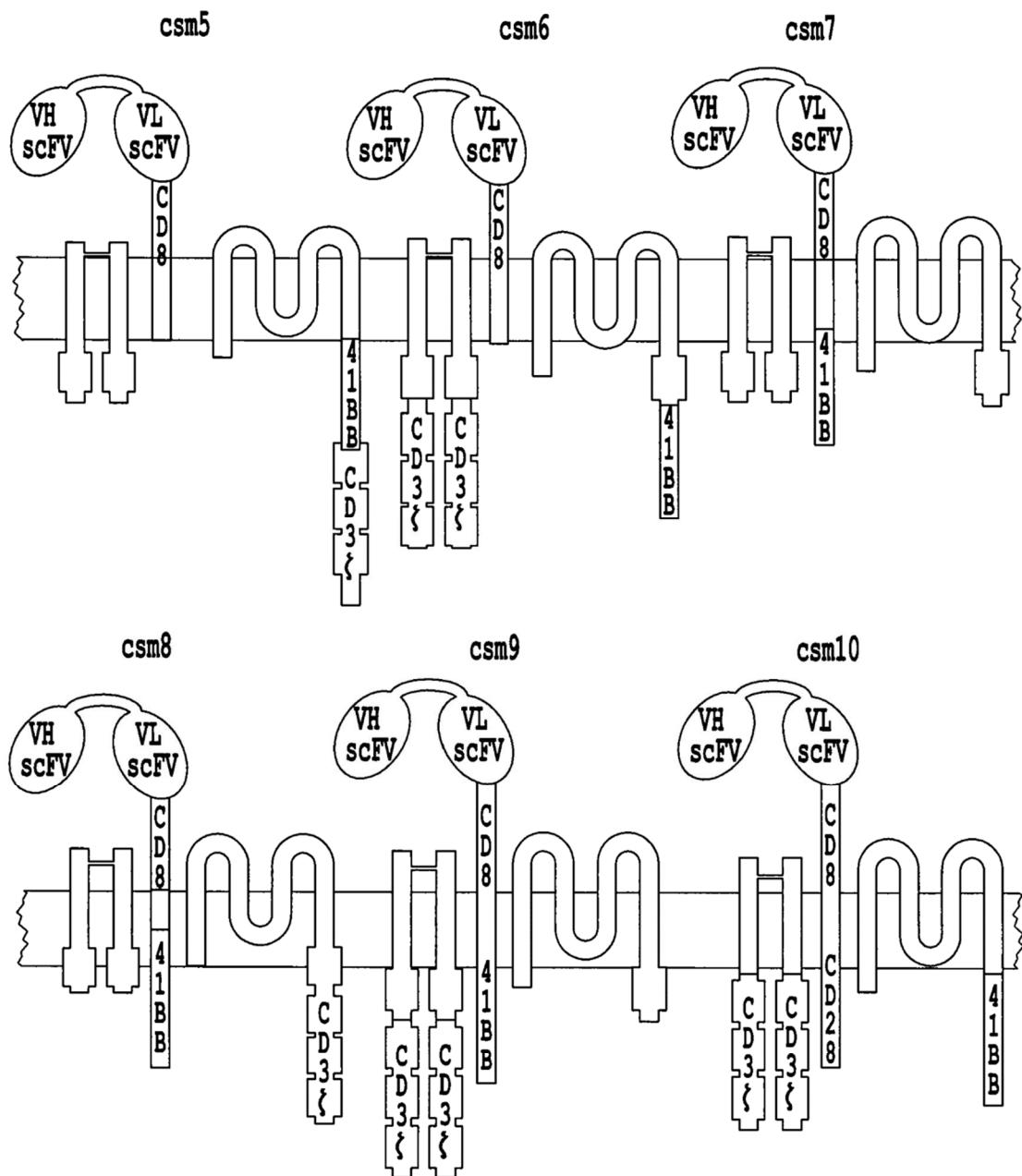
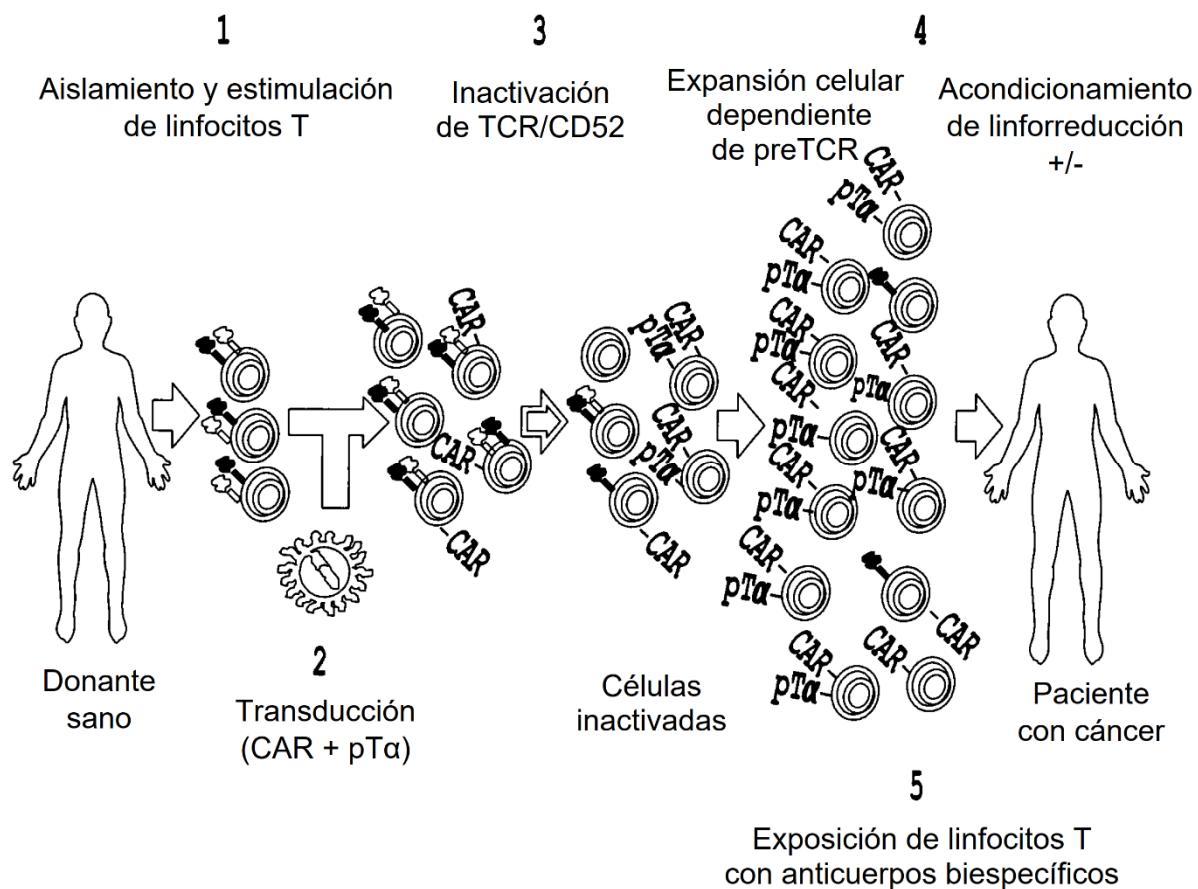


Fig. 4A



*Fig. 4C*



- CD52**: La alteración de CD52 proporciona resistencia a quimioterapia
- TCR**: La alteración de TCRα elimina la alorreactividad (GvHD)
- CAR**: Redirección de linfocitos T/reconocimiento del tumor
- pTa**: pre-TCRα(pTa) dirige la proliferación celular

Fig.5

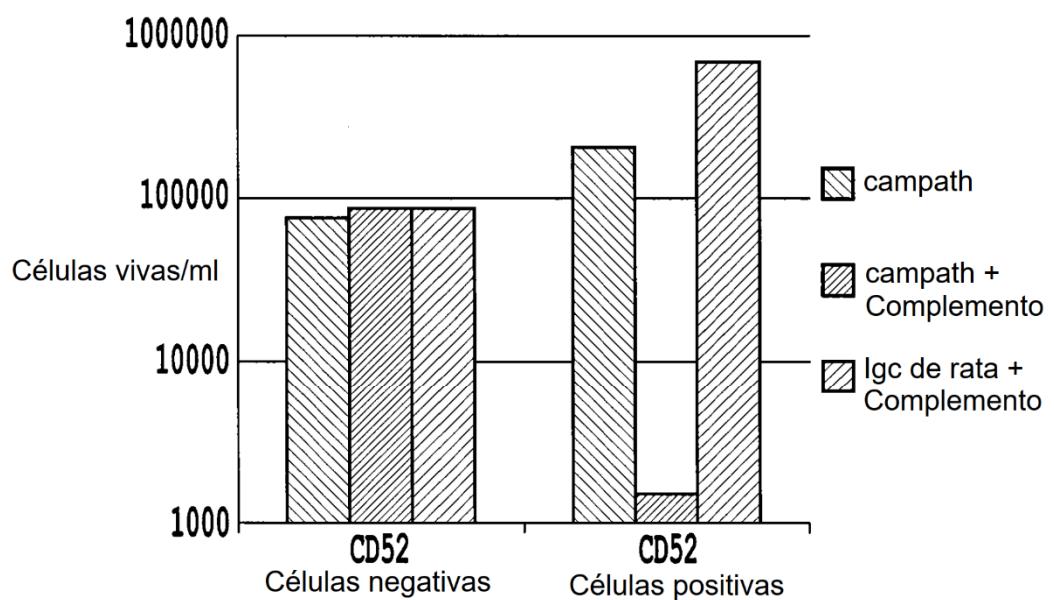


Fig. 6

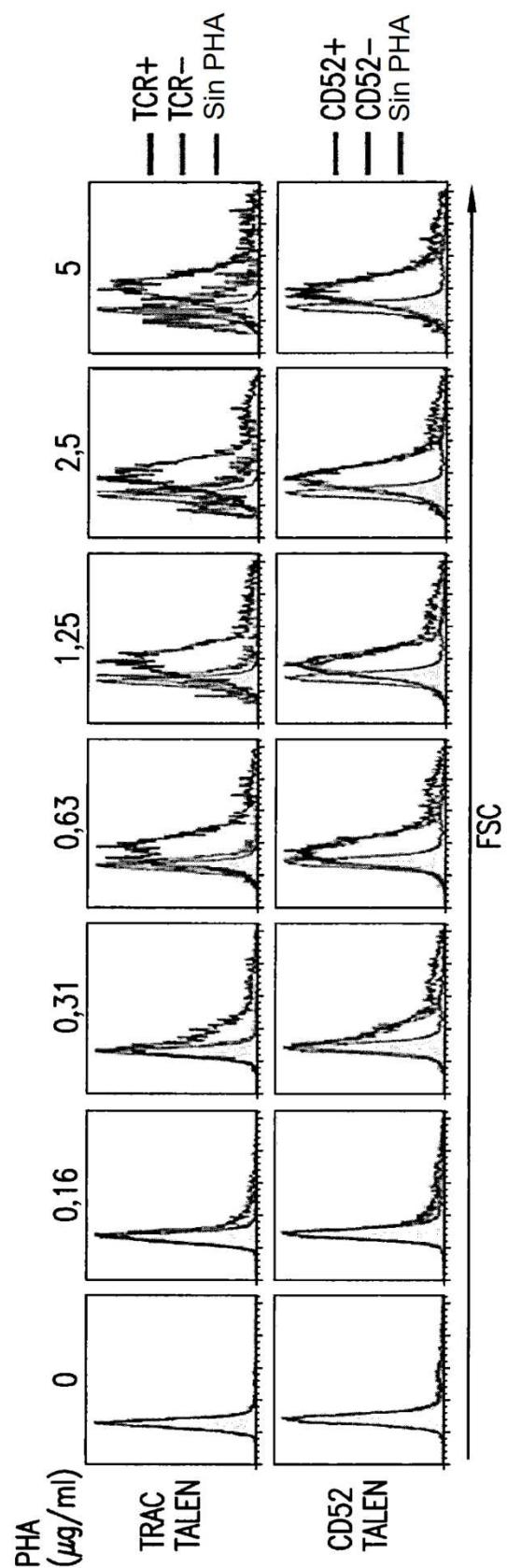
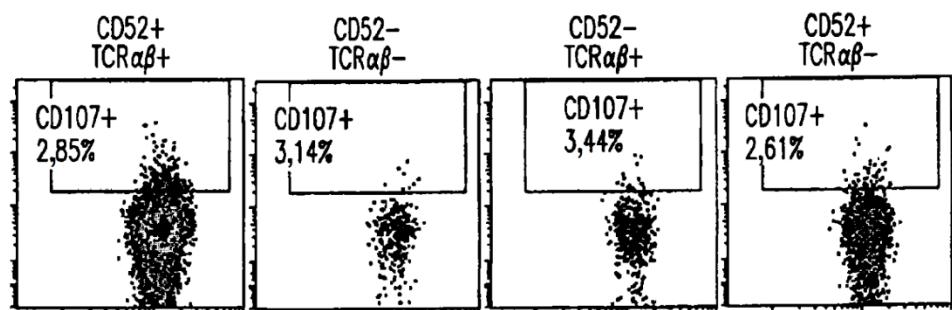
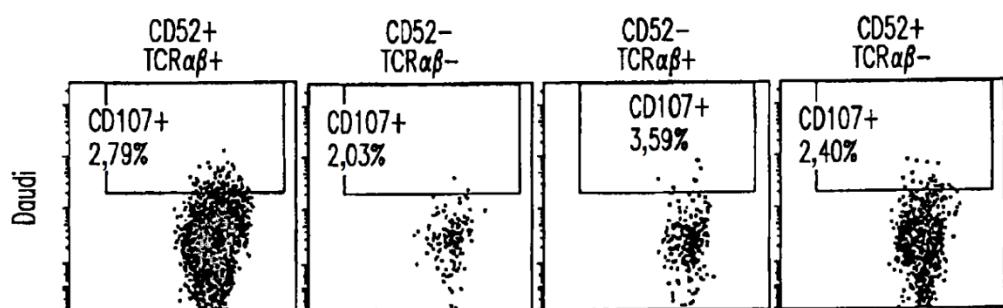
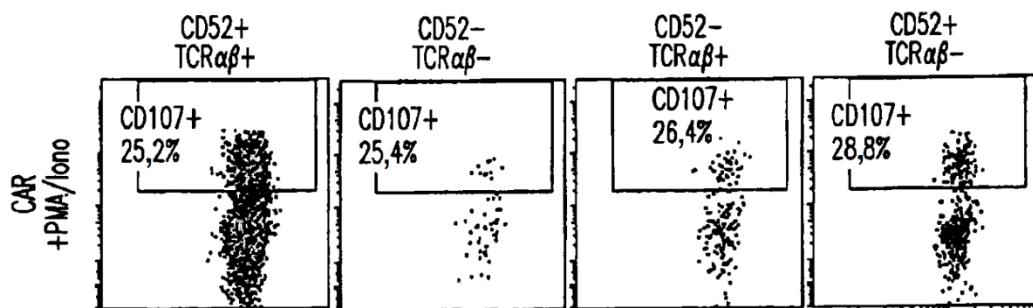


Fig. 7

*Fig.8A**Fig.8B**Fig.8C*

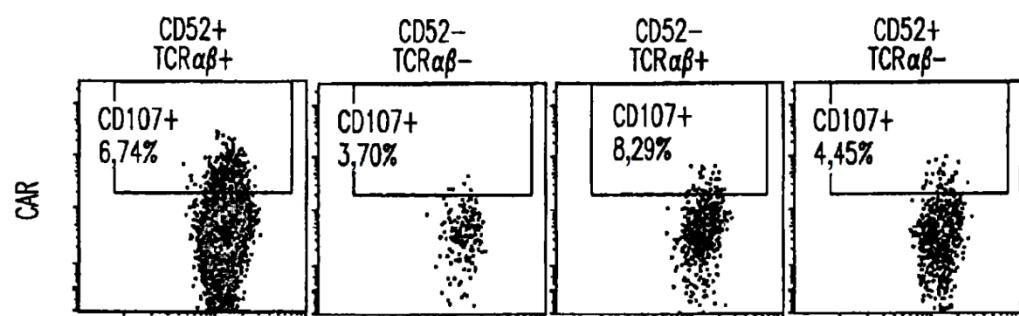


Fig.8D

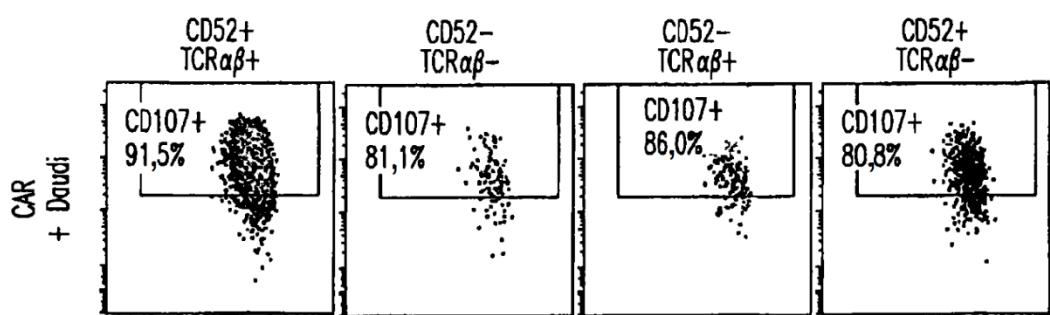


Fig.8E

DIANA DE LA MITAD IZQUIERDA		Tamaño de espaciador (pb)	DIANA DE LA MITAD DERECHA		
TRAC	TTGTCCCACAGATATCC	15	CCGTGTACCCAGCTGAGA		
CD52	TTCCTCCTACTCACCAT	15	GGTACAGGTAAGAGCA A		
Posibles dianas inespecíficas	Secuencia emparejada izquierda	Tamaño de espaciador (pb)	Secuencia emparejada derecha	Emparejamientos incorrectos	
1	ttgctctCaccAgtTA	25	TTtTcaggttaagTgcaa	8	
2	tCActcttacctgGacc	19	CCtacaggtaagGgcCa	7	
3	tctcagAtgAtacacCC	24	AgtacaggCaTgagcCa	8	
4	tGAtcccacagaAatAc	18	gCatTtctgtgggATCa	8	
5	ttCctctAacctgtATT	25	gAtCcaggttaagGTcaa	8	
6	tAgtcccCcagatATGA	19	aAggtgTgGaTgaggaa	8	
7	ttgtcAcacaTataCcG	21	TgGtatTtgtgTgacaa	8	
8	tAAActcttacctgtAT	16	AgatTtctCtgggGcaa	8	
9	ttActccAactAacTat	16	ccgtTtaccGgctTaga	7	
10	tGgctcAtacctgtAT	14	aGgAtgagGTggaggaa	8	
11	ttgctcAtacAtgtGcA	21	atgCtgTgttaggTggTa	8	
12	ttgtcccacagaCatTc	18	ccACgtAGcagctgGga	6	
13	tcAcaCctggtaTAG	27	GtgTtTagtagggGggaa	8	
14	ttgtcccacagCtaCcc	29	gAgtCtTtgtAggacaa	6	
15	tctcaActgAAacaAgg	23	TgtAAtgtTCAagagcaa	8	

Fig. 9A

	Transfección de control (Sin ARN)			Transfección con CD52-TALEN+TRAC+TALEN		
	Número sec. analizadas	Número indeles	Indeles de frecuencia (menos de)	Número sec. analizadas	Número indeles	Indeles de frecuencia (menos de)
	3965	0	2,52E-04	7560	3371	0,44
	1046	0	9,56E-04	2266	1056	0,47
Secuencia emparejada						
CD52-R_TRAC-R	7132	0	1,4E-04	7644	1	1,3E-04
CD52-R_TRAC-R	6431	0	1,6E-04	7377	2	2,7E-04
CD52-R_TRAC-R	2771	0	3,6E-04	2704	80	3,7E-04
TRAC-L_CD52-L	5525	0	1,8E-04	4739	0	2,1E-04
CD52-R_TRAC-R	27958	0	3,6E-05	16646	0	6,0E-05
TRAC-L_CD52-L	22456	0	4,5E-05	32912	10	3,0E-04
TRAC-L_CD52-L	8275	0	1,2E-04	5629	0	1,8E-04
TRAC-L_CD52-R	23253	0	4,3E-05	22054	16	7,3E-04
CD52-L_TRAC-R	13371	0	7,5E-05	13688	1	7,3E-05
CD52	22856	0	4,4E-05	31292	0	3,2E-05
CD52	3238	1	3,1E-04	3064	0	3,3E-04
TRAC	4530	0	2,2E-04	4652	0	2,1E-04
CD52-L_TRAC-R	17361	0	5,8E-05	14454	0	6,9E-05
TRAC-L_CD52-L	32823	0	3,0E-05	33911	1	2,9E-05
CD52-R_TRAC-R	6479	0	1,5E-04	6088	0	1,6E-04

Fig.9B

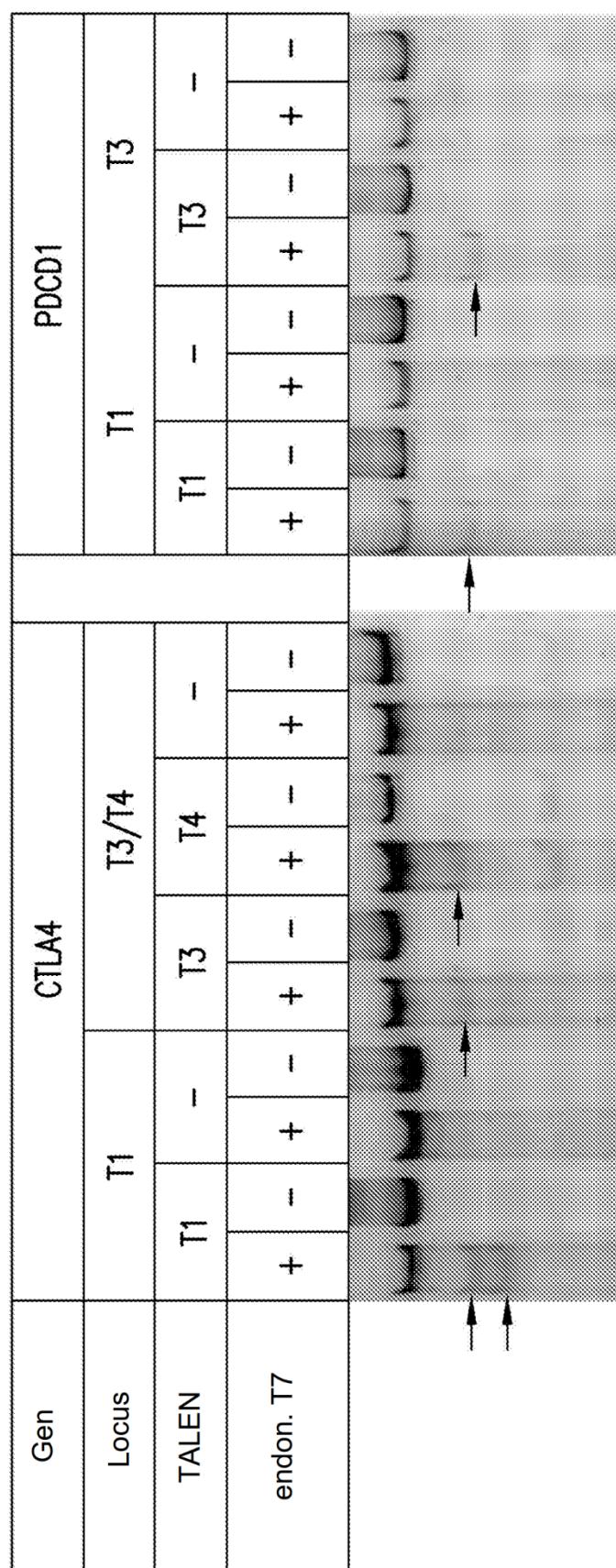


Fig. 10

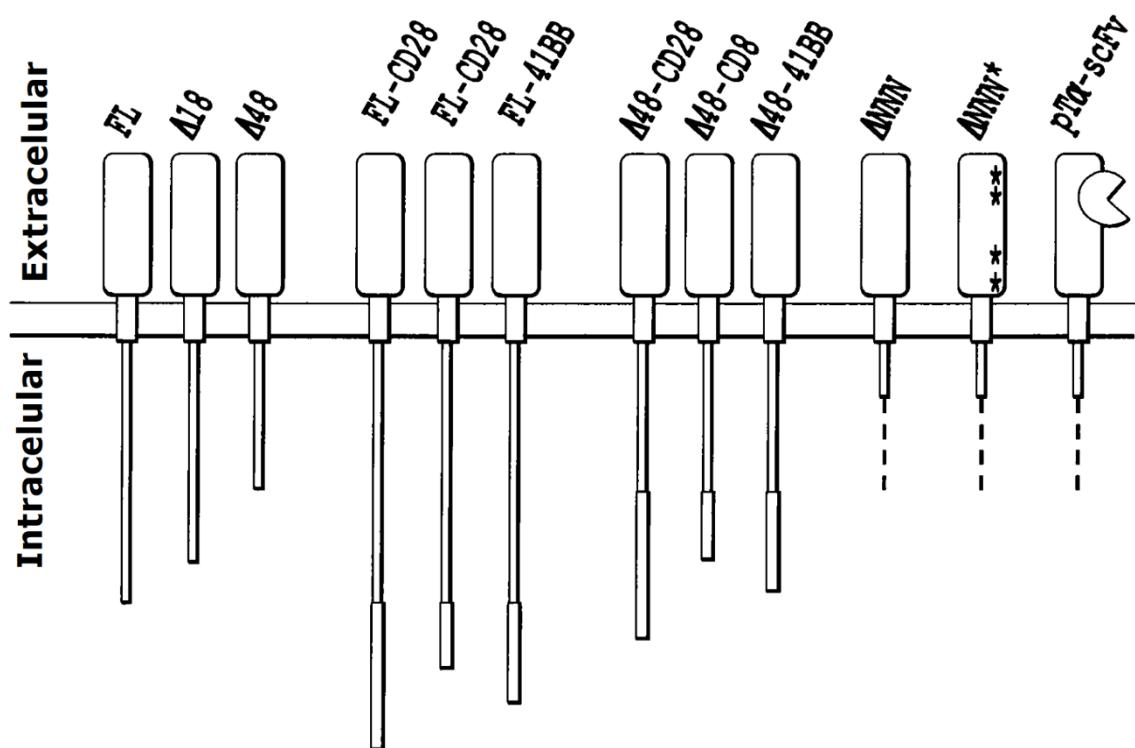


Fig. 11



Fig. 13

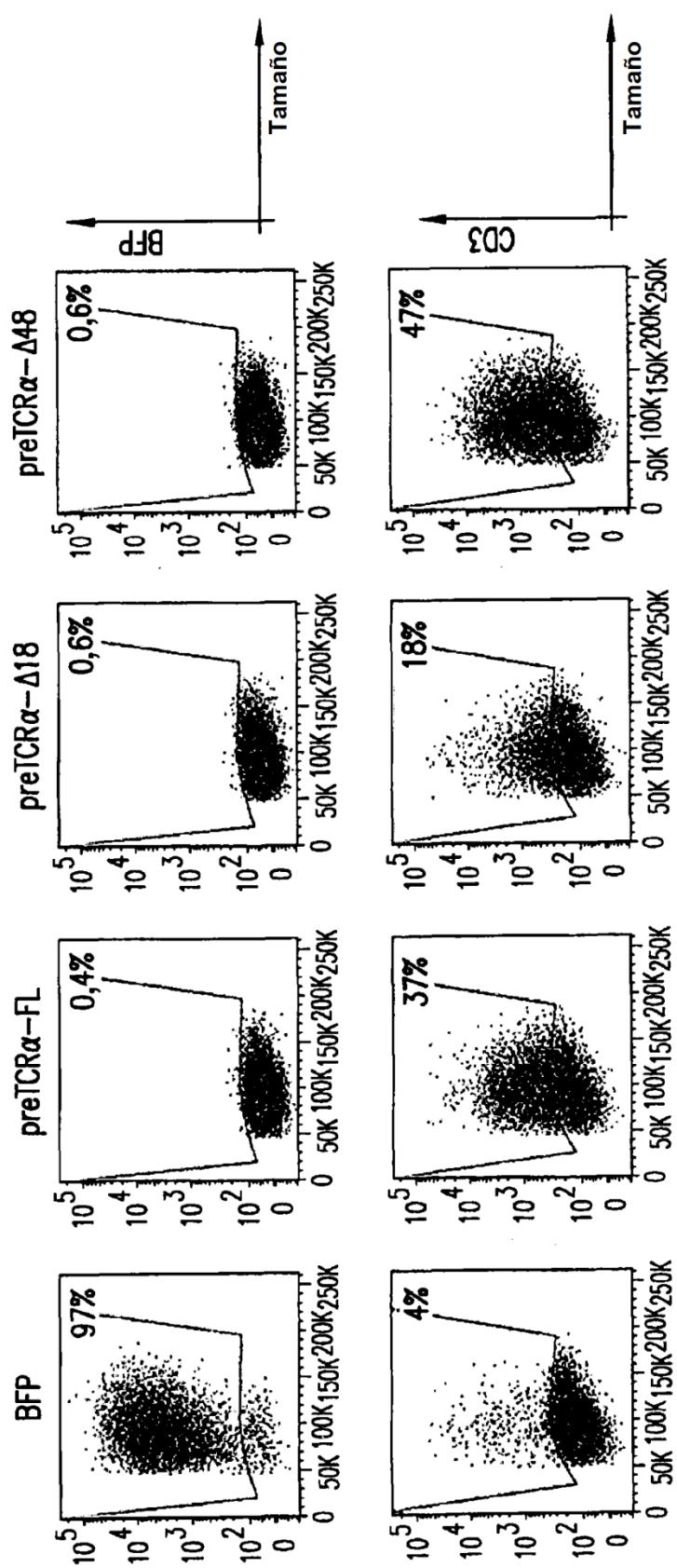


Fig. 12

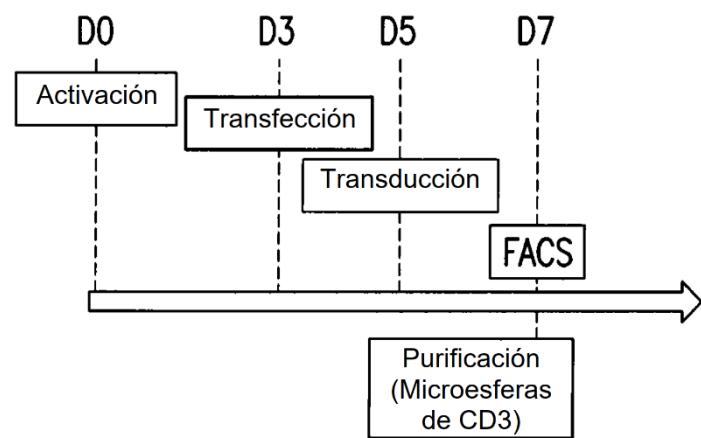


Fig.14A

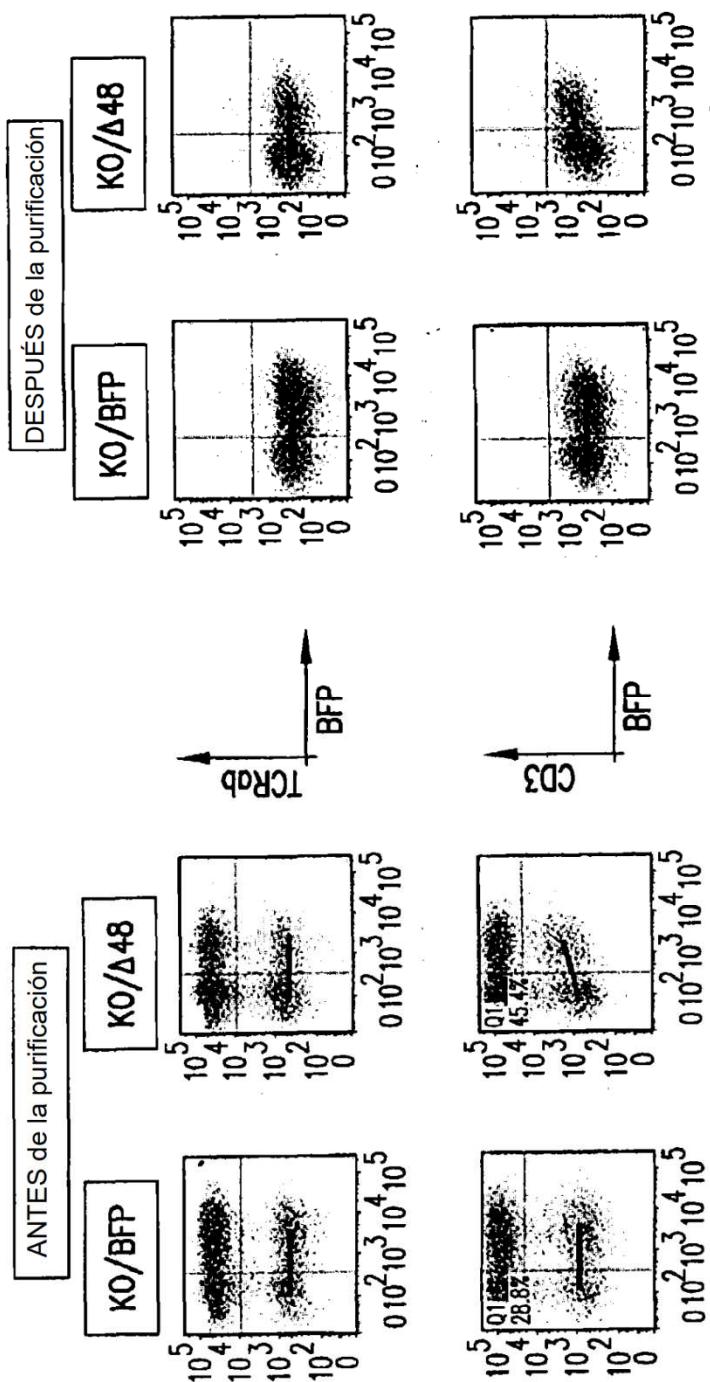


Fig. 14B

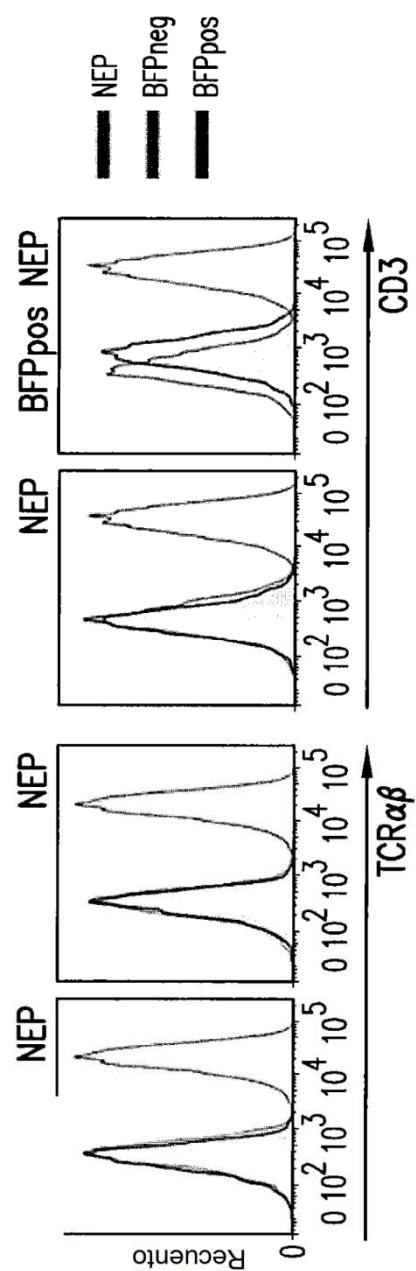
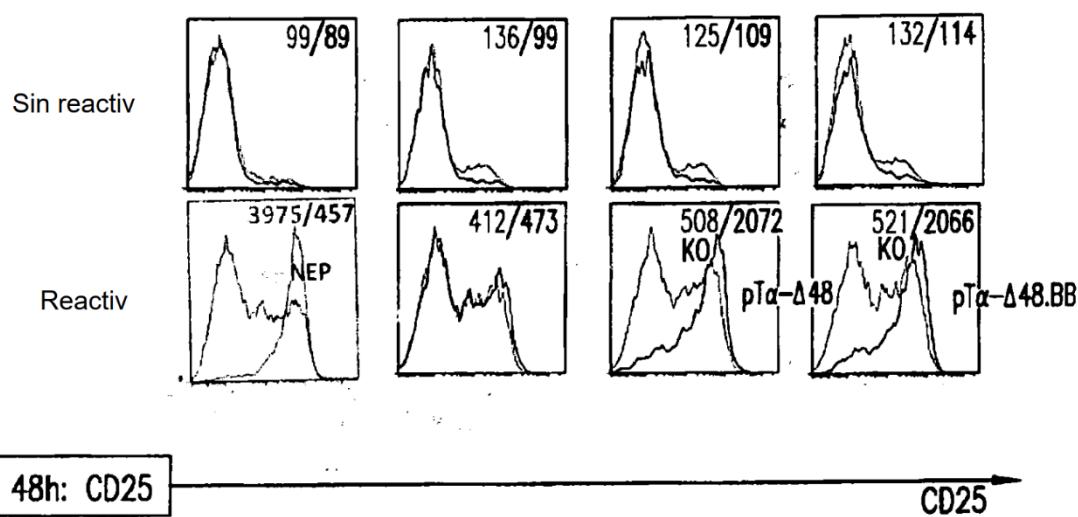
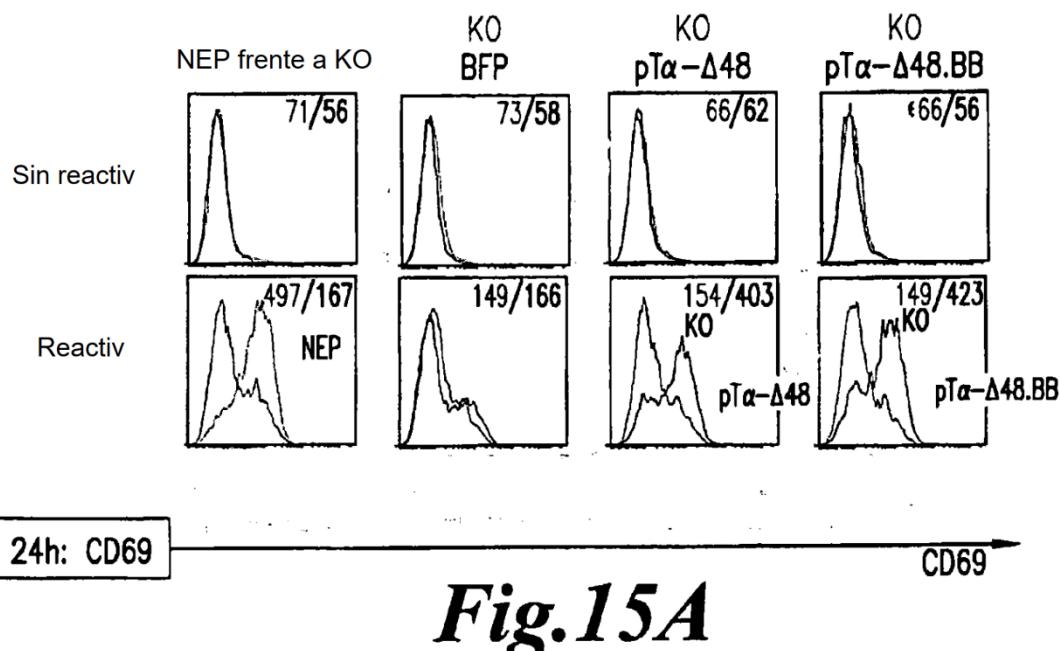


Fig. 14C



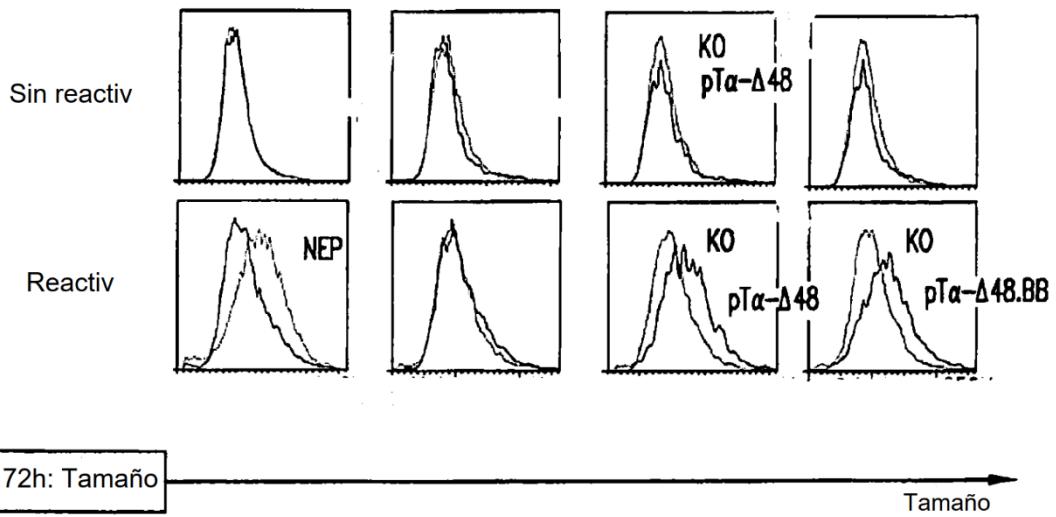
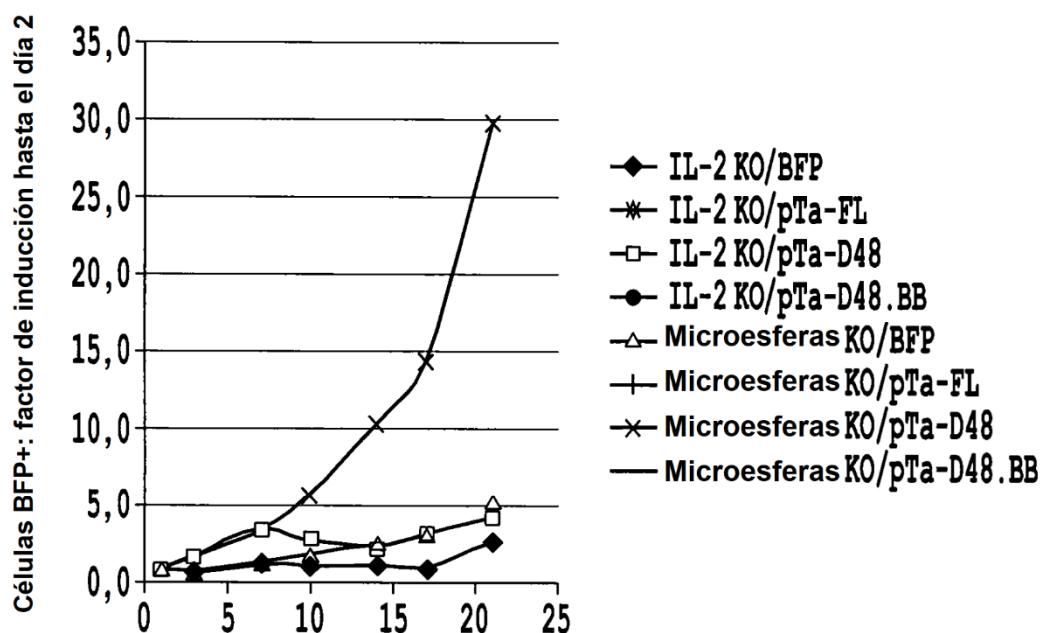
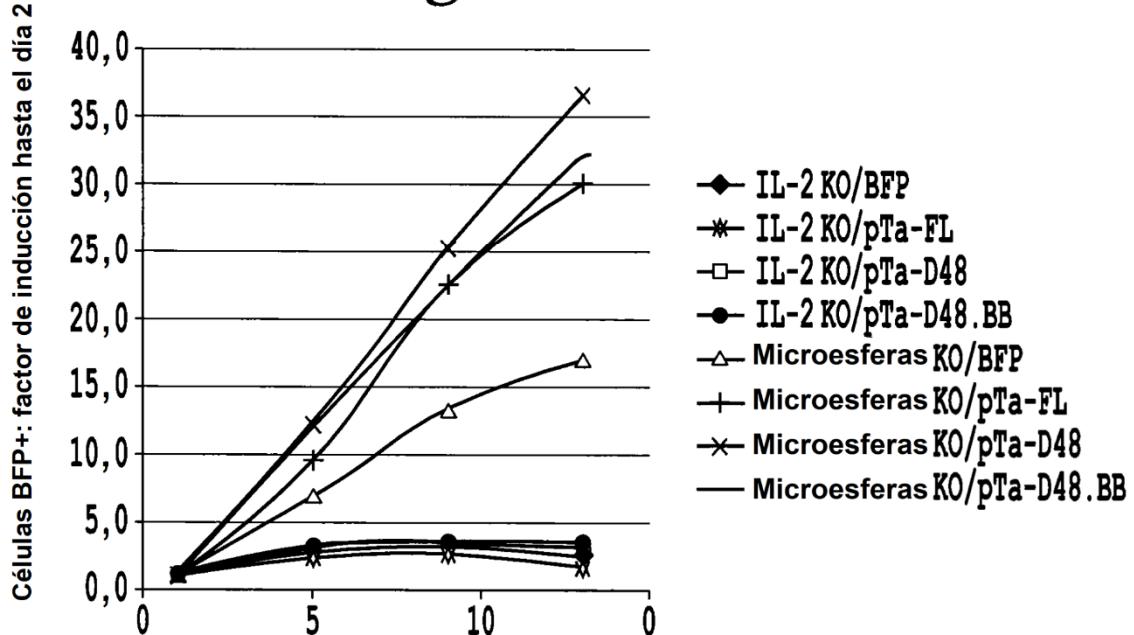


Fig.15C

**Fig. 16A****Fig. 16B**

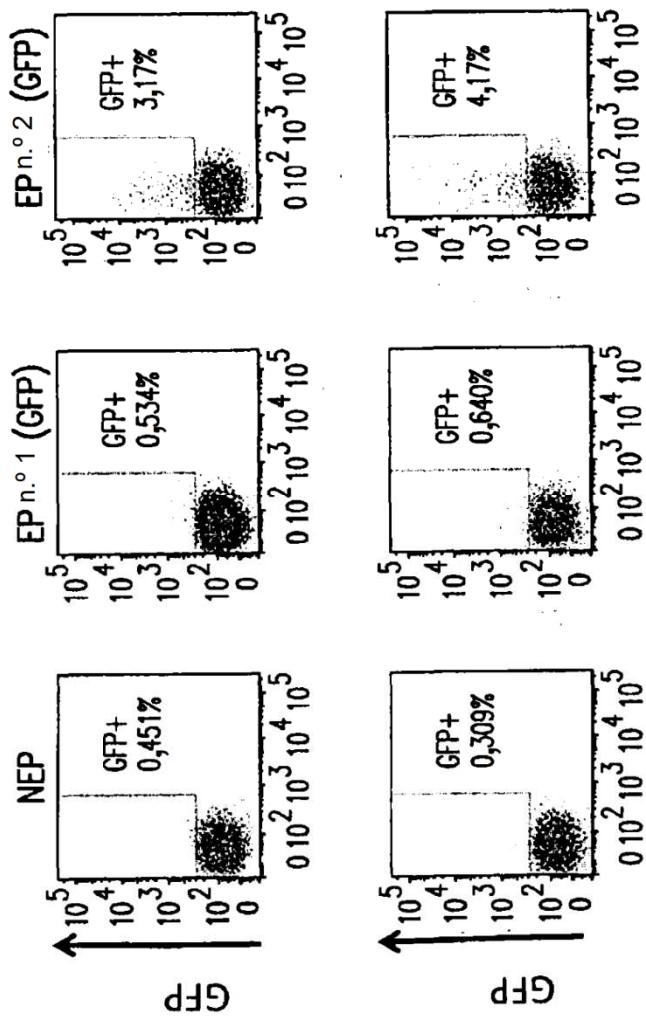


Fig. 17

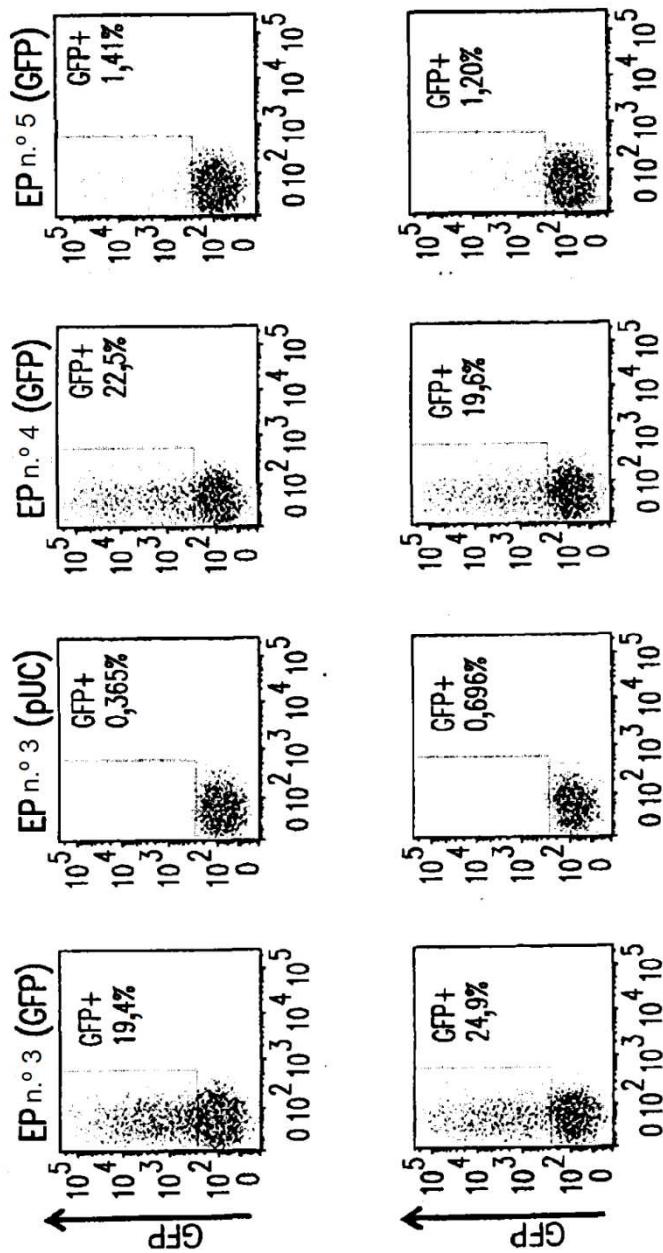


Fig. 17-1

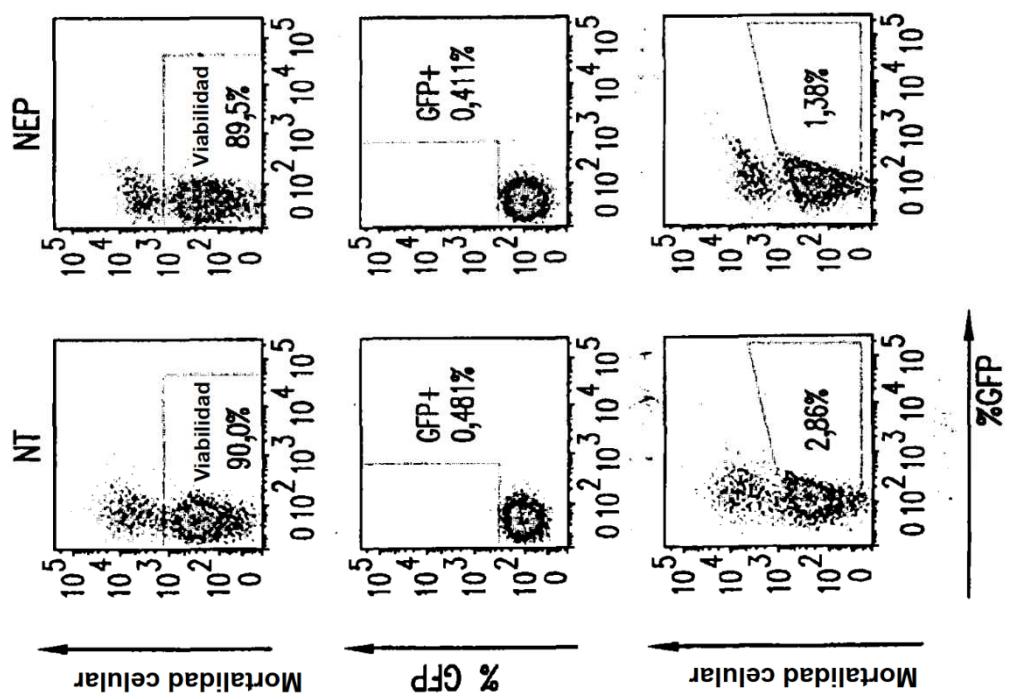


Fig. 18

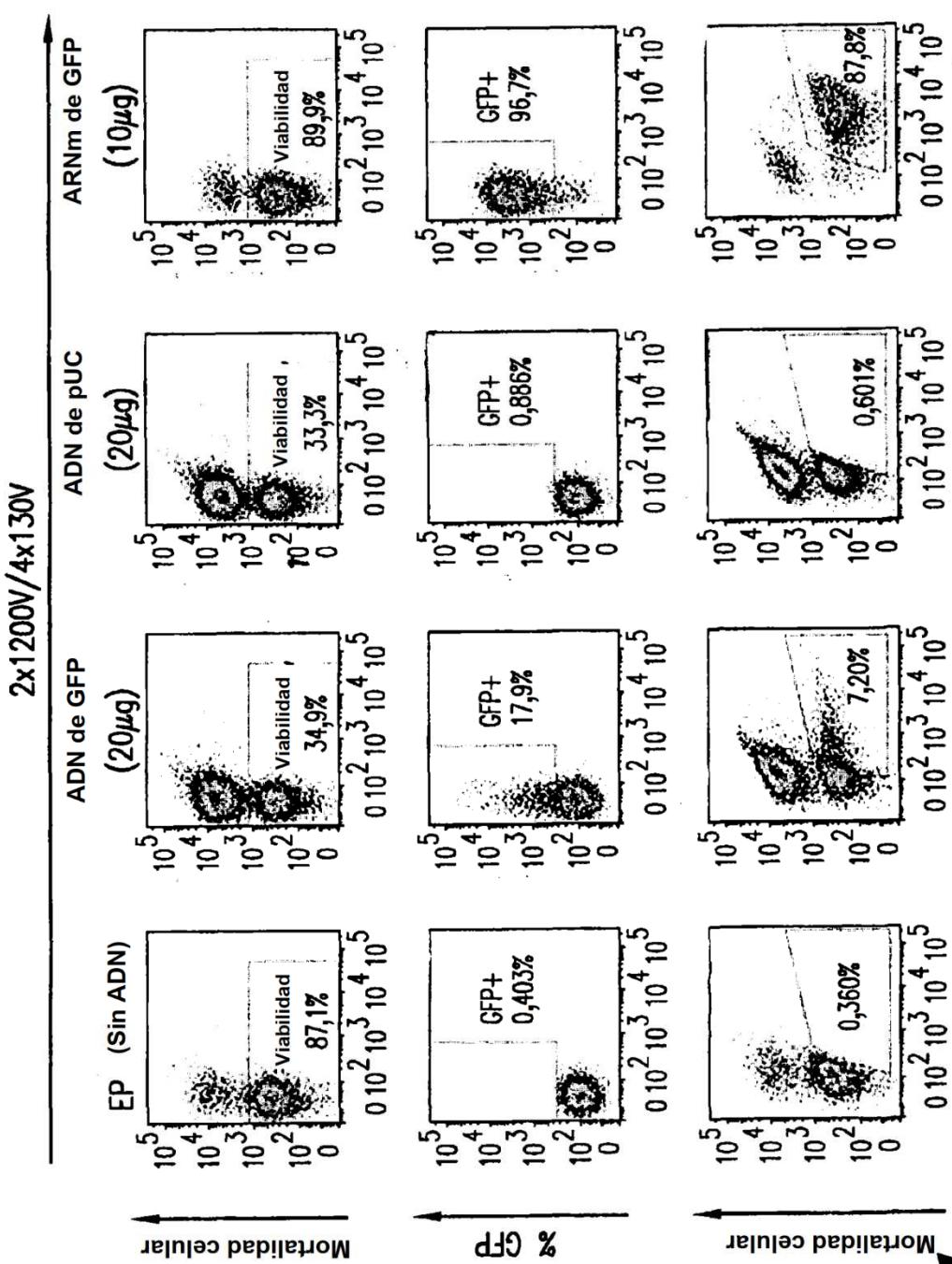


Fig. 18-1

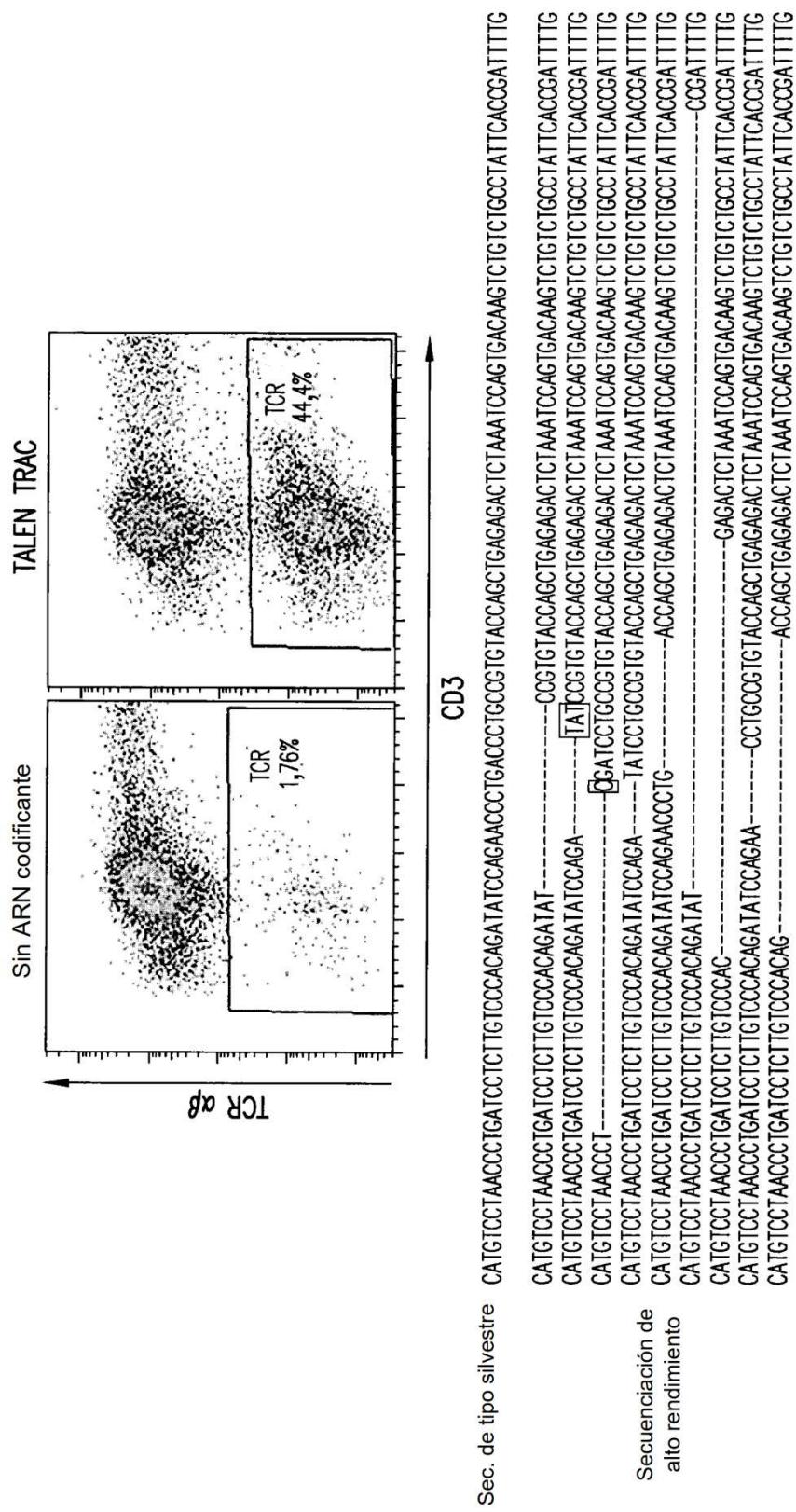


Fig. 19

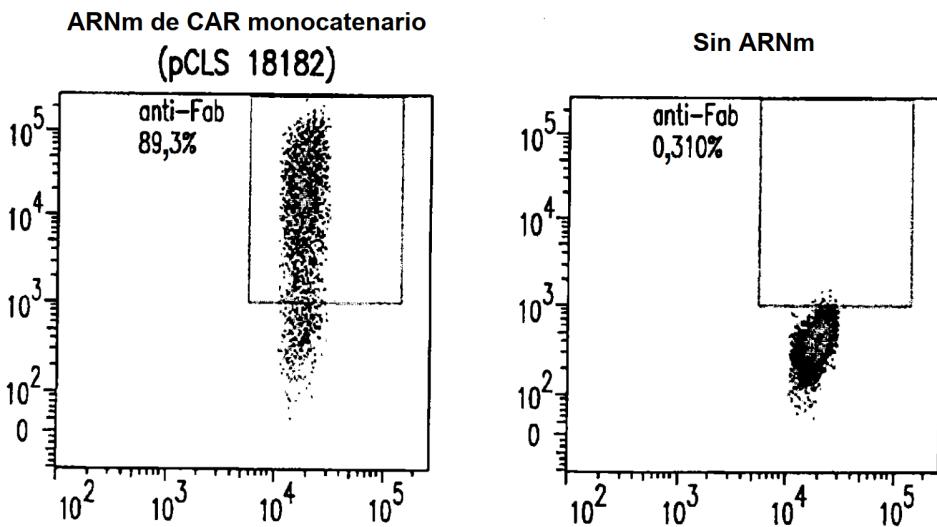


Fig.20A

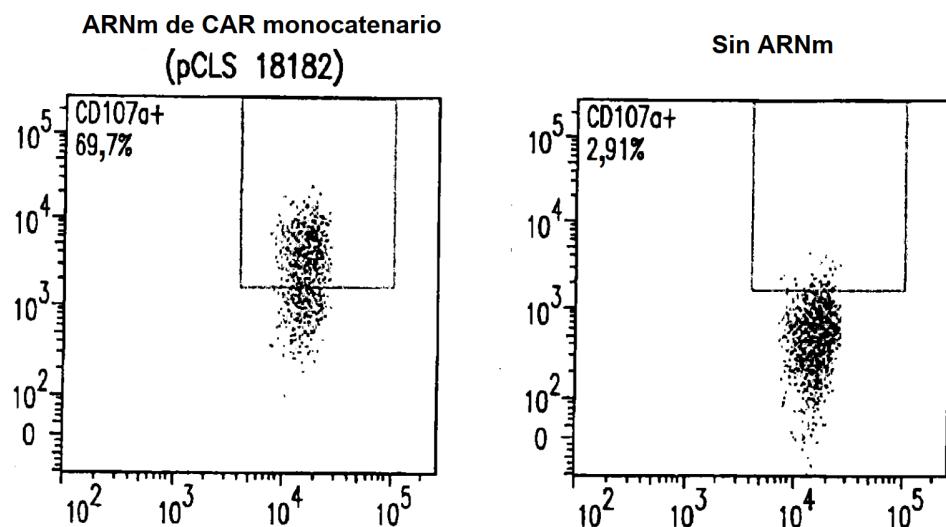


Fig.20B

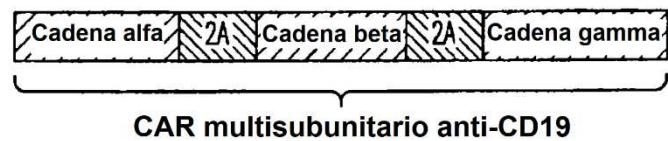
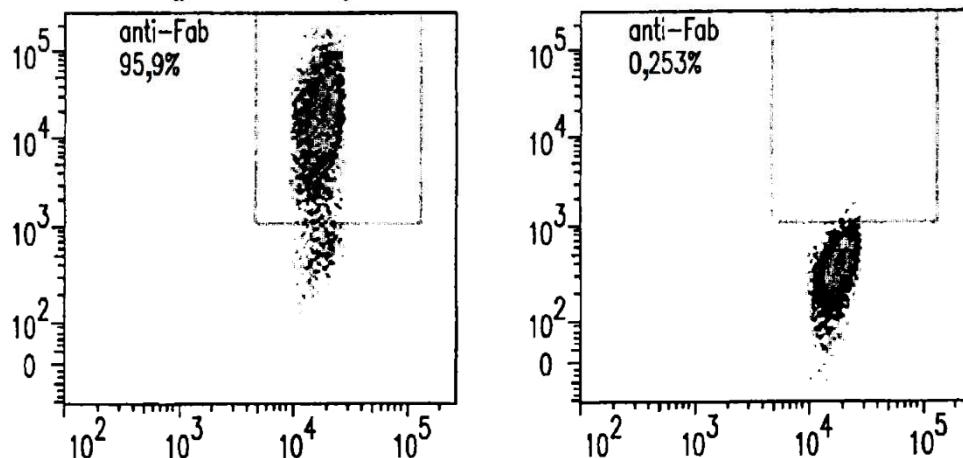


Fig.21A

ARNm de CAR multisubunitario
(pCLS 22370)



Sin ARNm

ARNm de CAR multisubunitario
(pCLS 22370)

Sin ARNm

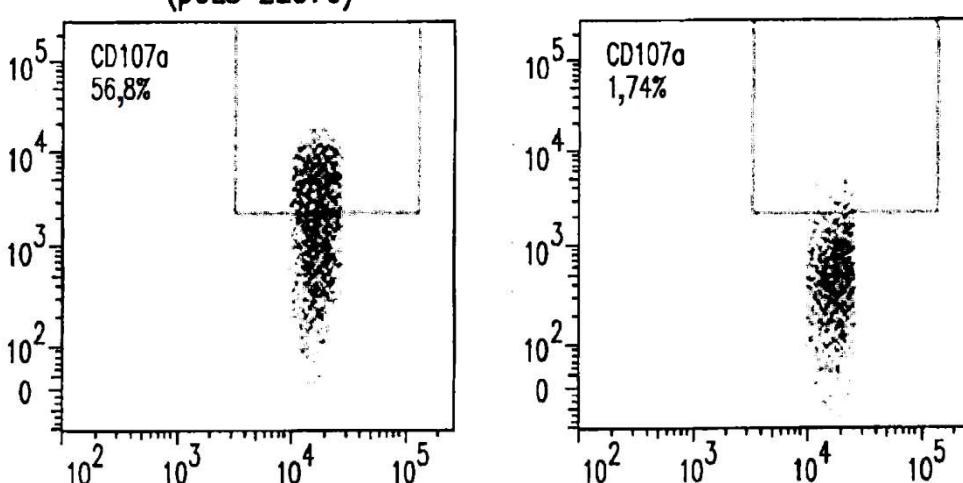


Fig.21C

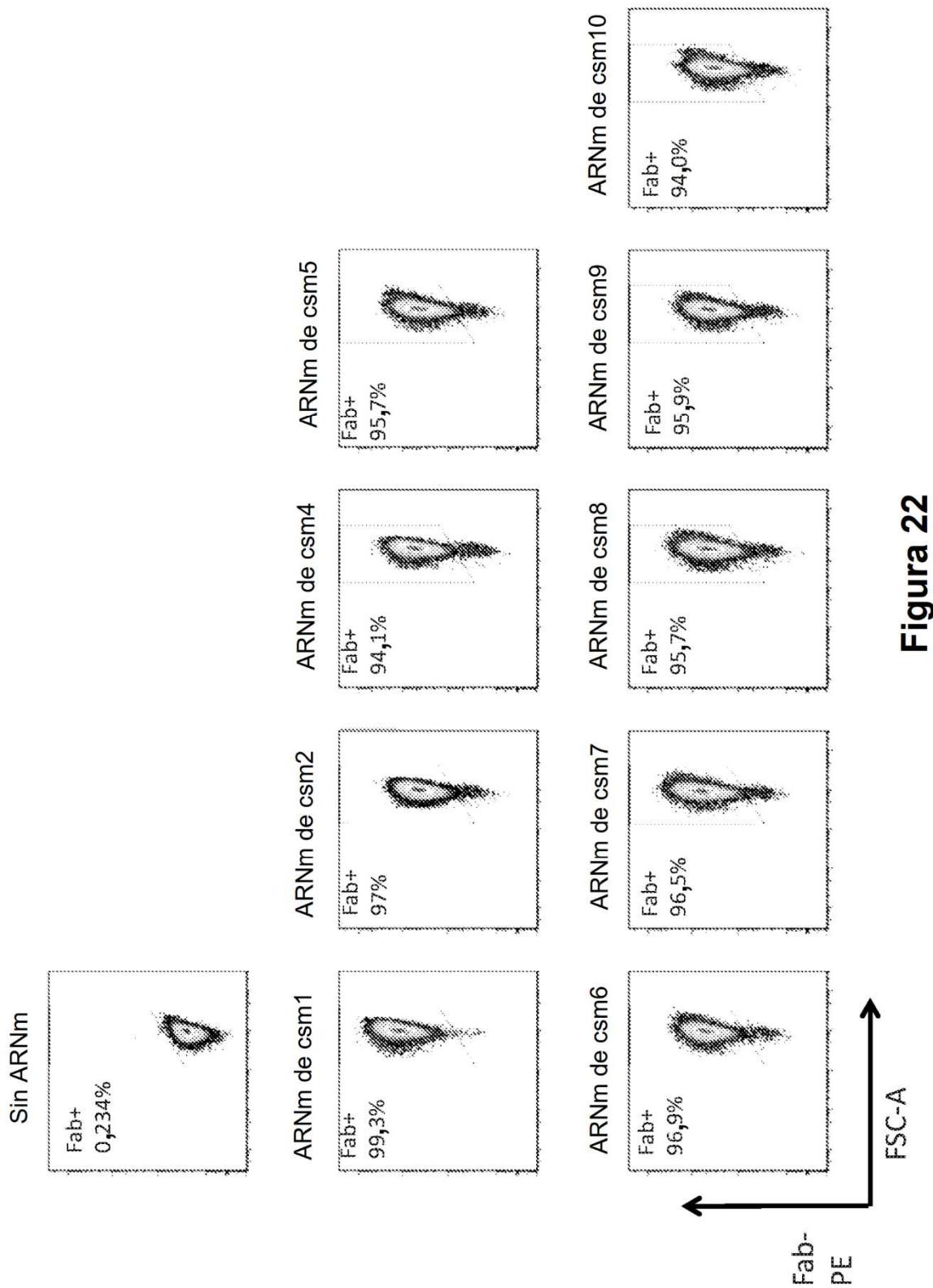


Figura 22

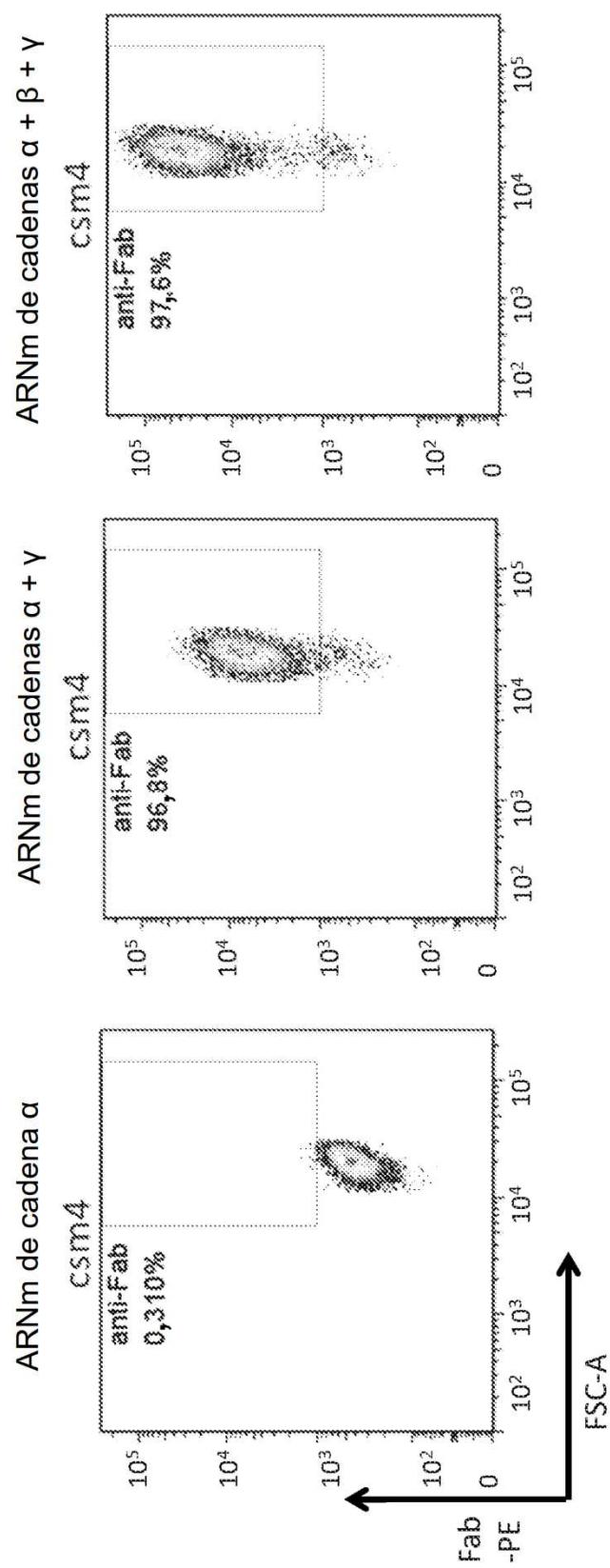
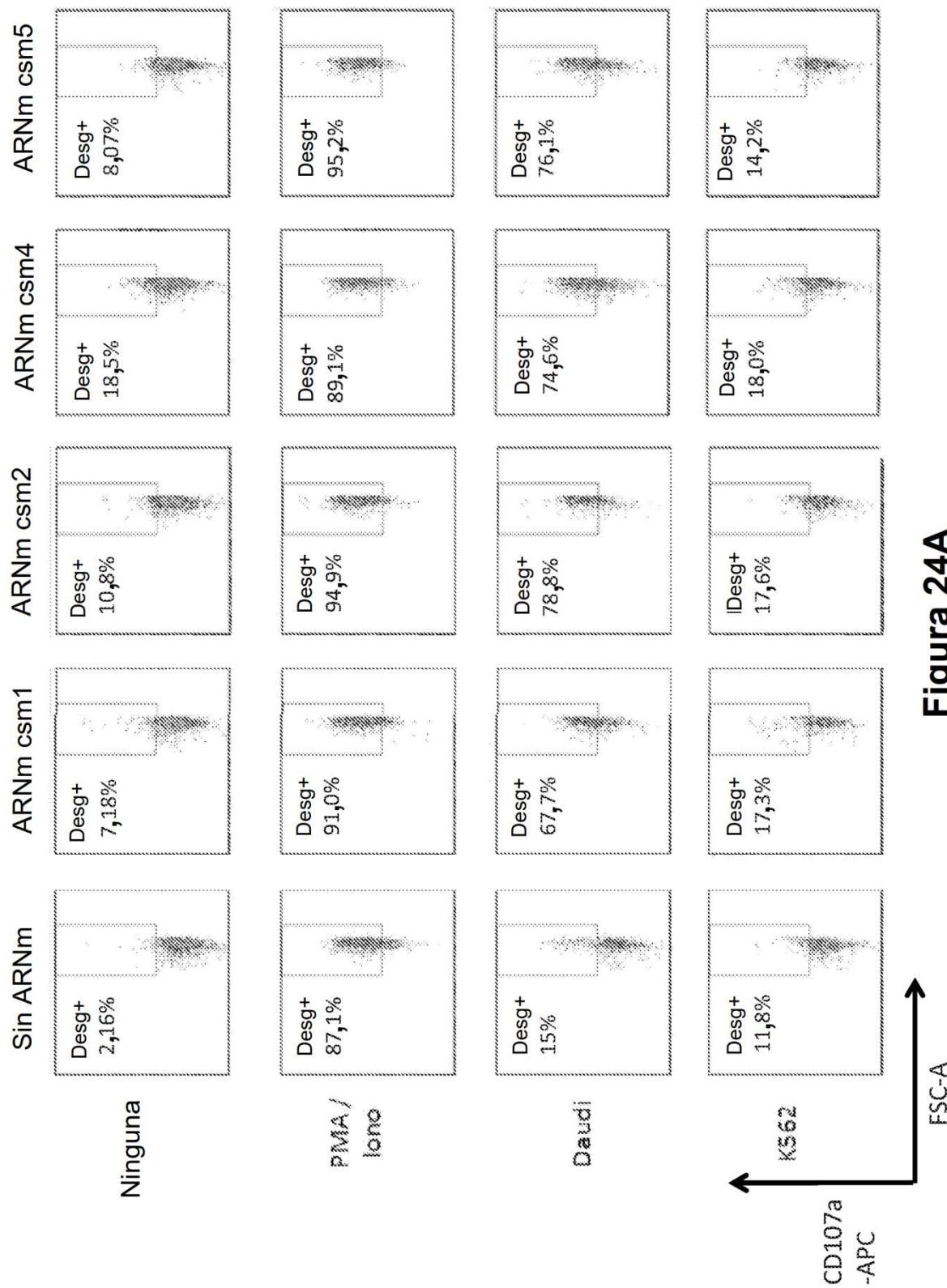
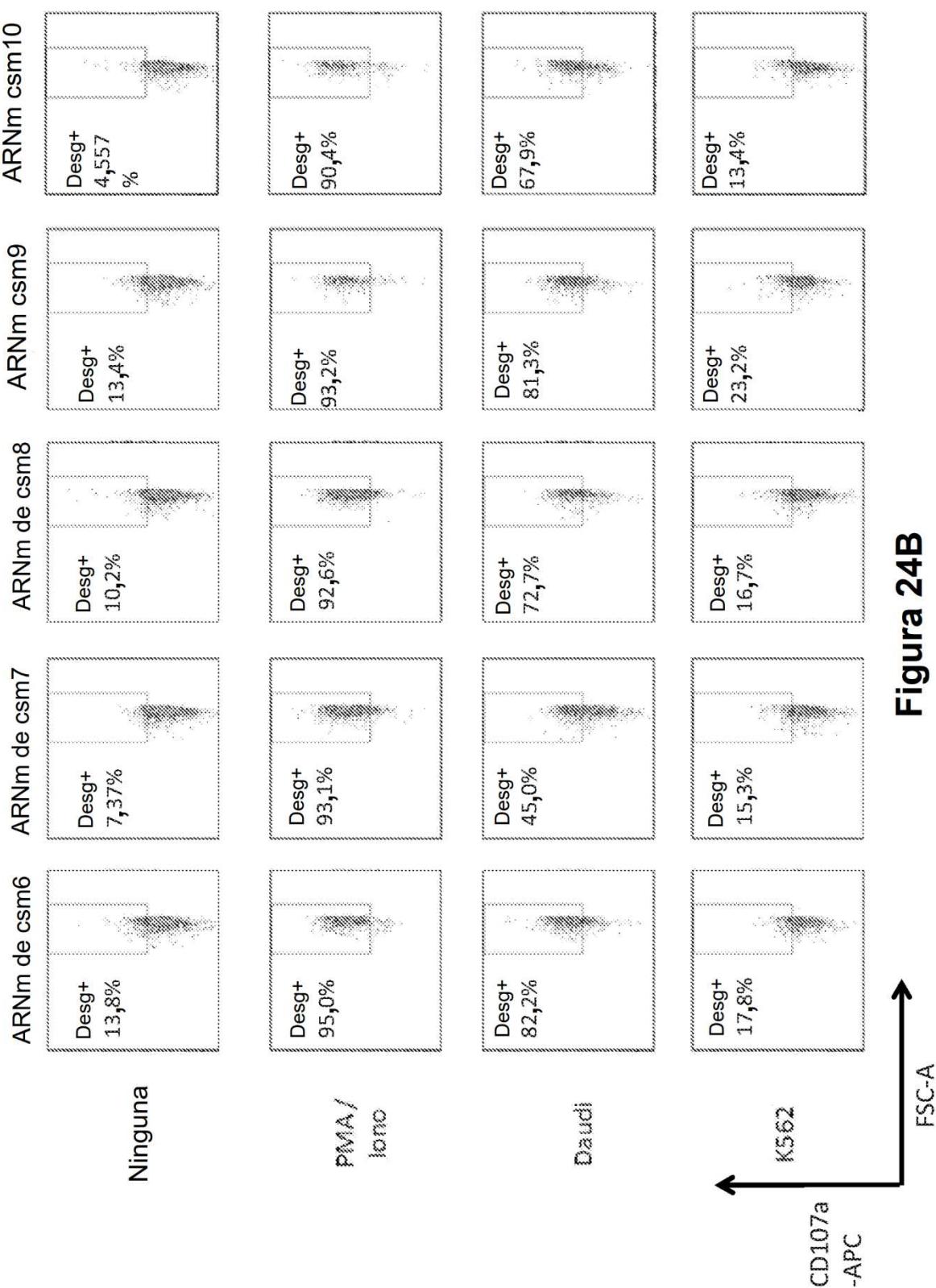
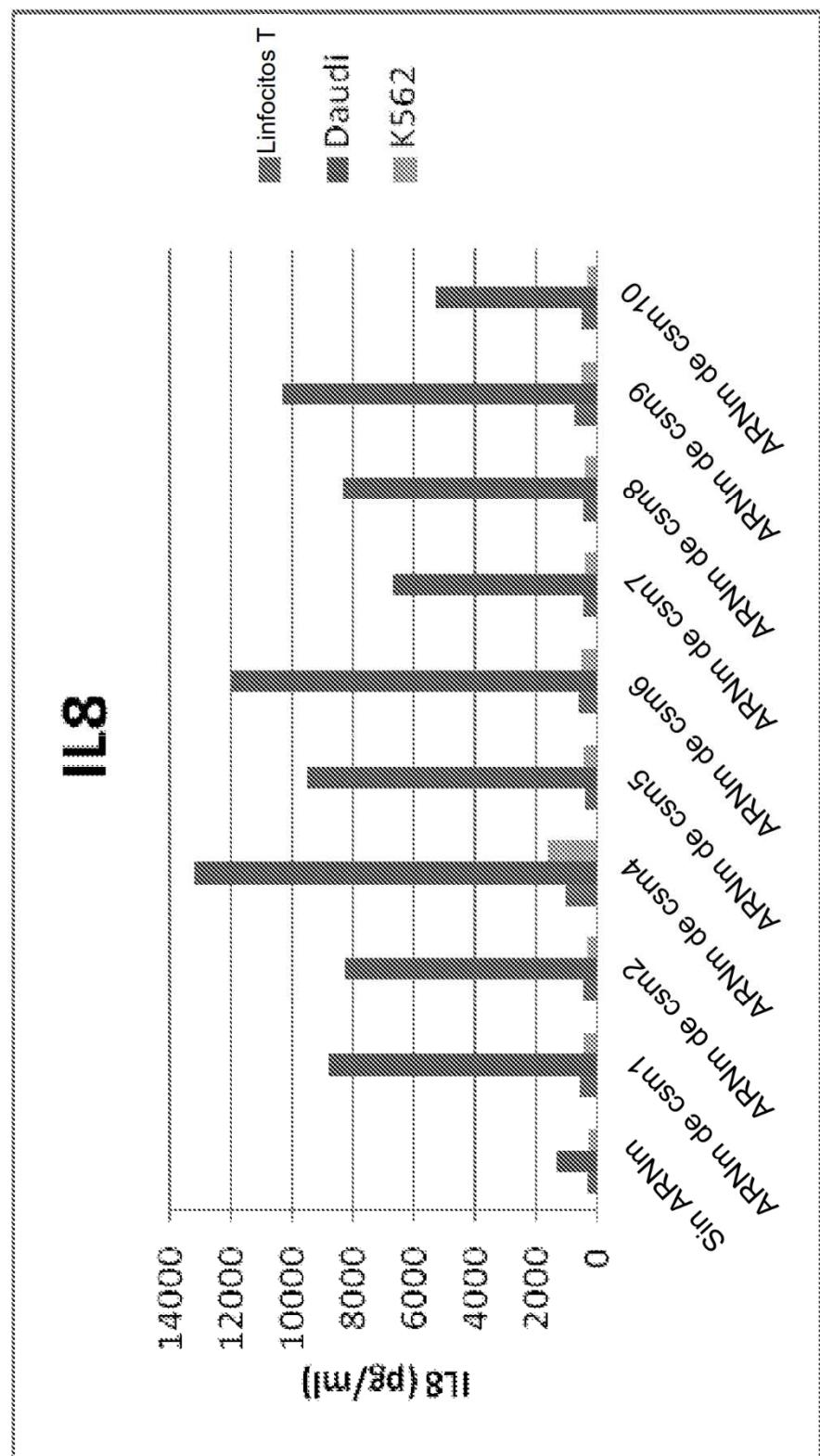


Figura 23





**Figura 25A**

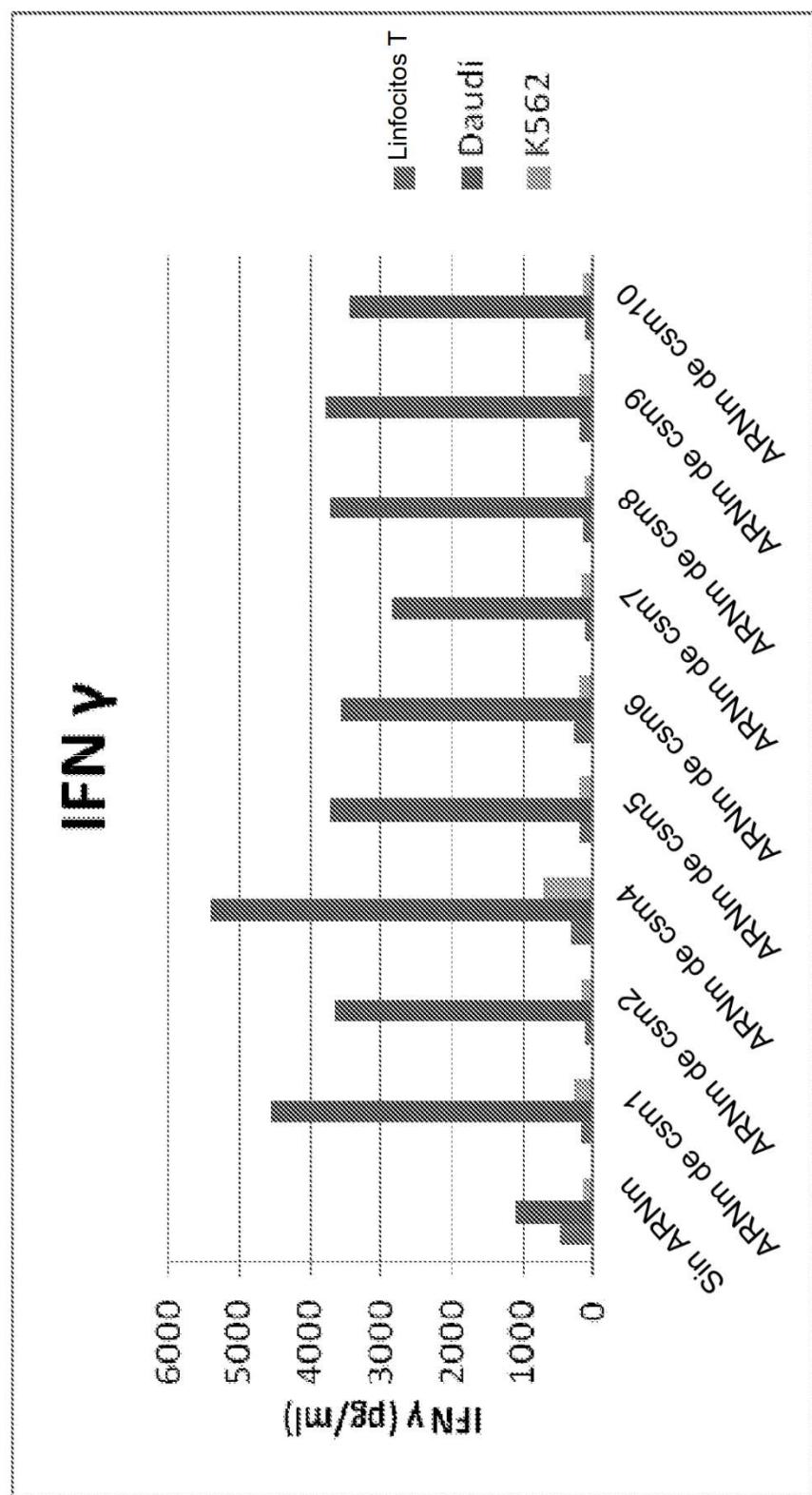
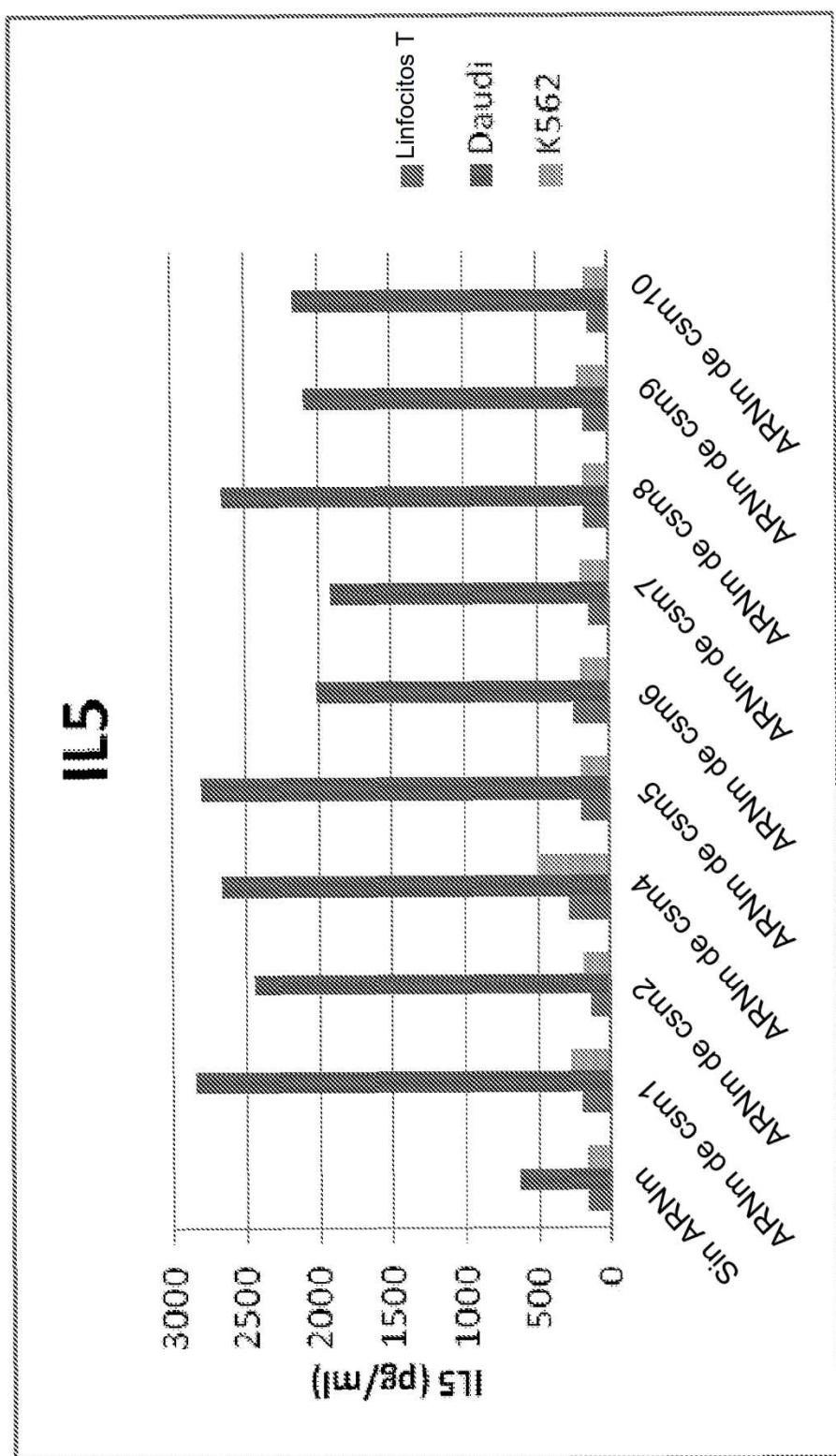


Figura 25B

**Figura 25C**

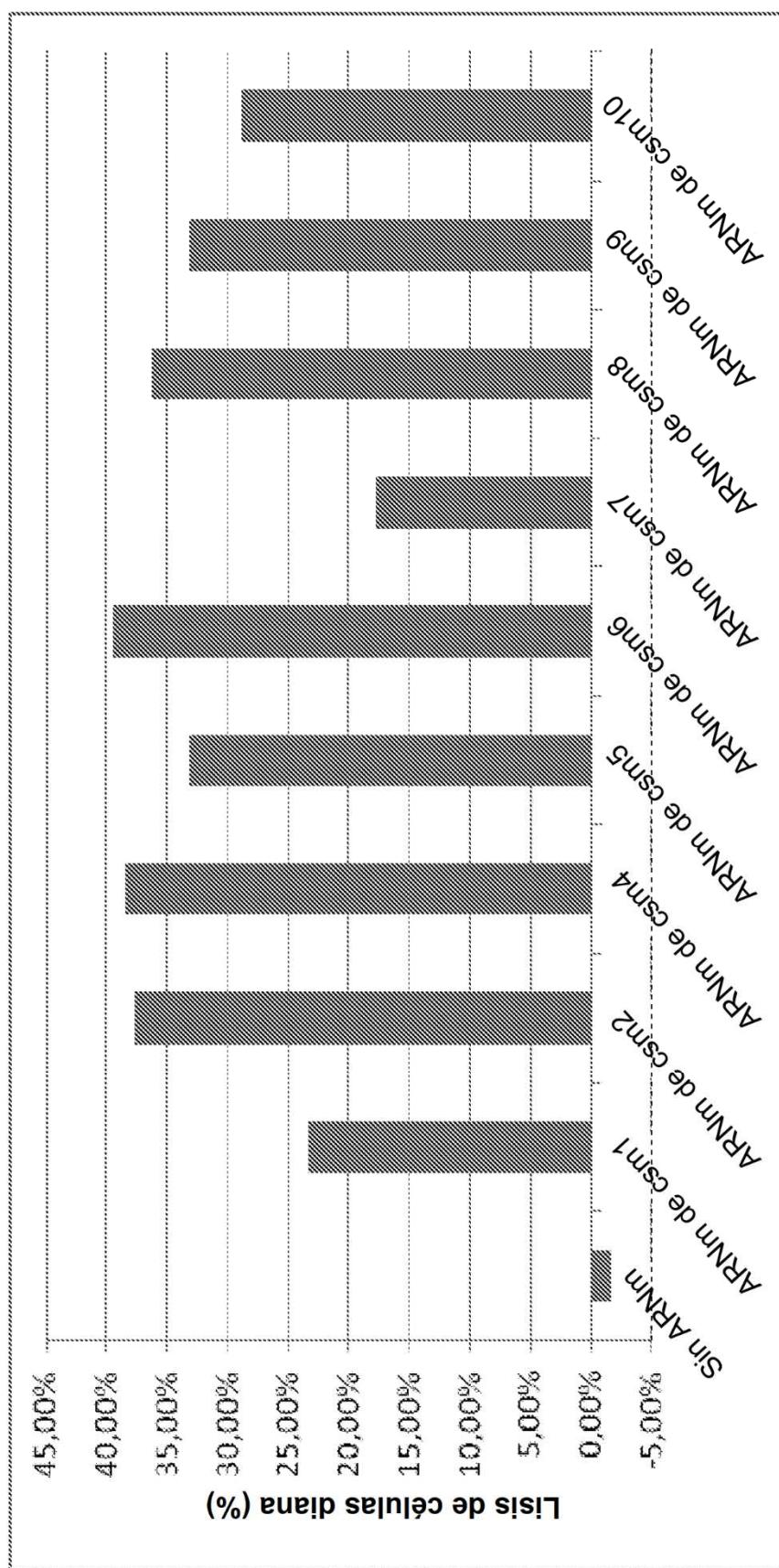
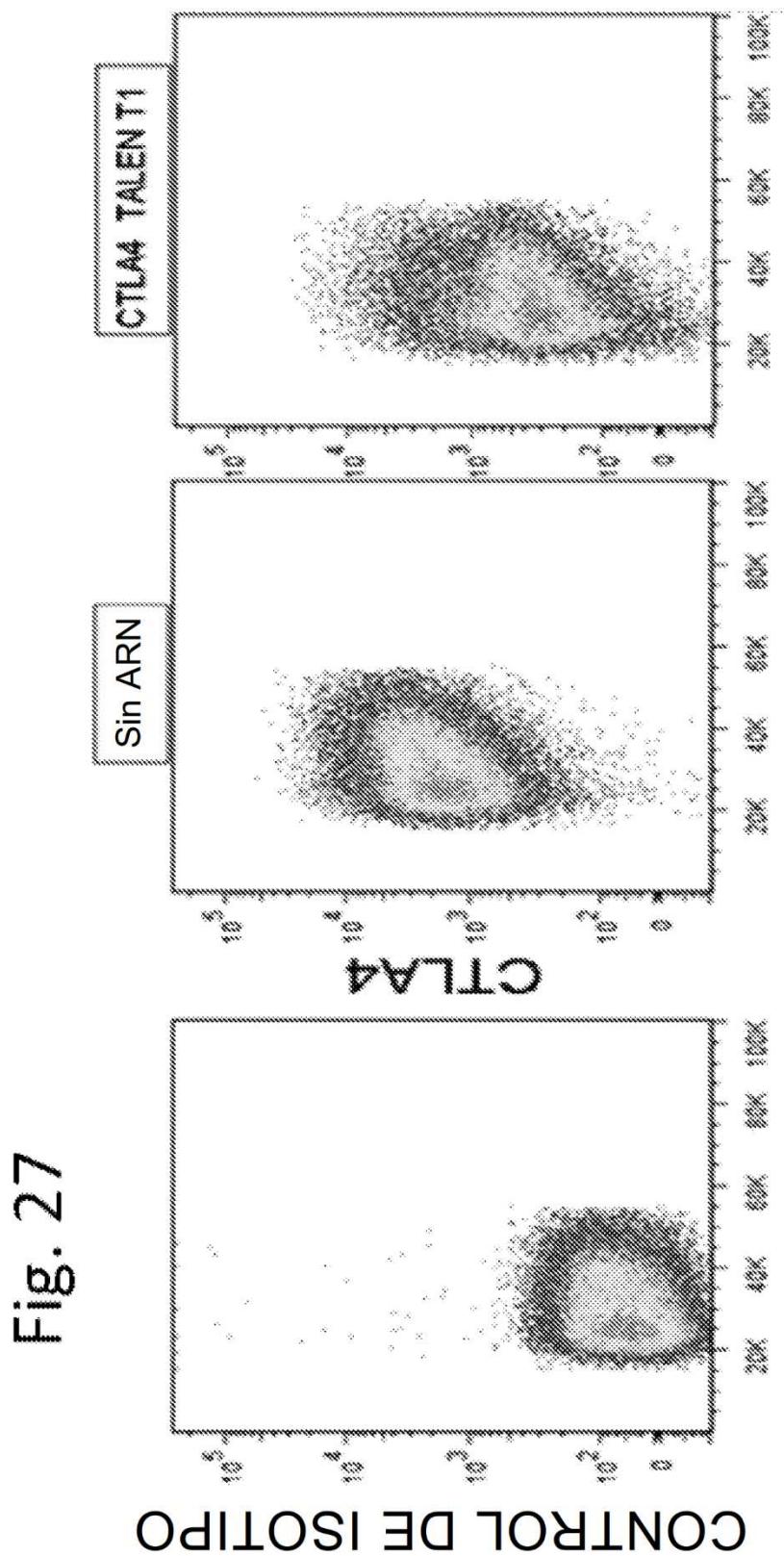
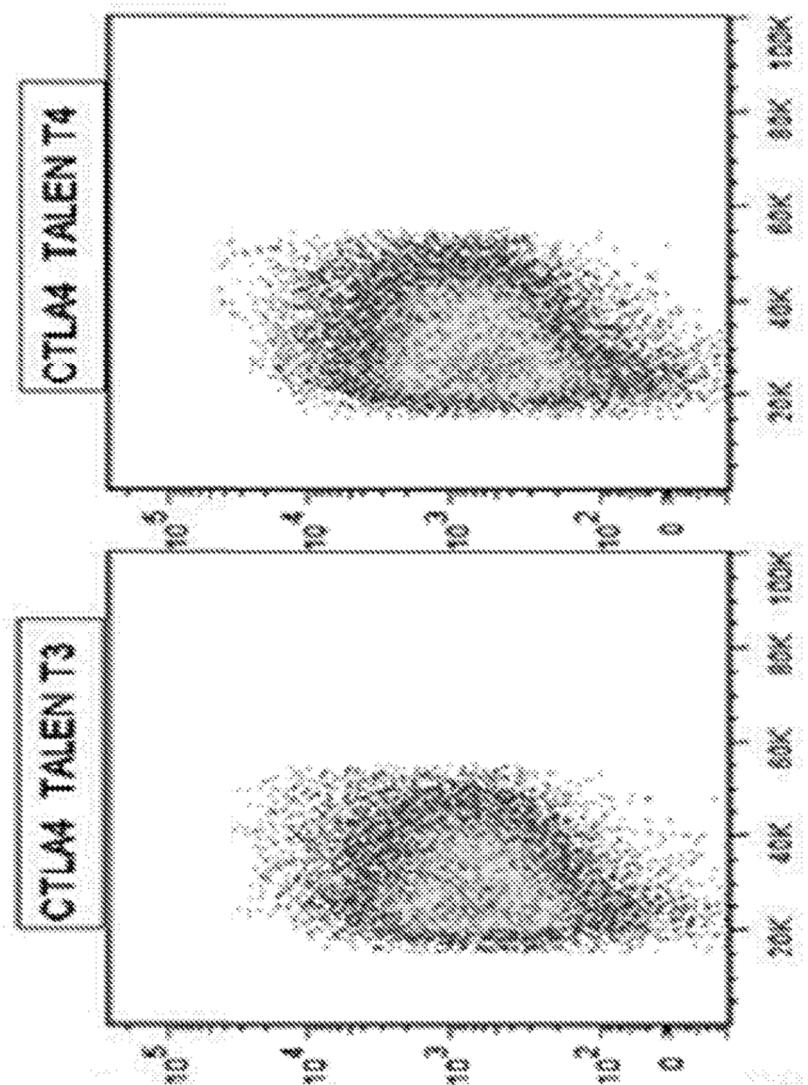


Figura 26





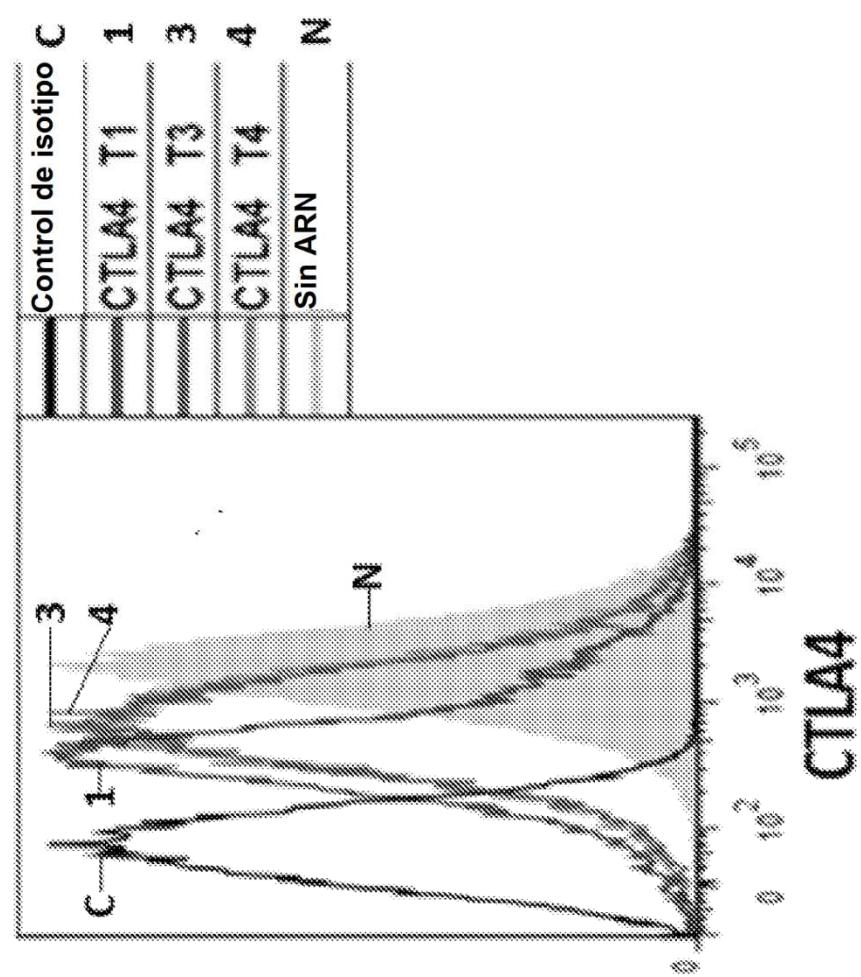


Fig. 28

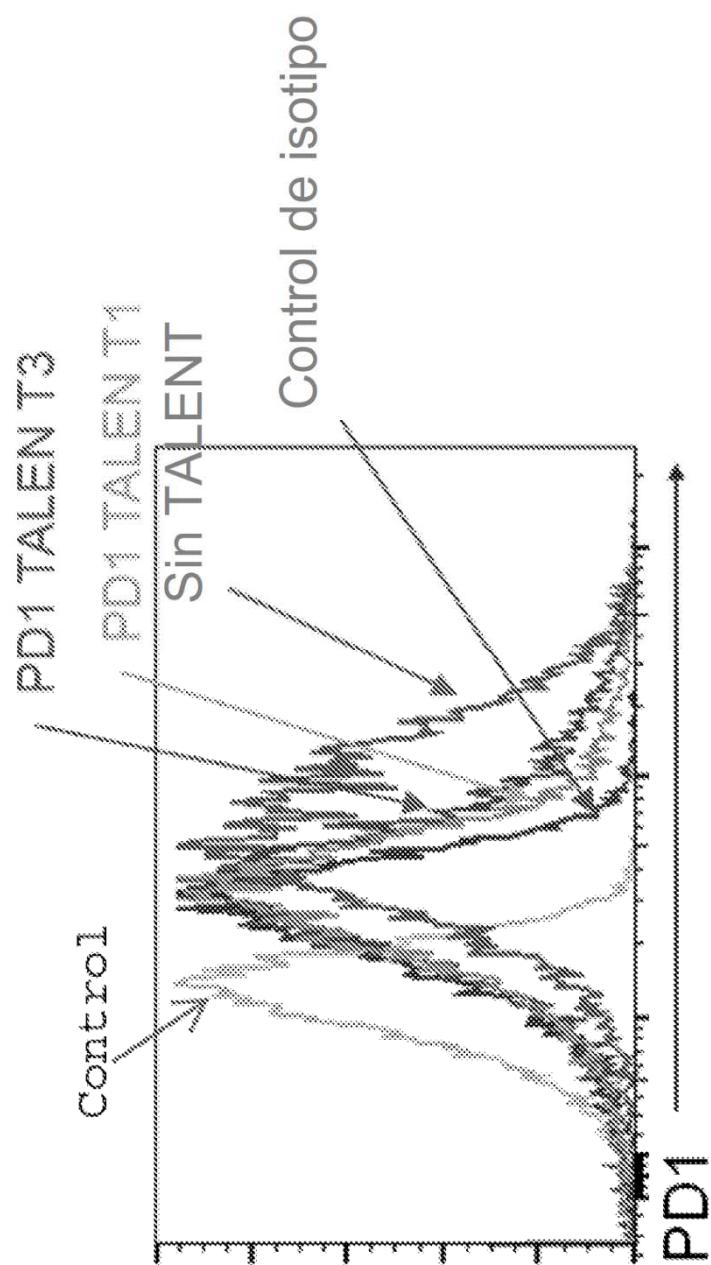


Fig. 29

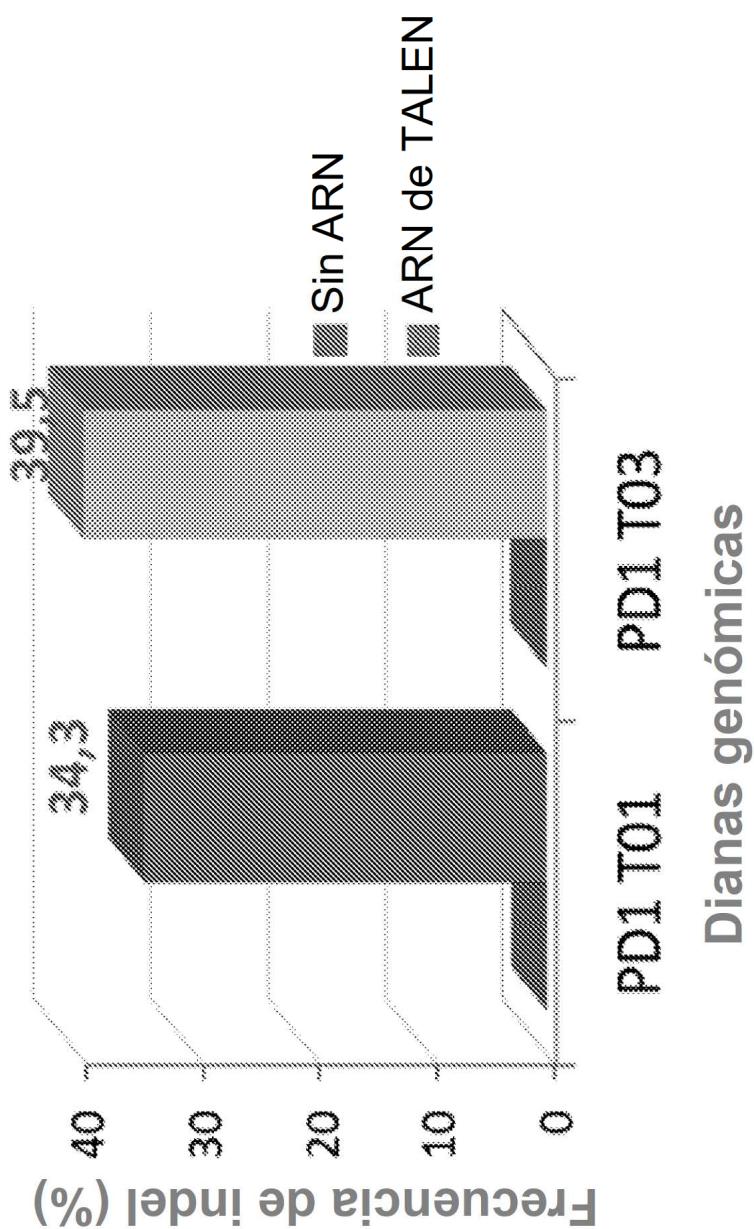


Fig. 30

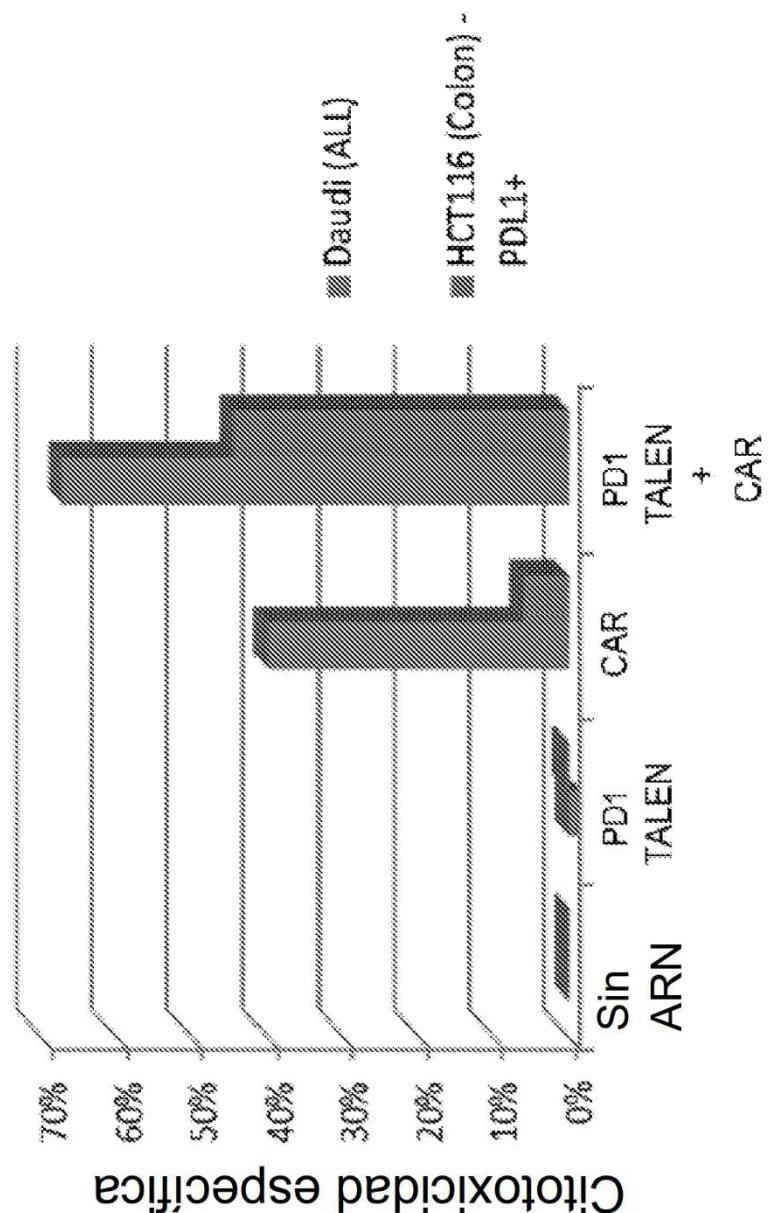


Fig. 31