

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:

GALETTO, 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 infrecuente 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 ("pTalfa") y derivados funcionales de los mismos, receptor quimérico 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.

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.

Se han generado con éxito especificidades novedosas en linfocitos T mediante la transferencia genética de receptores de linfocitos T transgénicos o receptores quiméricos 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).

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 yuxtamembranarias 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 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, divulgan la eliminación de TCR endógeno en linfocitos T CAR.

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 precondicionamiento (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 citoplásmica 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 inhibitoras que ajustan la respuesta inmunitaria. Las señales inhibitoras 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 inhibitoras 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 inhibitorios en linfocitos T incluyendo CTLA4 y muerte programada-1 (PD-1) son ejemplos de agentes dirigidos que se evalúan en clínica.

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 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 funcional contra PD1 muestra algunos casos de regresión tumoral (Brahmer, Drake *et al.* 2010). Múltiples proteínas de punto de control inmunitario adicionales representan dianas prometedoras para bloqueo terapéutico basándose en estudios recientes.

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 del locus TCRbeta expresan una cadena de TCRbeta funcional que se empareja con una cadena preTalfa 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 TCRalfa (von Boehmer 2005). Después de reordenaciones de TCRalfa productivas y sustitución de pTalfa por TCRalfa para formar un TCR maduro, los timocitos experimentan una segunda etapa de selección, denominada selección positiva o de TCRalfa/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 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.

Debido a la naturaleza de la selección de cadenas de TCRbeta mediante emparejamiento con preTalfa durante el desarrollo tímico, en linfocitos T en los que se ha inactivado TCRalfa, la introducción heteróloga del transgén de pTalfa 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 TCRalfa. 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 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 pTalfa-TCRbeta se asocian (Pang, Berry *et al.* 2010).

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 permita 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 TCRalfa o TCRbeta acoplada con inactivación de genes que codifican proteína del punto de control inmunitario, tales como PD1 y CTLA-4.

En particular, la inactivación de TCRalfa 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.

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.

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 preTalfa 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 antígenos asociados con tumor independientes de MHC. En particular, la invención se refiere a un CAR multicatenario, en que se colocan dominios coestimuladores 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 reemplazando 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 reemplaza 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 pTalfa o variante funcional del mismo en los linfocitos T genomodificados. El pTalfa o variante funcional del mismo usado puede ser pTalfa 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 preTalfa 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 pTalfa o una variante funcional del mismo, acoplando, por tanto, la especificidad hacia los antígenos 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 pTalfa 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.

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.

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

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

Figura 3: Representación esquemática de CAR multcatenarios.

Figura 4: Esquema de diferentes versiones de CAR multcatenarios. A. Esquema del receptor FcεRI. B-C Diferentes versiones de CAR multcatenarios (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.

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

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.

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.

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).

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

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

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

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.

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

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.

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 pTα-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-pTα-Δ48 (pTα-A48), vector lentivírico BFP-2A-pTα-Δ48.41BB (pTα-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 pTalfa-Δ48 (pTαΔ48) 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 pTalfa-Δ48.41BB (pTα-Δ48.BB) y pTalfa de longitud completa (pTα-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 IFNγ. C: liberación de IL5.

Figura 26: Los linfocitos T humanos que expresan transitoriamente los CAR multicatenarios (construcciones scm1 a csm10) lisan 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 PD1 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.

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 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
 - 35 - un segundo gen que codifica un componente del receptor de linfocitos T (TCR);
- (b) introducir en dicha uno o más linfocitos T un receptor quimérico 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.

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 coinhibidor, 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 coinhibidores	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
Muerte celular	TNFRSF10B (CD262)	8795
	TNFRSF10A (CD261)	8797
	CASP3	836
	CASP6	839
	CASP7	840
	CASP8	841
	CASP10	843
	Arhgap5 (GFI2)	394
	Akap8i	10270
	FADD (GIG3)	8772
	FAS(RP11)	355
	Stk17b (DRAK2)	9262
Señalización de citocinas	TGFBRII (AAT3)	7048
	TGFBRI	7046
	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>	Genes que pueden inactivarse en la ruta	ID del gen de la base de datos del NCBI (<i>Homo sapiens</i>) el 13 de mayo, 2014
	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
	EIF2AK4 (GCN2)	440275
Falta de arginina/triptófano	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
	Entpd1 (CD39)	953
Treg inducida	PRDM1 (blimp1)	12142
	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
Factores de transcripción que controlan el agotamiento/anergia	GUCY1A2	2977
	GUCY1A3	2982
	GUCY1B2	2974
	GUCY1B3	2983
Tolerancia mediada por hipoxia		

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 microhomología (Ma, Kim *et al.*, 2003). La reparación mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) a menudo da como resultado pequeñas inserciones o deleciones, 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 técnica.

En una realización particular, 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;
- (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:

- 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.

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:
 - 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.

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.

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).

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 (TCR α), SEQ ID NO: 38 o 39 (TCR β). 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.

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 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 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 desoxinucleotidilo 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, 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 química 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 genes del punto de control inmunitario, TCR α y TCR β 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, la inactivación de genes del grupo que consiste en genes del punto de control inmunitario, TCR α y TCR β 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 genes del punto de control inmunitario, TCR α y TCR β , 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 genes del punto de control inmunitario, TCR α y TCR β . 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 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.

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 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.

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

(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 genes del punto de control inmunitario, TCR alfa y TCR beta;

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

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),
- SEQ ID NO: 37, 57 a 60 (TCRalfa), y
- SEQ ID NO: 38 o 39 (TCRbeta),

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.

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.

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.

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

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.

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:

(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, 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.

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;
- (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:
- 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 génico 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 tacrólimus o fujimicina. En otra realización de la divulgación, dicho miembro génico 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 génico 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 (TCRalfa),
- 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 desoxinucleotidilo 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 homólogas 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.

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 multcatenario, un anticuerpo biespecífico o endonucleasa de sitio de corte infrecuente dirigida a PDCD1 o CTLA-4 como se describe en la presente divulgación.

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

(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.

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 (TCRalfa),

- 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.

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.

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.

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

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.

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.

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

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 preTCR α) 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:

a) transformar dichas células con ácido nucleico que codifica al menos un fragmento de pTalfa para mantener la expresión en superficie de CD3

b) expresar dicho pTalfa en dichas células

c) expandir dichas células opcionalmente, opcionalmente a través de estimulación del complejo CD3.

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.

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.

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 de secuencia de aminoácidos del péptido mediante mutaciones en el ADN que codifica el péptido. Dichas variantes funcionales incluyen, por ejemplo, deleciones de, o inserciones o sustituciones de, residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. También puede realizarse cualquier combinación de deleción, 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 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, 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).

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 SEQ ID NO: 124.

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.

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.

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, genomificando un

linfocito T de tal manera que no exprese ningún TCR alfa funcional en su superficie celular o genomificando un linfocito T de modo que produzca muy poca cadena alfa de TCR funcional en su superficie o genomificando 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 infrecuente 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 infrecuente 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.

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 genomificar 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 multcatenario, particularmente un CAR multcatenario que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 125, un anticuerpo biespecífico, endonucleasas de sitio de corte infrecuente 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 infrecuente dirigida a una diana para un agente inmunosupresor como se describe en la presente divulgación.

25 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 infrecuente. En una realización preferida de la divulgación, dicha endonucleasa de sitio de corte infrecuente es una nucleasa TALE.

40 Receptor quimérico de antígenos (CAR) multcatenario

En otra realización, la divulgación se refiere a un receptor quimérico de antígenos (CAR) multcatenario particularmente adaptado a la producción y expansión de linfocitos T genomificados de la presente divulgación. El CAR multcatenario 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 citoplásmica 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 intracitoplásmica 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 Un ejemplo de CAR tetramérico se ilustra en la figura 3. Se representan diferentes versiones de CAR multcatenarios en la figura 4. Un ejemplo de CAR multcatenario 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, deleciones de, o inserciones o sustituciones de, residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. También puede realizarse cualquier combinación de deleción, 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.

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.

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.

En una realización preferida de la divulgación, dicha cola citoplasmática C terminal del fragmento de la cadena alfa, beta y/o gamma de FcεRI comprende además motivos de unión al factor 2 asociado a TNFR (TRAF2). En una realización mucho más preferida de la divulgación, dicha cola citoplasmática C terminal de la cadena alfa, beta y/o gamma de FcεRI se reemplaza por la cola intracitoplásmica de un miembro de la familia de TNFR coestimulante. La cola citoplásmica del miembro de la familia de TNFR coestimulante contiene motivos de unión a TRAF2 que consisten en el motivo conservado mayor (P/S/A)X(Q/E)E o el motivo conservado menor (PXQXXD), en el que X es cualquier aminoácido. Se reclutan proteínas TRAF a las colas intracelulares de muchos TNFR en respuesta a trimerización del receptor.

En otra realización preferida de la divulgación, dicho dominio intracitoplásmico de la cadena alfa, beta y/o gamma de FcεRI se reemplaza por el dominio intracitoplásmico de la cadena zeta de TCR (también llamado CD3 zeta). En otra realización preferida de la divulgación, dicho dominio intracitoplásmico de la cadena alfa, beta y/o gamma de FcεRI comprende al menos un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM) adicional. Los ITAM son motivos de señalización bien definidos hallados en la cola intracitoplásmica de diversos receptores que actúan como sitios de unión para tirosina quinasas de clase syk/zap70. Ejemplos de ITAM usados en la invención incluyen los derivados de TCRzeta, FCRgamma, FCRbeta, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d.

Como ejemplo no limitante, se ilustran diferentes versiones de CAR multcatenario en la figura 4.

En una realización preferida de la divulgación, el CAR multcatenario comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 125. La presente divulgación 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: 125.

También se describen en el presente documento, polinucleótidos, vectores que codifican el CAR multcatenario descrito anteriormente.

En una realización particular abarcada, la divulgación se refiere a un método de preparación de linfocitos T para inmunoterapia, que comprende introducir en dichos linfocitos T los diferentes polipéptidos que comprenden dicho CAR multcatenario y expandir dichas células.

En otra realización de la divulgación, dicho método comprende además una etapa de modificación genética de dichas células inactivando al menos un gen que expresa un componente del TCR y/o una diana para un agente inmunosupresor. En una realización preferida, dicho gen se selecciona del grupo que consiste en TCRalfa, TCRbeta, CD52 y GR. En una realización preferida de la divulgación, dicho método comprende además introducir en dichos linfocitos T una endonucleasa de sitio de corte infrecuente que pueda inactivar selectivamente por escisión de ADN dichos genes. En una realización más 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 (TCRalfa), SEQ ID NO: 38 o 39 (TCRbeta), y SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 61 a SEQ ID NO: 65 (CD52).

En una realización particular de la divulgación, dicho método 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, un anticuerpo

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 multcatenario.

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 distintas propiedades antigénicas 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 multcatenario 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 multcatenario 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 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 aminoácido. 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 multcatenario.

- 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 Collectis) 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:

(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);

(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

(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:

(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);

(b) un impulso eléctrico con un intervalo de voltaje de 2250, 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

(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.

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.

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 quimérico de antígenos, al menos un componente del receptor quimérico de antígenos multicatenario, un pTalfa o variante funcional del mismo, un ácido nucleico exógeno, un dominio catalítico adicional.

Activación y expansión de linfocitos T

Ya sea antes o después de la modificación genética de los linfocitos T, los linfocitos T pueden activarse y expandirse en general usando métodos como se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20060121005. Los linfocitos T pueden expandirse *in vitro* o *in vivo*.

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.

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 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-g, 1L-4, 1L-7, GM-CSF, -10, -2, 1L-15, TGFp y TNF- o cualquier otro aditivo para el 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 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 estreptomina, 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 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.

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 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 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 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 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 TCR beta y/o expresa un CAR, un CAR multcatenario 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 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 multcatenario 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 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:

- (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
10 contra hospedador (GvHD); por lo tanto, en el presente documento también se describe 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.

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 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
35 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 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
50 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
10 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
15 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
20 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 antiviral, cidofovir e interleucina-2, El tratamiento
25 con citarabina (también conocido como ARA-C) o natalizimab para pacientes con EM o tratamiento con efalizimab 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 inmunosupresores 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.*, Citr. 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
45 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.
- 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
65

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.

b) Transducir dichas células con CAR multcatenarios 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 multcatenario derivado de FcεRI 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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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 funcionalizarse 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 bicatenarios.

- 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 región de homología con secuencias en dirección 3' de dicha rotura bicatenaria" 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 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.
- 10
- 15 - 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 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 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.
- 20
- 25 - Por receptor quimérico 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 generar una proteína quimérica 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
- 30
- 35 - 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 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.
- 40
- 45 - 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 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.
- 50
- 55

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, 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
- 10 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
- 15 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.
- 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.
- 20 - Por "célula" o "células" se entiende cualquier célula viva eucariota, células primarias y líneas celulares derivadas de estos organismos para cultivos *in vitro*.
- 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
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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
- 40 ejemplos no limitantes.
- por "mutación" se entiende la sustitución, delección, inserción de hasta uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, veinte, veinticinco, treinta, cuarenta, cincuenta o más
- 45 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.
- 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
- 50 secuencia de aminoácidos de la molécula original.
- 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
- 55 propiedades adicionales, o actividad más alta o más baja.
- 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),
- 60 opcionalmente intrones, una región no traducida en 3'. El gen puede comprender además un terminador, potenciadores y/o silenciadores.
- 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
- 65 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
- 10 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, Smih *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 quimérica de dedos de cinc (ZFN) resultante de la fusión de dominios de dedos de cinc
- 15 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.
- 25 Las endonucleasas de sitio de corte infrecuente también pueden ser, por ejemplo, nucleasas TALE, una nueva clase de nucleasas quiméricas que usan un dominio catalítico de FokI y un dominio de unión a ADN derivado del efector 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
- 30 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.
- 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 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 efector 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
- 50 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 dirresiduos 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
- 60 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
- 65

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™ (Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 París, Francia).

- 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.
- 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.
- "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.
- "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 "positivos" 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.
- "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 linfotóxina 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 coestimulante 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, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, un ligando que se une específicamente con CD83.

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.

- "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 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.

- 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 interactuar 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 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.

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.

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.

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.

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

Ejemplo 1: Nucleasas TALE que escinden el gen GR humano

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 semidianas) separadas por un espaciador de 15 pb.

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	TATTCAGTATGGACTC 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	TGCCTGGTGTGCTCTGA 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 AGTCTTAACTTGTGGAA (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 agactcaacttgag 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 CTCAACTTGGAGGATCA (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

10 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

15 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

25 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	Gre2-L TALEN	1	1
	Gre2-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 deleciones en el locus genómico diana.

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'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG-3' (secuencia adaptadora directa)- 10N (TAG)- secuencia directa específica de locus para el exón 2 de GR: 5'-GGTTCATTTAACAAGCTGCC-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'-TCAGCAGGCCACTACAGGAGTCTCACAAG-3' (SEQ ID NO: 33) y el cebador inverso 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGCCAGTCTCAG-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'-GGGCTTTGCATATAATGGAA-3' (SEQ ID NO: 35) y para el exón 5 de GR: 5'-CTGACTCTCCCCTTCATAGTCCCCAGAAC-3' (SEQ ID NO: 36).

30 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 deleción específicos del sitio. La tabla 4 indica el porcentaje de las secuencias que mostraban inserciones o deleciones 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.

35 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 deleciones 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 transfirieron 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 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.

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)**

30 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.

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	TTGTCCACAGATATCC 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	TGTGTTTGAGCCATCAG 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 tgtgtttgagccatca GAAGCAGAGATCTCCCA (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 cagcctcctggttat 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	TTTAGAAAGTTCCTGTG atgtcaagctggtcg AGAAAAGCTTTGAAACA (SEQ ID NO: 57)
TRAC_T03	TCCAGTGACAAGTCTGT ctgcctattcaccga TTTTGATTCTCAAACAA (SEQ ID NO: 58)
TRAC_T04	TATATCACAGACAAAAC tgtgctagacatgag GTCTATGGACTTCAAGA (SEQ ID NO: 59)
TRAC_T05	TGAGGTCTATGGACTTC aagagcaacagtgc GTGGCCTGGAGCAACAA (SEQ ID NO: 60)
CD52_T01	TTCCTCTTCCTCCTAC caccatcagcctcct TTACCTGTACCATAAC (SEQ ID NO: 61)
CD52_T04	TTCCTCCTACTACCA cagcctcctgg TCTTACCTGTACCATA (SEQ ID NO: 62)

(continuación)

Diana	Secuencia diana
CD52_T05	TCCTACTCACCATCAG ctcctggttat TTGCTCTTACCTGTAC (SEQ ID NO: 63)
CD52_T06	TTATCCCACTTCTCCT ctacagatacaaact TTTTGTCTGAGAGTC (SEQ ID NO: 64)
CD52_T07	TGGACTCTCAGGACAA acgacaccagccaaa TGCTGAGGGGCTGCTG (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 deleciones 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'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG (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'-AGAGCCCCTACCAGAACCAGAC-3' (SEQ ID NO: 68), o para TRBC2: 5'-GGACCTAGTAACATAATTGTGC-3' (SEQ ID NO: 69), y el cebador inverso 5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG (secuencia adaptadora inversa)- 20 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'-ACCAGCTCAGCTCCACGTGGT-3' (SEQ ID NO: 72). 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 deleción 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 deleciones 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 % (Cedarlane). 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). Después 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/TCRαβ negativas y las CD52 positivas/TCRαβ 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 TCRαβ. 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 gttttttcttctctt CATCCCTGTCTTCTGCA (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	TTTTCCATGCTAGCAAT gcacgtggcccagcc 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 cgtggcccagcctgc 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 GGACAACGCCACCTTCA (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 ctccctggcccccaa 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.

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 deleciones 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 utilizando los siguientes cebadores: 5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG (secuencia adaptadora directa)- 10N (TAG)- secuencia directa específica de locus para CTLA4_T01: 5'-CTCTACTTCCTGAAGACCTG-3' (SEQ ID NO: 99), para CTLA4_T03/T04: 5'-ACAGTTGAGAGATGGAGGGG-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'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG (secuencia adaptadora inversa)- secuencia inversa específica de locus endógena para CTLA4_T01: 5'-TGGAAATACAGAGCCAGCCAA-3' (SEQ ID NO: 103), para CTLA4_T03/T04: 5'-GGTGCCCGTGCAGATGGAAT-3' (SEQ ID NO: 104), para PDCD1_T01: 5'-GGCTCTGCAGTGGAGGCCAG-3' (SEQ ID NO: 105) o para PDCD1_T03: 5'-GGACAACGCCACCTTCACCT-3' (SEQ ID NO: 106).

Los productos de PCR se analizaron por ensayo no endonucleasa T7: en resumen, después de la desnaturalización y rehibridación 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 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 toda actividad nucleasa mutagénica en sus sitios diana.

Inactivación de CTLA4 en linfocitos T primarios:

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).

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).

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:

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).
- 15 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.

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 intracitoplásmica 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 deleccionaron 18, 48, 62, 78, 92, 110 y 114 aminoácidos del extremo C de la proteína (SEQ ID NO: 108 a SEQ ID NO: 114).

2) **Mutantes de pTalfa que contienen dominios de activación intracelulares:** Las variantes FL y $\Delta 48$ 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).

3) **Mutantes quiméricos de pTalfa/TCR α :** En una de las construcciones, el dominio intracelular TCR α (IC) se fusionó a una versión sin cola ($\Delta 114$) 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 TCR α (SEQ ID NO: 122).

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 pTalfa $\Delta 48$ y son:

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

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 transfectaron 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. La figura 12 es un ejemplo representativo de las eficacias de transfección (% de células BFP+) y la actividad de las construcciones de pTalfa FL, $\Delta 18$ and $\Delta 48$ 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	% CD3 _{BAJA}	DT
0	NEG	4,69	1,53
1	preTCR α -FL	31,18	4,15
2	preTCR α - $\Delta 18$	20,13	4,56
3	preTCRα-$\Delta 48$	44,86	3,90
4	preTCR α - $\Delta 62$	32,42	2,95
5	preTCR α - $\Delta 78$	24,75	3,87
6	preTCR α - $\Delta 92$	20,63	3,70
7	preTCR α - $\Delta 110$	18,18	3,49
8	preTCR α - $\Delta 114$	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 - $\Delta 48$ -CD8	11,56	6,01
13	preTCR α - $\Delta 48$ -CD28	12,22	4,72
14	preTCR α - $\Delta 48$ -41BB	35,93	4,55
15	preTCR α - $\Delta 114$ /TCR α .IC	3,94	1,95
16	preTCR α -EC/TCR α .TM.IC	17,80	4,47
17	preTCR α - $\Delta 48$ -1xMUT	26,88	4,37
18	preTCR α - $\Delta 48$ -4xMUT	7,59	1,06

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 preTalfa diferentes.

Actividad de pTalfa-FL y pTalfa- $\Delta 48$ 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).

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 instrumento CytoLVT-S (BTX-Harvard Harbour). Dos días después de la electroporación, se transdujeron 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 Biotec). Este protocolo experimental se representa en la figura 14A.

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 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 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.

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 generaron a partir de linfocitos T humanos primarios como se describe en la sección previa y en la figura 14A.

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).

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 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

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 estimó 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 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.

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

Determinación del programa de Cytopulse optimizado

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.

<i>Programa de cyto-pulse</i>	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

- 5 Se electroporaron 3 o 6 millones de células en cubeta de 0,4 cm de hueco (30 o 15×10^6 células/ml) con $20 \mu\text{g}$ 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 indica 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

- 10 Después 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 citoporción T (aparato BTX-Harvard) y se electroporaron en cubetas de 0,4 cm con $10 \mu\text{g}$ de ARNm que codifica GFP o $20 \mu\text{g}$ 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.

<u>Programa de cyto-pulse</u>	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).

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 transfectado de interés en la población celular.

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 electroporación.

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

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 posibilidad de modificar a voluntad la secuencia del gen.

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 transfectan en linfocitos T humanos primarios activados usando la tecnología Cytopulse. La secuencia de 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 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.

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

Se resuspendieron 5×10^6 linfocitos T preactivados varios días (3-5) con microesferas recubiertas anti-CD3/CD28 e IL2 en tampón T para citoparación 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.

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).

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.

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

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 multcatenario (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.

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.

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

- 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.
- 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.
- Ashwell, J. D. y R. D. Klusner (1990). "Genetic and mutational analysis of the T-cell antigen receptor". *Annu Rev Immunol* 8: 139-67.
- 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.
- Boch, J., H. Scholze, *et al.* (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors". *Science* 326 (5959): 1509-12.
- 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.
- 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.
- 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.
- Carrasso, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Christian, M., T. Cermak, *et al.* (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases". *Genetics* 186(2): 757-61.
- 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.
- Critchlow, S. E. y S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man". *Trends Biochem Sci* 23(10): 394-8.
- 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.
- 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.
- Geissler, R., H. Scholze, *et al.* (2011). "Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity". *PLoS One* 6(5): e19509.
- 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.
- Huang, P., A. Xiao, *et al.* (2011). "Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs". *Nat Biotechnol* 29(8): 699-700.
- Jena, B., G. Dotti, *et al.* (2010). "Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor". *Blood* 116(7): 1035-44.
- 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.

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.

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.

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.

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.

Moritz, 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., A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors". *Science* 326(5959): 1501.

Mussolino, C., R. Moritz, *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.

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., P. Duchateau (2007). "Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy". *Curr Gene Ther* 7(1): 49-66.

Pardoll, D., 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., G. H. Silva (2007). "Precision genome surgery". *Nat Biotechnol* 25(7): 743-4.

Porteus, M. H., D. Carroll (2005). "Gene targeting using zinc finger nucleases". *Nat Biotechnol* 23(8): 967-73.

Robert, C., C. Mateus (2011). "[Anti-CTLA-4 monoclonal antibody: a major step in the treatment of metastatic melanoma]". *Med Sci (Paris)* 27(10): 850-8.

Rouet, P., F. Smih, *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.

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.

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., 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.

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

<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
tgccctgggtgt gctctgatga agcttcagga tgtcattatg gagtcttaa 49

<210> 3
 <211> 49
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> GRex3T4

45 <400> 3
tgctctgatg aagcttcagg atgtcattat ggagtcttaa cttgtggaa 49

<210> 4
 50 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> GRex5T1

<400> 4
tgggtgtcact gttggaggtt attgaacctg aagtgttata tgcaggata 49

60 <210> 5
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> GRex5T2

5 <400> 5
tatgatagct ctgttccaga ctcaacttgg aggatcatga ctacgctca 49

<210> 6
<211> 49
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> GRex5T3

15 <400> 6
ttatatgcag gatatgatag ctctgttcca gactcaactt ggaggatca 49

<210> 7
20 <211> 530
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <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					

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 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

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 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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

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

<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 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 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 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 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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 9

<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición-GRex3T2-L1

<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 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 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 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 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 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 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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

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

<220>
<223> Repetición-GRex3T2-R1

<400> 10

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 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 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 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

				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	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	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	Gly	Arg	Pro	Ala
		515					520					525			
Leu	Glu														
	530														

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

<220>
 <223> Repetición-GReX3T4-L1

<400> 11

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	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	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	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	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	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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 12
<211> 530
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Repetición-GRex3T4-R1

<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

					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	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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

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

<220>
<223> Repetición-GRex5T1-LPT8-L1

<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

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	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	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 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 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

<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
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 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg	145	150	155
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
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 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 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

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

Leu Glu
530

<210> 15
<211> 530
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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 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 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 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 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 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 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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 16

<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición-GRex5T2-R1

<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

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 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 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 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 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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 17

<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición-GRex5T3-L1

<400> 17

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 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 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

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 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 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 Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu
530

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

10 <220>
 <223> Repetición-GRex5T3-R1

<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 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 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 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 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 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	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgcatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	caccgcgag	cgtagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgtaggcgtc	300
ggcaaacagt	ggcccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtcaac	480
ttgaccccg	agcaggtggg	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtctgtg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	720
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	960
ctggtgccc	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccaag	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatgg	gggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	1200
ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgacggcgct	gttgccggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccacgggc	1500
ttgacccccc	agcaggtggg	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560

acgggtccagc	ggctgtttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgtgtg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1740
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1920
caggtgggtg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgcctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggcctgcct	cgggcggtgt	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtcggagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaagtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggcggtctcc	2400
aggaaagccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctcccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactcgg	cggctacaac	ctgccatcg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	acccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 20
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN GReX2-R

<400> 20

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaaggtc	atcgataaagg	agaccgcccgc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgttcgacag	tggcgacga	ccacgaggca	180
ctggctggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcgg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcggtgt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgtcctaactt	gacccccag	cagggtgggtg	ccatcgccag	caatggcggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctggtgcggg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgtgtg	780
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	840
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccggag	1020
caggtgggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggcccccag	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	1260
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	1380
cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	1500
ctgtgcccagg	cccacggctt	gacccgggag	cagggtggtgg	ccatcgccag	ccagcatggc	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	1680
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtgca	ggcgctgttg	1800

ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtagccat	cgccagcaat	1860
aatggtggga	agcaggcgct	ggagacgggc	cagcggctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattggttgc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcgttggcc	gagttgacca	acgaccacct	cgtcgcttgc	2160
gcctgcctcg	gcgggctgcc	tgcgctggat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgcgccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tgcgccggaa	cagcaccacg	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccagc	ggcgccatct	acaccgtggg	ctcccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gtacaacct	gcccacgggc	2520
caggccgacg	aatgacagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gccgactgat	aa					2832

<210> 21
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN GRex3T2-L

<400> 21

atgggagatc	ctaaaaagaa	acgtaagggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgcgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgagc	caccacgagg	cactggctcg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagaggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgctc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gagggccttg	tcacgggtgg	ggagagattg	360
agagggtcac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgcctaac	480
ttgaccccc	agcagggtgg	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtggag	540
acgggtccagc	ggctgttggc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcagggtg	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtagccat	cgccagccac	720
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacgggc	cagcggctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	ggcaagcagg	cgctggagag	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgtgtgtcca	ggccacgggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggccacag	gcttgacccc	ccagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccccagcagg	tggtagccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggctgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgacccccg	agcagggtgg	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggag	1560
acgggtccagc	ggctgttggc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ccagcagggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtaggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
ccgggtgctgt	cgcaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtagccat	cgccagccac	1740
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacgggc	cagcggctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980

ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tgcacctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggcctgcct	cggcgggctg	2160
cctgcgctgg	atgcagtgaa	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctgggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacagg	gcaagcacct	gggcggctcc	2400
aggaagcccc	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccc	tgcactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggtacaac	ctgcccacat	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaa	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtaccctt	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggcgcgactg	ataa	2814

<210> 22

<211> 2832

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN GReX3T2-R

10

<400> 22

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgttaaggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgttcgacag	tggcgacgca	ccacgaggca	180
ctggctcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tgcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcggtcg	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggctccagg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtgcagg	cgctgttgcc	gggtgctgtg	caggccacag	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtgca	ggcgctgttg	780
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	840
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	gggtggtggc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acgggtccag	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggccacag	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	1260
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccgggtgctg	gccaggccca	cggtctgacc	1320
ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagccac	gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacgggtc	1380
cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acgggtgcagg	cgctgttgcc	gggtgctgtg	caggccacag	gcttgacccc	ggagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtgca	ggcgctgttg	1800
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1860
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	gggtggtggc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggtc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gcccctgatcc	ggcggtggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
gcctgcctcg	gcgggcgctcc	tgcgctggat	gcagtgaaaa	agggattggg	ggatcctatc	2220

agccggttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtagc	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccacg	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacgggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtaccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gccgactgat	aa					2832

<210> 23
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN GReX3T4-L

<400> 23

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggto	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccgcggag	cgtagggac	cgtcgtgtgc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttgccgtc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggcccttg	tcacgggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	cccgagcagg	tgggtggcoat	cgccagcaat	720
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccgggtgct	gtgcccagcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtga	ggcgctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgocaggcc	caaggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atcgccacga	ataatggttg	caagcaggcg	ctggagacgg	tcagcggtg	gttgcgtgtg	1380
ctgtgocagg	cccacgggct	gaccccgag	caggtggtgg	ccatcgccag	gaatatgggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagccac	1740
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggtgtg	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccacggcg	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
aggaattggc	gggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	ccagttatc	tcgcctgat	2100
ccggcgttgg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtgcct	tggcctgct	cggcggtcgt	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggtattg	ggggtacct	tcagcgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacagg	gcaagcacct	ggcgcgctcc	2400

ES 2 828 669 T3

aggaagcccc	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccc	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggctacaac	ctgcccacog	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	acccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtaccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814

<210> 24
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN GReX3T4-R

<400> 24

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaagggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gocgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	acogaagggtt	cgttcgacag	tggcgagca	ccacgaggca	180
ctggctcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgccg	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggacgg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtggt	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgccgt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	cagggtgggtg	ccatcgccag	caatggcggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctggtgccc	tgctgtgcca	ggccacggc	600
ttgacccgg	agcagggtgg	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcagggtg	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	780
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	840
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1020
caggtggttg	ccatgcgcag	caatattggt	ggcaagcagg	cgctggagag	ggtgcaggcg	1080
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	1140
agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	acgggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggccacag	gcttgacccc	ccagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccgggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	1320
ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	cagggtgggtg	ccatcgccag	caatattggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	ctgttgccc	tgtgtgcca	ggccacggc	1620
ttgacccgg	agcagggtgg	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acgggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ccagcagggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1800
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1860
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtggttg	ccatgcgcag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gcccctgatcc	ggcggttgcc	gogttgacca	acgaccacct	cgtgcgcttg	2160
gcctgcctcg	gcgggcgctcc	tgcgctggat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtaag	tgcgccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tgcgccgaa	cagcaccacg	2340
gaccgatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccagggaaca	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaagg	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640

tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcgccgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacocctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gocgactgat	aa					2832

<210> 25
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN GReX5T1-L

<400> 25

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgggatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	caactggtcg	ccacgggttt	180
acacacggcg	acatcggtgc	gttaagccaa	caccggcgag	cgtagggac	cgtagctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgtagggcgc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtgc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggg	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgacggcag	tgagggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtctaac	480
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtggag	540
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccgag	gcttgacccc	ccagcagggtg	600
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	720
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgcccag	cccacggctt	gacccccag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccacgggc	ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccgag	gcttgacccc	ggagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtga	ggcgtgtgtg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	1200
ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	gatggcgcca	agcaggcgct	ggagcagggtc	1260
cagcggctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	1440
ggcaagcagg	cgtggagagc	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccacgggc	1500
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgtggag	1560
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccgag	gcttgacccc	ccagcagggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgcccag	cccacggctt	gacccccgag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	ggcagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccacgggc	ttgacccctc	agcagggtgt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgtggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgccctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtgcctc	tgccctgcct	cgccggcgct	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtcggagc	tgaggagaga	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgccggg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcaoct	ggcgggctoc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacacccgtg	ggctccccc	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggctacaac	ctgcccacat	gcccagccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttgc	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cgccggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814

<210> 26
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN GReX5T1-R

<400> 26

```

atgggcgcatc ctaaaaagaa acgtaagggtc atcgataagg agaccgcccgc tgccaagttc      60
gagagacagc acatggacag catcgatata gccgatctac gcacgctcgg ctacagccag    120
cagcaacagg agaagatcaa accgaagggt cgttcgacag tggcgacgca ccacgaggca    180
ctggtcggcc acgggtttac acacgcgcac atcgttgctg taagccaaca cccggcagcg    240
ttagggaaccg tcgctgtcaa gtatcaggac atgatcgacg cgttgccaga ggcgacacac    300
gaagcgatcg ttggcgtcgg caaacagtg tccggcgcac gcgctctgga ggccttgctc    360
acgggtggcgg gagagttgag aggtccaccg ttacagttgg acacaggcca acttctcaag    420
attgcaaaac gtggcggtcg gaccgcagtg gaggcagtg atgcatggcg caatgcactg    480
acgggtgccc cgctcaactt gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatattggt    540
ggcaagcagg cgctggagac ggtgcaggcg ctggtgcccg tgctgtgcca ggcccacggc    600
ttgaccccc agcaggtggt ggccatcgcc agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag    660
acgggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggccacg gcttgacccc ggagcaggtg    720
gtggccatcg ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacgggtcca gcggtgttg    780
ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtgccat cgcagccac    840
gatggcggca agcaggcgct ggagacgggtc cagcggtgt tgccggtgt gtgccaggcc    900
cacggcttga cccccagca ggtggtggcc atcgccagca atggcggtgg caagcaggcg    960
ctggagacgg tccagcgct gttgcccgtg ctgtgccagg cccacggctt gacccccag    1020
caggtggtgg ccatcgccag caataatggt ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcg    1080
ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccacggc ttgacccccg agcaggtggt ggccatcgcc    1140
agccacgatg ggggcaagca ggcgctggag acggtccagc ggctgttgcc ggtgctgtgc    1200
caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag    1260
caggcgctgg agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt gccaggccca cggcttgacc    1320
ccccagcagg tgggtggccat cgcagcaaat ggcggtggca agcaggcgct ggagacggtc    1380
cagcggtgtg tgccggtgct gtgcccaggc cagcgcttga ccccgagca ggtggtggcc    1440
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg tgccaggcgt gttgccggtg    1500
ctgtgccagg cccacggctt gacccccag caggtggtgg ccatcgccag caatggcggt    1560
ggcaagcagg cgctggagac ggtccagcgg ctggtgcccg tgctgtgcca ggcccacggc    1620
ttgacccccg agcaggtggt ggccatcgcc agcaatattg gtggcaagca ggcgctggag    1680
acggtcgagg cgctgttgcc ggtgctgtgc caggcccacg gcttgacccc ggagcaggtg    1740
gtggccatcg ccagcaatat tgggtggcaag cagcgctgg agacggtgca ggcgctgttg    1800
ccgggtgctgt gccaggccca cggcttgacc ccggagcagg tggtgccat cgcagccac    1860
gatggcggca agcaggcgct ggagacggtc cagcggtgt tgccggtgct gtgccaggcc    1920
cacggcttga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca atattggtgg caagcaggcg    1980
ctggagacgg tgccaggcgt gttgcccgtg ctgtgccagg cccacggctt gacccctcag    2040
caggtggtgg ccatcgccag caatggcgcc ggcaaggccg cgctggagag cattgttgcc    2100
cagttatctc gccctgatcc ggcggtggcc gcgttgacca acgaccacct cgtcgcttg    2160
gcctgctcgc gcgggcgtcc tgcgctggat gcagtgaata agggattggg ggatcctatc    2220
agccgttccc agctggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag    2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccacg    2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc    2400
aagcacctgg gcggtccag gaagccgac ggcgcatct acaccgtggg ccccccatc    2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gccccatgc    2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac    2580
cccaacgagt ggtggaagg gtacccctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttcgtg    2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac    2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctctgatcgc gcggcgagat gatcaaggcc    2760
ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg    2820
gccgactgat aa                                     2832
    
```

<210> 27
 <211> 2814

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TALEN GReX5T2-L

<400> 27

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaagggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgcatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggctgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggttc	gttaagccaa	caccgcgag	cgtagggac	cgtagctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgtagggctc	300
ggcaaacagt	ggtagggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtgg	gggagagttg	360
agaggtccac	cgtagcagtt	ggacacaggg	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgacgcgag	tggaggcag	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgcctaac	480
ttgaccccg	agcaggtgg	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtagcag	cgctgttgcc	ggtagctgtg	caggcccgag	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtctgtg	660
ccggtagctg	ggcaggccca	cggttgacc	ccccagcagg	tggtagccat	cgccagcaat	720
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgctgt	tgcgggtgct	gtgcccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtaggtggc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgcccagg	cccacggctt	gacccccag	900
caggtaggtg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgtagggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgtgtgtgcca	ggccacgggc	ttgaccccg	agcaggtgg	ggccatcgcc	1020
agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtagcag	cgtaggtgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccgag	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tggtaggcaag	1140
caggcgctgg	agcaggtcca	gaggctgttg	ccggtagctgt	gcccaggccca	cggttgacc	1200
ccggagcagg	tggtagccat	cgccagccac	gatggcgcca	agcagggcg	ggagacgggt	1260
cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgcccaggcc	caggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	1380
ctgtgcccagg	cccacggctt	gaccccgag	caggtaggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	1440
ggcaagcagg	cgtaggagac	ggtagcagcg	ctgttgccgg	tgtgtgtgcca	ggccacgggc	1500
ttgaccccc	agcaggtgg	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtagcag	ggtaggtg	ggtagctgtg	caggcccgag	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtaggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtctgtg	1680
ccggtagctg	ggcaggccca	cggttgacc	ccccagcagg	tggtagccat	cgccagcaat	1740
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgctgt	tgcgggtgct	gtgcccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtaggtggc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgcccagg	cccacggctt	gacccccgag	1920
caggtaggtg	ccatcgccag	ccagtaggg	ggcaagcagg	cgtaggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgtgtgtgcca	ggccacgggc	ttgacccctc	agcaggtgg	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	ggcgagggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgcccctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtagcct	tggcctgct	cggcgggcgt	2160
cctgtagctg	atgcagtga	aaagggattg	gggtagccta	tcagccgttc	ccagctgggtg	2220
aagtagcagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtagccccc	2280
gagtagatcg	agtagatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aagtagatg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggtagcagg	gcaagcacct	ggcggtctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccggt	ggtagcccca	tcgactacgg	cgtagatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggtacacac	ctgcccacag	gcccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccctgctg	2700
tccgtggagg	agtcctgat	cgccggcgag	atgatcaagg	ccggcacccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814

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

<220>

<223> TALEN GReX5T2-R

<400> 28

atgggagatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgttcgacag	tgccgacgca	ccacgaggca	180
ctgggtcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtgctg	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttaggagacc	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgcgct	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	caggtgggtg	ccatcgccag	caataatggg	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgacccccg	agcaggtggg	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccccag	gcttgacccc	ccagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	780
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagccac	840
gatggcgagg	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccgggtgt	gtgccaggcc	900
caaggcttga	ccccccagca	ggtgggtggc	atcgccagca	ataatgggtg	caagcagcg	960
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggt	ctgtgcccag	cccacggctt	gacccccag	1020
caggtgggtg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgacccccg	agcaggtggg	ggccatcgcc	1140
agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	acgggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggccccag	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggtgtg	tgcgggtgtg	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	1440
atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	1500
ctgtgcccag	cccacggctt	gacccccgag	caggtgggtg	ccatcgccag	caatattggg	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgacccccg	agcaggtggg	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acgggtccagc	gggtgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1800
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1860
attgggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgcgggtgtg	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	ggtgggtggc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	ctgtgcccag	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtgggtg	ccatcgccag	caatggcggtc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcggtggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtegccttg	2160
gcctgcctcg	gcggggcgctc	tgcgctggat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctgggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccag	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcattga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccagc	ggcgccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaagg	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcctg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcaccctga	ccctggaggga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gccgactgat	aa					2832

5

<210> 29

<211> 2814

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN GReX5T3-L

15 <400> 29

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgcgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccgcgag	cgtagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgtc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgcctaac	480
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	gggtgtgtgc	caggccccag	gcttgacccc	ggagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtgca	ggcgctgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	720
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagaaggct	caggcgctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	1200
ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	attggtggca	agcaggcgct	ggagacggtg	1260
caggcgctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggccacggc	1500
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccccag	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1740
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	ggcgaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgccctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtgcct	tgccctgcct	cggcgggcgt	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	gggcggctcc	2400
aggaagccc	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggtacaac	ctgcccacat	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaa	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtaccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aatacaagg	cccagctgac	caggctgaac	catcatacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcgccgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

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

<220>
 <223> TALEN GReX5T3-R

<400> 30

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgcgc	tgccaagtgc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120

cagcaacagg	agaagatcaa	accgaaggtt	cgttcgacag	tggcgagca	ccacgaggca	180
ctgggtcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggttgcg	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cggttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tccggcgac	gcgctctgga	ggccttgtct	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgcggt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctggtgcgg	tgctgtgcca	ggccccacggc	600
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ccagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	780
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagccac	840
gatggcgcca	agcagcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccagggc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcagggc	960
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggccccacggc	ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agccacgatg	gcggaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggccccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	1260
caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttg	cgggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	1320
ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	attggtggca	agcaggcgct	ggagacggtg	1380
caggcgctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggccccacggc	1620
ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ccagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1800
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1860
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atattggtgg	caagcagggc	1980
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaggcgcg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcgttggtc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtegccttg	2160
gcctgcctcg	gcgggcgtcc	tgcgctggat	gcagtgaaga	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tgcggcgaa	cagcaccacag	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccggtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacggc	2520
caggccgacg	aatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
cccgaactgat	aa					2832

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

<220>
 <223> Cebador directo GR exón 2

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

<400> 31

	ccatctcattc 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 e s a o c o t o g	
	<400> 32 ccatctcattc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn gcattctgac tatgaagtga	60
20	<210> 33 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador directo GR exón 5	
30	<220> <221> misc_feature <222> (31)..(40) <223> n e s a o c o t o g	
	<400> 33 ccatctcattc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn tcagcaggcc actacaggag tctcacaag	60 69
35	<210> 34 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador inverso GR exón 2	
45	<400> 34 cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag agccagtgag ggtgaagacg	50
50	<210> 35 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador inverso GR exón 3	
	<400> 35 cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag gggctttgca tataatggaa	50
60	<210> 36 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Cebador inverso GR exón 5		
5	<400> 36		
	cctatcccct gtgtgccttg gcagttctcag ctgactctcc ccttcatagt cccagaac	59	
	<210> 37		
	<211> 49		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> TRAC_T01		
15	<400> 37		
	ttgtcccaca gatatccaga accctgacct tgccgtgtac cagctgaga	49	
	<210> 38		
	<211> 49		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> TRBC_T01		
25	<400> 38		
	tgtgttttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa aaggccaca	49	
	<210> 39		
	<211> 50		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> TRBC_T02		
35	<400> 39		
	ttcccacccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca	50	
	<210> 40		
	<211> 49		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> CD52_T02		
	<400> 40		
	ttcctcctac tcaccatcag cctcctgggt atggtacagg taagagcaa	49	
45	<210> 41		
	<211> 530		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Repetición TRAC_T01-L		
55	<400> 41		
60			

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	

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 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 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 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
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 Gly Arg Pro Ala		
515	520	525
Leu Glu		
530		

<210> 42
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Repetición TRAC_T01-R

<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

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 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

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 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 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 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 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

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
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
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 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
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 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

```

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			

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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 45

<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición TRBC_T02-L

<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 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 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

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	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	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 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 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 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

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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 48

<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición CD52_T02-R

<400> 48

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 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

ES 2 828 669 T3

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	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	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	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 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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 49

<211> 2814

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN TRAC_T01-L

10

<400> 49

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgcgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccgcgag	cgtagggac	cgctcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgctc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtgc	gggagagttg	360
agaggteccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgcctcaac	480
ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	660

ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	720
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccccacggc	ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggccccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgttg	cgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccggagcagg	tggtggccat	cggcagccac	gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggcc	1320
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgacggcgct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccccacggc	1500
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccccacg	gcttgacccc	ccagcagggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcggtgttg	1680
cgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	cgggacagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgccctgat	2100
ccggcgcttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtcgcc	tgccctgcct	cggcgggcgt	2160
cctgcgtgg	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtcggagc	tgagggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggcggtctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggctacaac	ctgcccacgc	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	acccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggtgaaac	cacatcacca	actgcaacgg	cggcgtgctg	2700
tccgtggagg	agtcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 50
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN TRAC_T01-R

<400> 50

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaagggtc	atcgataagg	agaccgcgcg	tgccaagtgc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggtt	cgttcgacag	tgccgcagca	ccacgaggca	180
ctggctcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cggtgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtggt	tcgggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcggtcg	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gaccccgag	caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccccacggc	600
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	cgcgctgttg	780
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	cggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	840
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	900

cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atggcgggtg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	1560
ggcaatggcg	cgctggagac	ggtgcaggcg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccccacggc	1620
ttgacccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggaagca	ggcgctggag	1680
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccaag	gcttgacccc	ggagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgttg	1800
ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	1860
gatggcgga	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggtgtg	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattggtgcc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcggtggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgctgccttg	2160
gcctgcctcg	gcgggcgctcc	tgcgctggat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
agcgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccacg	2340
gaccgtatcc	tgagatgaa	ggtgatggag	ttcttcacga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggtccag	gaagcccagc	ggcgccatct	acaccgtggg	ctccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gccgactgat	aa					2832

<210> 51
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN TRBC_T01-L

<400> 51

atgggagatc	ctaaaaagaa	acgtaagggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggac	cgctcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cggtggcgctc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggg	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaaggcgt	gcatgcacgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtcaac	480
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccaag	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	cccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	720
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggtgtg	tgccgggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080

caggccccacg	gotttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	1200
ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	attggtggca	agcaggcgct	ggagacggtg	1260
caggcgctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	cagggtggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1740
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcgccaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgcccctgat	2100
ccggcgcttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tgccctgcct	cgccggcgct	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta	tcagccggtc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cggtccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacagg	gcaagcacct	ggcggtctcc	2400
aggaagccc	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctcccca	tcgactacgg	cgctgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggtctaca	ctgcccacag	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgctccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cgccggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814

<210> 52

<211> 2832

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN TRBC_T01-R

10

<400> 52

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagtgc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gcgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgctcgacag	tgccgagca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggttgcg	taagccaaca	cccgccagcg	240
ttagggaacc	tcgctgtcaa	gtatcaggag	atgatcgac	cggtgcca	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tcggcgccac	gogctctgga	ggccttgctc	360
acggtgcgcg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgcgct	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcaactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gaccccccag	cagggtggtg	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	cgcgctgttg	780
ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	840
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggccacggcg	ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggtctgacc	1320

ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacgggttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atggcgggtg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgtgtgag	1680
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1800
ccggtgctgt	gccaggccca	cggtttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1860
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcgttgggc	gcgttgacca	acgaccacct	cgctgccttg	2160
gcctgcctcg	gcgggcgtcc	tgcgctggat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccacg	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccgtggg	ctcccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaagg	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcaccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gccgactgat	aa					2832

<210> 53
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN TRBC_T02-L
 <400> 53

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgttaagggtc	atcgattacc	catacgaatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgcgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggttcgac	agtggcgcgag	caccacgagg	cactgggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggttg	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggag	cgctcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttgccgtc	300
ggcaaacagg	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggg	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtcaaac	480
ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtgtgag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggtttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	720
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtgtgag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggccacag	gcttgacccc	ggagcagggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cgcttgacc	1200
ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500

ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ccagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtctgtt	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	1740
gatggcgga	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgcctgat	2100
ccggcgttgg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tgccctgcct	cgccgggctg	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgcccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagacccc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggcggtctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctcccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggctacaac	ctgcccacg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcgccgag	atgatcaagg	ccggcacctc	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 54

<211> 2832

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN TRBC_T02-R

<400> 54

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgcgcg	tgccaagtte	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gocgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgttcgacag	tgccgcagca	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgctg	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cggtgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgcgct	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcaactg	480
acgggtgccc	cgtcacaact	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgtcgagac	ggtccagcgg	ctggtgcggg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgtgtg	780
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	840
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgctgt	tgccggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tgccggcaag	1260
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	cgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	1380
cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	1560
ggcaagcagg	cgtggagac	gtcccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	1740

gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1800
cgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	1860
ggcggtgcca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	gggtggggcc	atcgccagca	atggcgggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtgggtgg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcgttgacc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtgccttg	2160
gcctgcctcg	gcgggcgtcc	tgcgctggat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccacg	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccgc	ggcgccatct	acaccgtggg	ctcccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacggcg	2520
caggccgacg	aatgacagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
ccaacaggt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gccgactgat	aa					2832

<210> 55
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN CD52_T02-L

<400> 55

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggctc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccggcgag	cgtagggag	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgtc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtgc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgcctaac	480
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgtggag	540
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	600
ctggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	660
cgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	cgggacaggg	tggtggccat	cgccagccac	720
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccccagca	ggtgggtggc	atcgccagca	atggcgggtg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	900
caggtgggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccgggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	1200
ccggagcagg	tggtggccat	cgccagcaat	attgggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	1260
caggcgctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	1320
atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccacg	caggtgggtg	ccatcgccag	caatggcggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggag	1560
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatat	tggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtgca	ggcgtgttg	1680
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtggccat	cgccagccac	1740
gatggcggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtgggtggc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1920

caggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1980
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgccctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggcctgcct	cggcgggctg	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacagg	gcaagcacct	gggcggctcc	2400
aggaagccc	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctcccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggtacaac	ctgcccacg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	acccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gacctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggcgactg	ataa	2814

<210> 56
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN CD52_T02-R

<400> 56

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataaag	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgttcgacag	tggcgagcga	ccacgaggca	180
ctggtcggcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtgg	tccggcgac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acggtggcgg	gagagttag	aggtccaccg	ttacagttag	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgcgct	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acggcgctgg	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	caggcgctgg	agacgggtcca	cgcgctgttg	780
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	cccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	840
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggct	cagcggtgt	tggcggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggt	gtgcccgtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1020
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	1260
caggcgctga	agacggtgca	ggcgctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	1320
ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagccac	gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacggctc	1380
cagcggtgt	tggcggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	ggcgctgttg	1800
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1860
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	caggcgctgt	tggcggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggt	gttgcccgtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
caggtggtgg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcggtggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtcgccctg	2160

```

gcctgcctcg gcgggcggtcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattggg ggatcctatc 2220
agccgttccc agctgggtgaa gtccgagctg gaggagaaga aatccgagtt gaggcacaag 2280
ctgaagtacg tgccccacga gtacatcgag ctgatcgaga tcgcccggaa cagcaccag 2340
gaccgtatcc tggagatgaa ggtgatggag ttcttcatga aggtgtacgg ctacaggggc 2400
aagcacctgg gcggtctccag gaagcccgac ggcgccatct acaccgtggg ctcccccatc 2460
gactacggcg tgatcgtgga caccaaggcc tactccggcg gctacaacct gcccatcggc 2520
caggccgacg aaatgcagag gtacgtggag gagaaccaga ccaggaacaa gcacatcaac 2580
cccaacgagt ggtggaaggt gtaccocctcc agcgtgaccg agttcaagtt cctgttctgtg 2640
tccggccact tcaagggcaa ctacaaggcc cagctgacca ggctgaacca catcaccaac 2700
tgcaacggcg ccgtgctgtc cgtggaggag ctocctgatcg gcggcgagat gatcaaggcc 2760
ggcacctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgog 2820
gccgactgat aa 2832

```

```

5  <210> 57
    <211> 49
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

10  <220>
    <223> TRAC_T02

    <400> 57
    tttagaaagt tcctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc tttgaaaca 49

15  <210> 58
    <211> 49
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

20  <220>
    <223> TRAC_T03

    <400> 58
    tccagtgcaca agtctgtctg cctattcacc gattttgatt ctcaaacaa 49

25  <210> 59
    <211> 49
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

30  <220>
    <223> TRAC_T04

    <400> 59
    tatatcacag acaaaactgt gctagacatg aggtctatgg acttcaaga 49

35  <210> 60
    <211> 49
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

40  <220>
    <223> TRAC_T05

    <400> 60
    tgaggtctat ggacttcaag agcaacagtg ctgtggcctg gagcaacaa 49

45  <210> 61
    <211> 47
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

50

```

<220>
 <223> CD52_T01

5 <400> 61
 ttcctcttcc tcctaccacc atcagcctcc ttacctgta ccataac 47

10 <210> 62
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> CD52_T04
 <400> 62
 ttcctcctac tcaccacagc ctctgggtct tacctgtacc ata 43

20 <210> 63
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> CD52_T05
 <400> 63
 tcctactcac catcagctcc tgggtatttg 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 e s a o c o t o g

<400> 66
 5 **ccatctcatt 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 e s a o c o t o g

20 <400> 67
ccatctcatt 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 e s a o c o t o g

35 <400> 68
ccatctcatt cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn agagccccta 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)
 50 <223> n e s a o c o t o g

<400> 69
ccatctcatt cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ggacctagta acataattgt 60
gc 62

55 <210> 70
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Cebador inverso GR CD52		
	<400> 70		
5	cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag cctgttggag tccatctgct g	51	
	<210> 71		
	<211> 50		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso GR TRAC		
15	<400> 71		
	cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag cctcatgtct agcacagttt	50	
	<210> 72		
	<211> 51		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador inverso GR TRBC1-2		
25	<400> 72		
	cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag accagctcag ctccacgtgg t	51	
	<210> 73		
	<211> 495		
30	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<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 Gly Ser Gly 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

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 Glu Gly 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 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

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> CTLA4_T01	
	<400> 74	
	tggccctgca ctctcctggt ttttcttctc ttcacccctg tcttctgca	49
10	<210> 75	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> CTLA4_T03	
	<400> 75	
	ttttccatgc tagcaatgca cgtggcccag cctgctgtgg tactggcca	49
20	<210> 76	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> CTLA4_T04	
	<400> 76	
	tccatgctag caatgcacgt ggcccagcct gctgtggtac tggccagca	49
30	<210> 77	
	<211> 49	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> PDCD1_T01	
40	<400> 77	
	ttctccccag ccctgctcgt ggtgaccgaa ggggacaacg ccaccttca	49
	<210> 78	
	<211> 49	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> PDCD1_T03	
50	<400> 78	
	tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagaga	49
	<210> 79	
55	<211> 530	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Repetición CTLA4_T01-L	
	<400> 79	

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	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 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 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 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 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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 80

<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición CTLA4_T01-R

<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

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 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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 81
<211> 530
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Repetición CTLA4_T03-L

<400> 81

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

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	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 Gly Arg Pro Ala
 515 520 525

Leu Glu

530

<210> 82
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<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

```

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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 83
<211> 530
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Repetición CTLA4_T04-L

<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 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 Gln
 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 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

```

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 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 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

<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 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 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

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 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 Gly Arg Pro Ala
515 520 525

Leu Glu
530

<210> 86
<211> 529
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Repetición PDCD1_T01-R

<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

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 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
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 Gly Gly Lys Gln				
		275		280
				285
Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His				
		290		295
				300
Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly				
		305		310
				315
				320
Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln				
		325		330
				335
Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly				
		340		345
				350
Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu				
		355		360
				365
Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser				
		370		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 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 Gly Arg Pro Ala Leu
515 520 525

Glu

<210> 87

<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Repetición PDCD1_T03-L

<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
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 Gln Gln Val				
	165		170	175
Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly 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 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 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 Gly Arg Pro Ala
 515 520 525
 Leu Glu
 530

<210> 88
 <211> 529
 <212> PRT

<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 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 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 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 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 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 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 Gly Arg Pro Ala Leu
515 520 525

Glu

<210> 89
<211> 2814
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TALEN CTLA4_T01-L

<400> 89

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tcgccgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcggttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactgggtcg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcggtgc	gttaagccaa	caccggcgag	cgtagggac	cgctcgctgc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgctc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacggtggc	gggagagttg	360
agagggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtcaca	480
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtaggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgtttg	660
ccggtgctgt	ggcaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tggtagccat	cgccagccac	720
gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	900
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1020
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggccccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tggtaggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggcccc	cggttgacc	1200
ccggagcagg	tggtagccat	cgccagccac	gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	caggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgtttg	1680
ccggtgctgt	ggcaggccca	cggcttgacc	cccagcagg	tggtagccat	cgccagcaat	1740
ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgccggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1920
caggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctggtgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgcctgat	2100

ccggcggttg	ccgcggttgac	caacgaccac	ctcgctgcct	tggcctgcct	cggcgggctg	2160
cctgcgctgg	atgcagtgaa	aaaggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctgggtg	2220
aagtcggagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aagggtgatg	agttcttcat	gaagggtgac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggcggtctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggtacaaac	ctgcccacgt	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtaccctt	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggtc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cgcccgactg	ataa	2814

<210> 90
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN CTLA4_T01-R

<400> 90

atgggagatc	ctaaaaagaa	acgtaagggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggtt	cgttcgacag	tggcgacgca	ccacgaggca	180
ctgggtcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgctg	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtg	tccggcgcc	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgcgct	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	cagggtggtg	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctggtgccc	tgtgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccg	agcaggtggt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtccag	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	720
gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgttg	780
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	ggccagcaat	840
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggtgtg	tgccgggtgt	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgcccag	cccacggctt	gaccccgag	1020
cagggtggtg	ccatcgccag	caatatgtgt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1080
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggccccacgg	ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	1140
agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacggtgca	ggcgctgttg	cgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagccac	gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacggtc	1380
cagcggtgtg	tgccgggtgt	gtgcccaggg	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	1500
ctgtgcccag	cccacggctt	gacccccag	cagggtggtg	ccatcgccag	caataatggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctggtgccc	tgtgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgacccccc	agcaggtggt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1680
acgggtccag	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacg	gcttgacccc	ccagcaggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacggtcca	gcggctgttg	1800
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1860
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	ctgtgcccag	cccacggctt	gacccctcag	2040
cagggtggtg	ccatcgccag	caatggcggtg	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gcccctgatcc	ggcggtggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtcgccctg	2160
gcctgcctcg	gcgggcgtcc	tgcgctggat	gcagtgaata	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tcgcccggaa	cagcaccacg	2340

gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccag	ggcgccatct	acaccgtggg	ctcccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gccccatcggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcaccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gccgactgat	aa					2832

<210> 91
 <211> 2814
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN CTLA4_T03-L

<400> 91

atggggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaagggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgcgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggctcg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgttagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgctc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtggc	gggagagttg	360
agagggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtccaac	480
ttgaccccc	agcagggtgg	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggtg	600
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtcgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	720
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	900
cagggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccgg	agcagggtggt	ggccatcgcc	1020
agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggtgtgtg	cgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	1260
cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaacccccag	cagggtgggtg	ccatcgccag	caatggcggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgacccccg	agcagggtgg	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acgggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ccagcagggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagccac	1740
gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	1920
cagggtggtgg	ccatcgccag	caatattggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1980
ctgttgccgg	tgtgtgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcagggtggt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	ggggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tgcgccctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaaccac	ctcgtgcgct	tggcctgcct	cggcgggcgt	2160
cctgcgctgg	atgcagtgaa	aaagggattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatoga	gacgcgccgg	aacgacacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aagggtgatgg	agttcttcat	gaagggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	ggcgggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggctacaac	ctgcccatcg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520

aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtaccocct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcgccgag	atgatcaagg	ccggcacccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 92
 <211> 2832
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN CTLA4_T03-R

<400> 92

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccgc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gcgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cggtcgacag	tggcgagca	ccacgaggca	180
ctgggtcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggttcgt	taagccaaca	ccggcgagcg	240
ttagggaacc	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cggtgocaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtg	tcggcgccac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgccgt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	cagggtggcg	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcagggtg	720
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	780
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagccac	840
gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atattggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tgcaggcgct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	1020
cagggtggtg	ccatcgccag	caataatggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1080
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	1140
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggccacag	gcttgacccc	ggagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacgggtgca	ggcgctgttg	ccgggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	1320
ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagccac	gatggcgcca	agcaggcgct	ggagacgggtc	1380
cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	ctgggagcgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	1500
ctgtgocagg	cccacggctt	gaccccgag	cagggtggtg	ccatcgccag	caatattggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	1680
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcagggtg	1740
gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtgca	ggcgctgttg	1800
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	cccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1860
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgtg	tgcgggtgct	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggtc	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccctcag	2040
cagggtggtg	ccatcgccag	caatggcgcc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gcctgatcc	ggcggtggcc	gcgttgacca	acgaccacct	cgctgccttg	2160
gcctgctcgc	gcggcgctcc	tgcgctggat	gcagtgaaaa	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgcgccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tgcgccgga	cagcaccacg	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcatga	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccggtgg	ctcccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gcccacggc	2520
caggccgacg	aatgcagag	gtacgtggag	gagaaccaga	ccaggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760

ggcaccctga ccctggagga ggtgaggagg aagttcaaca acggcgagat caacttcgcg 2820
gccgactgat aa 2832

<210> 93
<211> 2814
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> TALEN CTLA4_T04-L

<400> 93

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaagggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgcgatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactgggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccgcgag	cgtagggac	cgtcgtgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggtgtc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtggc	gggagagtgt	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgctcaac	480
ttgaccccg	agcagggtgg	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggag	540
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcagggtg	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	720
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	900
cagggtggtgg	ccatcgccag	caataatggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggccacag	gcttgacccc	ccagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaatgg	cggtggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1200
ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	1260
caggcgctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	cagggtgggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccg	agcagggtgg	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgtggag	1560
acgggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcagggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtgca	ggcgtgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1740
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggtgtg	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccgag	1920
cagggtggtgg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcagggtgt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgtggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgccttgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtcgcc	tggcctgcct	cggcgggcgt	2160
cctgcgttg	atgcagtga	aaagggtattg	ggggatccta	tcagccgttc	ccagctggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aagggtgatgg	agttcttcat	gaagggtgtac	ggctacaggg	gcaagcacct	gggcggctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccc	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggctacaac	ctgcccacat	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccagggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	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	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatata	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgttcgacag	tggcgagca	ccacgaggca	180
ctggctcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcgttgctg	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgtcgg	caaacagtgg	tccggcgcac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcg	gagagttgag	aggccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcggtg	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	cagggtgggt	ccatcgccag	caataatggt	540
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctggtgccc	tgctgtgcca	ggcccacggc	600
ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	660
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ccagcagggtg	720
gtggccatcg	ccagcaatgg	cgggtggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	780
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	840
aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggt	cagcggtgtg	tgccgggtgt	gtgccaggcc	900
cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	960
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgcccag	cccacggctt	gaccccgagg	1020
cagggtgggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagag	ggtccagcgg	1080
ctggttgccg	tgctgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccgg	agcagggtgg	ggccatcgcc	1140
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1200
caggcccacg	gcttgacccc	ggagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaatat	tgggtggcaag	1260
caggcgctgg	agacgggtgca	ggcgctgttg	cgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	1320
ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	aatggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	1380
cagcggtgtg	tgcgggtgtg	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1440
atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1500
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgagg	cagggtgggtg	ccatcgccag	caatattggt	1560
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	ctggtgccc	tgctgtgcca	ggcccacggc	1620
ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	1680
acgggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcagggtg	1740
gtggccatcg	ccagccacga	tggcgccaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1800
ccgggtgctgt	gccaggccca	cggcttgacc	ccggcgagcg	tgggtggccat	cgccagcaat	1860
attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	caggcgctgt	tgccgggtgt	gtgccaggcc	1920
cacggcttga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcg	caagcaggcg	1980
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgcccag	cccacggctt	gacccctcag	2040
cagggtggtg	ccatcgccag	caatggcggc	ggcaggccgg	cgctggagag	cattgttgcc	2100
cagttatctc	gccctgatcc	ggcgttgccc	gcgttgacca	acgaccacct	cgtcgccctg	2160
gcctgcctcg	gcgggcgtcc	tgcgctggat	gcagtgaaaa	agggattggg	ggatcctatc	2220
agccgttccc	agctggtgaa	gtccgagctg	gaggagaaga	aatccgagtt	gaggcacaag	2280
ctgaagtacg	tgccccacga	gtacatcgag	ctgatcgaga	tgcgccgga	cagcaccacg	2340
gaccgtatcc	tggagatgaa	ggtgatggag	ttcttcacat	aggtgtacgg	ctacaggggc	2400
aagcacctgg	gcggctccag	gaagcccgac	ggcgccatct	acaccgtggg	ctcccccatc	2460
gactacggcg	tgatcgtgga	caccaaggcc	tactccggcg	gctacaacct	gccccctggc	2520
caggccgacg	aaatgcagag	gtacgtggag	gagaaaccaga	ccagggaacaa	gcacatcaac	2580
cccaacgagt	ggtggaaggt	gtacccctcc	agcgtgaccg	agttcaagtt	cctgttcgtg	2640
tccggccact	tcaagggcaa	ctacaaggcc	cagctgacca	ggctgaacca	catcaccaac	2700
tgcaacggcg	ccgtgctgtc	cgtggaggag	ctcctgatcg	gcggcgagat	gatcaaggcc	2760
ggcacccctga	ccctggagga	ggtgaggagg	aagttcaaca	acggcgagat	caacttcgcg	2820
gccgactgat	aa					2832

<210> 95
 <211> 2814
 <212> ADN

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TALEN PDCD1_T01-L

5

<400> 95

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgcatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	cacccggcag	cgtagggac	cgctcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cggtggcgctc	300
ggcaaacagt	ggctccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgcctcaac	480
ttgaccccc	agcaggtggg	ggccatcgcc	agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acgggtccagc	ggctgttgcc	gggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggtttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	720
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	780
cacggcttga	ccccggagca	gggtgtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	900
caggtgggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgaccccg	agcaggtggg	ggccatcgcc	1020
agccacgatg	gcggcaagca	ggcgtggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggccccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggtttgacc	1200
ccggagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	attggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtg	1260
caggcgctgt	tgcgggtgct	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	ataatgggtg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggtg	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	caggtgggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	gggtccagcgg	ctgttgccgg	tgctgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccg	agcaggtggg	ggccatcgcc	agccacgatg	gcggcaagca	ggcgctggag	1560
acgggtccagc	ggctgttgcc	gggtgtgtgc	caggcccacg	gcttgacccc	ggagcaggtg	1620
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggtttgacc	ccccagcagg	tgggtggccat	cgccagcaat	1740
ggcgggtggca	agcaggcgct	ggagacgggtc	cagcggctgt	tgccgggtgct	gtgccaggcc	1800
cacggcttga	ccccccagca	gggtgtggcc	atcgccagca	ataatgggtg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggt	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1920
caggtgggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	1980
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcaggtggg	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgtggag	agcattgttg	cccagttatc	tcgcccctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtgcct	tggcctgcct	cggcgggcgt	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggtattg	ggggtccta	tcagccgttc	ccagctgggtg	2220
aagtccgagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacagg	gcaagcacct	ggcggtctcc	2400
aggaagcccg	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccc	tcgactacgg	cgtgatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggttacaac	ctgcccacg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	accccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcaccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

10

<210> 96

<211> 2829

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> TALEN PDCD1_T01-R

<400> 96

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaagggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggtt	cgttcgacag	tggcgacagca	ccacgaggca	180
ctgggtcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggttgcgt	taagccaaca	cccggcagcg	240
ttagggaccg	tgcgtgtcaa	gtatcaggac	atgatcgacg	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtg	tccggcgac	gcgctctgga	ggccttgctc	360
acgggtggcg	gagagttgag	agggtccaccg	ttacagttgg	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgcggt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccag	caagtcgtcg	caatcgccag	caataacgga	540
gggaagcaag	ccctcgaaac	cgtgcagcgg	ttgcttcctg	tgctctgcca	ggcccacggc	600
cttacccttg	agcagggtgg	ggccatcgca	agtaacattg	gaggaaagca	agccttgagg	660
acagtgcagg	ccctgttgcc	cgtgctgtgc	caggcacacg	gcctcacacc	agagcaggtc	720
gtggccattg	cctccaacat	cggggggaaa	caggctctgg	agaccgtcca	ggcctgtctg	780
cccgtcctct	gtcaagctca	cggcctgact	ccccacaag	tggtcgccat	cgcctctaag	840
aacggcgga	agcaggcact	ggaaacagtg	cagagactgc	tccctgtgct	ttgccaagct	900
catgggttga	ccccccaaca	ggctcgtcgt	attgcctcaa	acaacggggg	caagcaggcc	960
cttgagactg	tgcagagggt	gttgccagtg	ctgtgtcagg	ctcacgggct	cactccacaa	1020
cagggtggtcg	caattgccag	caacggcgcc	ggaaagcaag	ctcttgaaac	cgtgcaacgc	1080
ctcctgcccg	tgcctgtgca	ggctcatggc	ctgacaccac	aacaagtcgt	ggcctatgcc	1140
agtaataatg	gcgggaaaca	ggctcttgag	accgtccaga	ggctgctccc	agtgtctctg	1200
caggcacacg	ggctgacccc	ccagcagggtg	gtggctatcg	ccagcaataa	tgggggcaag	1260
caggccctgg	aaacagtgca	gcgcctgctg	ccagtgtctt	gccagggtca	cgggctcact	1320
cccgaacagg	tgcgtggcaat	cgcctccaac	ggagggaagc	aggctctgga	gaccgtgcag	1380
agactgctgc	cgcctctgtg	ccaggccac	ggactcacac	ctcagcagggt	cgtcgccatt	1440
gcctctaaca	acgggggcaa	acaagccctg	gagacagtg	agcggctgtt	gcctgtgttg	1500
tggcaagccc	acggcctgac	tccctcaaca	gtgggtcgcca	tgcctcaaaa	tggcgcgga	1560
aaacaagctc	tggagacagt	gcagagggtt	ctgcccgtcc	tctgccaagc	ccacggcctg	1620
actccccaac	agggtcgtcg	cattgccagc	aacggcgagg	gaaagcaggc	tctcgaaact	1680
gtgcagcgcc	tgccttccgt	gctgtgtcag	gctcatgggc	tgacccccca	gcaagtgttg	1740
gctattgcct	ctaacaatgg	aggcaagcaa	gcccttgaga	cagtccagag	gctgttgcca	1800
gtgctgtgcc	aggccacagg	gctcacacc	cagcagggtg	tcgccatcgc	cagtaacggc	1860
ggggggcaaac	aggcattgga	aaccgtccag	cgcctgcttc	cagtgtctctg	ccaggcacac	1920
ggactgacac	ccgaacagggt	gggtggccatt	gcatcccatg	atggggggcaa	gcaggccctg	1980
gagaccgtgc	agagactcct	gccagtgttg	tgccaagctc	acggcctcac	ccctcagcaa	2040
gtcgtggcca	tgcctcaaaa	cggggggggc	cggcctgcac	tggagagcat	tgttgcccag	2100
ttatctcgcc	ctgatccggc	gttgcccgcg	ttgaccaacg	accacctcgt	cgccttgggc	2160
tgcctcgccg	ggcgtcctgc	gctggatgca	gtgaaaaagg	gattggggga	tccatcagc	2220
cgttcccagc	tgggtgaagt	cgagctggag	gagaagaaat	ccgagttgag	gcacaagctg	2280
aagtacgtgc	cccacagagta	catcgagctg	atcgagatcg	cccggaaacag	caccacaggac	2340
cgtatcctgg	agatgaagggt	gatggagttc	ttcatgaagg	tgtacggcta	caggggcaag	2400
cacctggggc	gctccaggaa	gcccagcggc	gccatctaca	ccgtgggctc	ccccatcgac	2460
taccgctgaa	tgcgtggacac	caaggcctag	tccggcggct	acaacctgcc	catcgccag	2520
gccgacgaaa	tcagagagta	cgtggagag	aaccagagca	ggaacaagca	catcaacccc	2580
aacgagtggt	ggaagggtgta	ccccccagc	gtgaccagag	tcaagttcct	gttcgtgtcc	2640
ggccacttca	agggcaacta	caaggcccag	ctgaccaggc	tgaaccacat	caccaactgc	2700
aacggcgccg	tgcgtgtccgt	ggaggagctc	ctgatcgccg	gcgagatgat	caaggccggc	2760
accctgaccc	tggaggagggt	gaggagggaag	ttcaacaacg	gcgagatcaa	cttcgcggcc	2820
gactgataa						2829

5

<210> 97
<211> 2814
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> TALEN PDCD1_T03-L

15

<400> 97

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgattacc	catacgatgt	tccagattac	60
gctatcgata	tgcgcatct	acgcacgctc	ggctacagcc	agcagcaaca	ggagaagatc	120
aaaccgaagg	ttcgttcgac	agtggcgag	caccacgagg	cactggtcgg	ccacgggttt	180
acacacgcgc	acatcgttgc	gttaagccaa	caccgcgag	cgtagggac	cgtcgctgtc	240
aagtatcagg	acatgatcgc	agcgttgcca	gaggcgacac	acgaagcgat	cgttggcgtc	300
ggcaaacagt	ggtccggcgc	acgcgctctg	gaggccttgc	tcacgggtggc	gggagagttg	360
agaggtccac	cgttacagtt	ggacacaggc	caacttctca	agattgcaaa	acgtggcggc	420
gtgaccgcag	tggaggcagt	gcatgcatgg	cgcaatgcac	tgacgggtgc	cccgtccaac	480
ttgaccccg	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaatattg	gtggcaagca	ggcgctggag	540
acggtgcagg	cgctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ggagcagggtg	600
gtggccatcg	ccagccacga	tggcggcaag	caggcgctgg	agacgggtcca	ggcgctgttg	660
ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccggagcagg	tggtagccat	cgccagccac	720
gatggcgga	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	780
cacggctga	ccccccagca	ggtggtggcc	atcgccagca	atggcggtgg	caagcaggcg	840
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	900
caggtgggtg	ccatcgccag	ccacgatggc	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	960
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgacccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	1020
agcaatggcg	gtggcaagca	ggcgctggag	acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	1080
caggccacg	gcttgacccc	ccagcagggtg	gtggccatcg	ccagcaataa	tggtaggaag	1140
caggcgctgg	agacgggtcca	gcggctgttg	ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	1200
ccccagcagg	tggtagccat	cgccagcaat	ggcggtggca	agcaggcgct	ggagacggtc	1260
cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	cacggcttga	ccccccagca	ggtggtggcc	1320
atcgccagca	ataatggtgg	caagcaggcg	ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	1380
ctgtgccagg	cccacggctt	gacccccag	cagggtggtg	ccatcgccag	caataatggt	1440
ggcaagcagg	cgctggagac	ggtccagcgg	ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	1500
ttgaccccc	agcagggtgt	ggccatcgcc	agcaataatg	gtggcaagca	ggcgctggag	1560
acggtccagc	ggctgttgcc	ggtgctgtgc	caggccacag	gcttgacccc	ccagcagggtg	1620
gtggccatcg	ccagcaataa	tggtaggaag	caggcgctgg	agacgggtcca	ggcgctgttg	1680
ccggtgctgt	gccaggccca	cggttgacc	ccggagcagg	tggtagccat	cgccagccac	1740
gatggcgga	agcaggcgct	ggagacggtc	cagcggtgt	tgcgggtgt	gtgccaggcc	1800
cacggctga	ccccggagca	ggtggtggcc	atcgccagcc	acgatggcgg	caagcaggcg	1860
ctggagacgg	tccagcggct	gttgccgggtg	ctgtgccagg	cccacggctt	gaccccgag	1920
caggtgggtg	ccatcgccag	caatattggt	ggcaagcagg	cgctggagac	ggtgcaggcg	1980
ctgttgccgg	tgtgtgcca	ggcccacggc	ttgacccctc	agcagggtgt	ggccatcgcc	2040
agcaatggcg	gcggcaggcc	ggcgctggag	agcattgttg	cccagttatc	tgcgctgat	2100
ccggcggttg	ccgcgttgac	caacgaccac	ctcgtcgctt	tggcctgcct	cgggcggtgt	2160
cctgcgctgg	atgcagtga	aaagggttg	ggggtacct	tcagccgttc	ccagctgggtg	2220
aagtccagc	tggaggagaa	gaaatccgag	ttgaggcaca	agctgaagta	cgtgccccac	2280
gagtacatcg	agctgatcga	gatcgcccg	aacagcacc	aggaccgtat	cctggagatg	2340
aaggtgatgg	agttcttcat	gaaggtgtac	ggctacagg	gcaagcacct	gggcgggtcc	2400
aggaagcccc	acggcgccat	ctacaccgtg	ggctccccca	tcgactacgg	cgtagatcgtg	2460
gacaccaagg	cctactccgg	cggtacaac	ctgcccacg	gccaggccga	cgaaatgcag	2520
aggtacgtgg	aggagaacca	gaccaggaac	aagcacatca	acccaacga	gtggtggaag	2580
gtgtacccct	ccagcgtgac	cgagttcaag	ttcctgttcg	tgtccggcca	cttcaagggc	2640
aactacaagg	cccagctgac	caggctgaac	cacatcacca	actgcaacgg	cgccgtgctg	2700
tccgtggagg	agctcctgat	cggcggcgag	atgatcaagg	ccggcacccct	gaccctggag	2760
gaggtgagga	ggaagttcaa	caacggcgag	atcaacttcg	cggccgactg	ataa	2814

<210> 98
 <211> 2829
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TALEN PDCD1_T03-R

<400> 98

atgggcgatc	ctaaaaagaa	acgtaaggtc	atcgataagg	agaccgccc	tgccaagttc	60
gagagacagc	acatggacag	catcgatatc	gccgatctac	gcacgctcgg	ctacagccag	120
cagcaacagg	agaagatcaa	accgaagggt	cgctcgacag	tggcgacga	ccacgaggca	180
ctggctcgcc	acgggtttac	acacgcgcac	atcggtgcgt	taagccaaca	ccggcgagcg	240

ttagggaccg	tcgctgtcaa	gtatcaggac	atgatcgag	cgttgccaga	ggcgacacac	300
gaagcgatcg	ttggcgctcg	caaacagtgg	tccggcgac	gcgctctgga	ggccttgcctc	360
acggtggcgg	gagagttgag	aggtccaccg	ttacagttag	acacaggcca	acttctcaag	420
attgcaaaac	gtggcgccgt	gaccgcagtg	gaggcagtg	atgcatggcg	caatgcactg	480
acgggtgccc	cgctcaactt	gacccccgag	caagtcgtcg	caatcgccag	ccatgatgga	540
gggaagcaag	ccctcgaaac	cgtgcagcgg	ttgcttctctg	tgctctgcca	ggcccacggc	600
cttaccctc	agcaggtggt	ggccatcgca	agtaacggag	gaggaaagca	agccttggag	660
acagtgcagc	gcctgttgcc	cgtgctgtgc	caggcacacg	gcctcacacc	agagcaggtc	720
gtggccattg	cctcccatga	cggggggaaa	caggctctgg	agaccgtcca	gaggctgctg	780
ccgctcctct	gtcaagctca	cggcctgact	ccccaaacaag	tggtcgccat	cgctctaat	840
ggcgggcgga	agcaggcact	ggaaacagtg	cagagactgc	tcctgtgct	ttgccaagct	900
catgggttga	cccccaaca	ggtcgctcgt	attgcctcaa	acgggggggg	caagcaggcc	960
cttgagactg	tgcagaggct	gttgccagtg	ctgtgtcagg	ctcacgggt	cactccacaa	1020
caggtggtcg	caattgccag	caacggcggc	ggaaagcaag	ctcttgaac	cgtgcaacgc	1080
ctctgccc	tgctctgtca	ggctcatggc	ctgacaccac	aacaagtcgt	ggccatcgcc	1140
agtaataatg	gcgggaaaca	ggctcttgag	accgtccaga	ggctgctccc	agtgtctgc	1200
caggcacacg	ggctgacccc	cgagcaggtg	gtggctatcg	ccagcaatat	tgggggcaag	1260
caggccctgg	aaacagtcca	ggccctgctg	ccagtgcctt	gccaggctca	cgggctcact	1320
ccccagcagg	tcgtggcaat	cgctccaac	ggcgaggga	agcaggctct	ggagaccgtg	1380
cagagactgc	tgcccgctt	gtgccaggcc	cacggactca	cacctgaaca	ggtcgctgcc	1440
attgcctctc	acgatggggg	caaacaagcc	ctggagacag	tgacgggct	gttgccgtg	1500
ttgtgccaag	cccacggctt	gactcctcaa	caagtggtcg	ccatcgctc	aaatggcggc	1560
ggaaaacaag	ctctggagac	agtgcagagg	ttgctgccc	tcctctgcca	agcccacggc	1620
ctgactcccc	aacaggtcgt	cgccattgcc	agcaacaacg	gaggaaagca	ggctctcgaa	1680
actgtgcagc	ggctgcttcc	tgtgctgtgt	caggctcatg	ggctgacccc	cgagcaagtg	1740
gtggctattg	cctctaattg	aggcaagcaa	gcccttgaga	cagtccagag	gctgttgcca	1800
gtgctgtgcc	aggcccacgg	gctcaccccc	cagcaggtgg	tcgccatcgc	cagtaacaac	1860
ggggggcaaac	aggcattgga	aaccgtccag	cgctgcttc	cagtgtctg	ccaggcacac	1920
ggactgacac	ccgaacaggt	ggtggccatt	gcacccatg	atgggggcaa	gcaggccctg	1980
gagaccgtgc	agagactcct	gccagtgttg	tgccaagctc	acggcctcac	ccctcagcaa	2040
gtcgtggcca	tcgcctcaaa	cggggggggc	cggcctgcac	tgagagcat	tggtgcccag	2100
ttatctcgcc	ctgatccggc	gttggccgcg	ttgaccaacg	accacctcgt	cgcttggcc	2160
tgccctggcg	ggcgctcctg	gctggatgca	gtgaaaaagg	gattggggga	tcctatcagc	2220
cgttcccagc	tggtgaaagtc	cgagctggag	gagaagaaat	ccgagttgag	gcacaagctg	2280
aagtacgtgc	cccacagagta	catcgagctg	atcgagatcg	cccggaaacag	caccacaggac	2340
cgtatcctgg	agatgaaggt	gatggagttc	ttcatgaagg	tgtacggcta	caggggcaag	2400
cacctgggcg	gctccaggaa	gcccagcggc	gccatctaca	ccgtgggctc	ccccatcgac	2460
tacggcgta	tcgtggacac	caaggcctac	tccggcggtc	acaacctgcc	catcggccag	2520
gccagagtaa	tcgtggagga	cgtggaggtg	aaccagacca	ggaacaagca	catcaacccc	2580
aacgagtggt	ggaaggtgta	cccctccagc	gtgaccgagt	tcaagttcct	gttcgtgtcc	2640
ggccacttca	agggcaacta	caaggcccag	ctgaccaggc	tgaaccacat	caccaactgc	2700
aacggcgccg	tgctgtccgt	ggaggagctc	ctgatcggcg	gcgagatgat	caaggccggc	2760
accctgaccc	tggaggaggt	gaggaggaag	ttcaacaacg	gcgagatcaa	cttcgcggcc	2820
gactgataa						2829

<210> 99
 <211> 60
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo CTLA4_T01

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> nes a o c o t o g

15 <400> 99
ccatctcctc cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ctctacttcc tgaagacctg 60

<210> 100

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

5 <220>
 <223> Cebador directo CTLA4_T03/T04

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n e s a o c o t o g

15 <400> 100
ccatctcatt cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn acagttgaga gatggagggg 60

20 <210> 101
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador directo PDCD1_T01

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n e s a o c o t o g

35 <400> 101
ccatctcatt cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn ccacagaggt aggtgccgc 59

40 <210> 102
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador directo PDCD1_T03

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(40)
 <223> n e s a o c o t o g

55 <400> 102
ccatctcatt cctgcgtgtc tccgactcag nnnnnnnnnn gacagagatg ccggtcacca 60

60 <210> 103
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Cebador inverso CTLA4_T01

70 <400> 103
cctatccctt gtgtgccttg gcagttctcag tggaatacag agccagccaa 50

75 <210> 104
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

80 <220>

ES 2 828 669 T3

<223> Cebador inverso CTLA4_T03/04

<400> 104
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag ggtgcccgtg cagatggaat 50

5
<210> 105
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Cebador inverso PDCD1_T01

<400> 105
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag ggctctgcag tggaggccag 50

15
<210> 106
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Cebador inverso PDCD1_T03

25
<400> 106
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag ggacaacgcc accttcacct 50

30
<210> 107
<211> 281
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35
<220>
<223> pTalfa-FL

<400> 107

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		

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	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> pTalfa-DeltaI δ

<400> 108

```

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 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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa-Delta48

<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 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> 110
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pTalfa-Delta62

<400> 110

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 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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pTalfa-Delta78

<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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa-Delta92

<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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pTalfa-Delta110

<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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa-Delta114

<400> 114

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
165

<210> 115
 <211> 344
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> pTalfa-FL-CD28

 10 <400> 115

 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 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> pTalfa-FL-CD8

<400> 116

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 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

<210> 117

<211> 325
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> pTalfa-FL-4IBB

<400> 117

```

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 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 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 Glu
 305 310 315 320

Gly Gly Cys Glu Leu
 325

<210> 118
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> pTalfa-Delta48-CD28

<400> 118

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	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

<400> 119

ES 2 828 669 T3

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 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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa-Delta48-41BB

<400> 120

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 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 Glu
260 265 270

Gly Gly Cys Glu Leu
275

<210> 121

<211> 172

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa-Delta114-TCRalfa.IC

<400> 121

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 Arg Leu Trp Ser Ser
165 170

<210> 122

<211> 173

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa.EC-TCRalfa. TM. IC

<400> 122

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

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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa.EC-Delta48-1xMUT

<400> 123

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 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 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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> pTalfa.EC-Delta48-4xMUT

<400> 124

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 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 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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CAR multicatenario

<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

Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 130 135 140
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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 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 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

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	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				

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	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					720
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					800
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

atggctcctg	ccatggaatc	ccctaactcta	ctgtgtgttag	ccttactgtt	cttcgctcca	60
gatggcgtgt	tagcagaggt	gcagttgcag	cagtcagggc	cagagttgat	taagcccgga	120
gcctccgtca	agatgtcctg	caaggccagc	gggtacactt	tcaccagcta	cgtcatgcat	180
tgggtgaagc	agaagccagg	ccaggggctt	gagtggtattg	ggtacatcaa	cccctacaac	240
gacgggacca	aatacaacga	gaaattcaag	ggcaaagcca	cactcacctc	cgataagtcc	300
tcctctaccg	cctacatgga	gctcagctcc	ctgacctccg	aggatagcgc	tgtgtattac	360
tgcgcaaggg	gcacatacta	ctatggctct	agggtgttcg	actactgggg	gcaggggcaact	420
actctcacag	tgagctcagg	cggaggaggc	agtggcggag	ggggaagtgg	gggcggcggc	480
agcgatattg	tcatgaccca	ggcagccctt	agtatccctg	tgactccagg	cgagagcgtg	540
agcatcagct	gcgggtccag	caagagcctg	ctgaacagta	acggaaacac	atacctctac	600
tggtttctgc	agaggcccg	ccagagccct	cagctgctga	tttaccgcat	gtcaaatctt	660
gcctctgggg	tgcccgatag	atttagtggtg	agcggatccg	gcacagcttt	tacattgcgg	720
atctccagag	tcgaggccga	agacgtgggg	gtctattact	gtatgcaaca	cctggaatac	780
ccctttacct	tcggagccgg	cacaaagctg	gagctgaagc	gggctgacac	cacaaccccc	840
gctccaaggc	cccctacccc	cgcaccaact	attgcctccc	agccactctc	actgcggcct	900
gaggcctgtc	ggcccogctgc	tggaggcgca	gtgcatacaa	ggggcctcga	tttcgcctgc	960
gattttttta	tcccattggt	ggtggtgatt	ctggttgctg	tggacacagg	attatttatc	1020
tcaactcagc	agcaggtcac	atctctcttg	aagattaaga	gaaccaggaa	aggcttcaga	1080
cttctgaacc	cacatcctaa	gccccacccc	aaaaacaaca	gagccgaggg	cagaggcagc	1140
ctgctgacct	gcggcgacgt	ggaggagAAC	ccaggcccca	tggacacaga	aagtaatagg	1200
agagcaaatc	ttgctctccc	acaggagcct	tccagtgtgc	ctgcatttga	agtcttgga	1260
atatctcccc	aggaagtata	ttcaggcaga	ctattgaagt	cggcctcatc	cccaccactg	1320
catacatggc	tgacagtttt	gaaaaaagag	caggagttcc	tgggggtaac	acaaattctg	1380
actgctatga	tatgcctttg	ttttggaaca	gttgctctgt	ctgtacttga	tatttcacac	1440
attgagggag	acattttttc	atcatttaaa	gcaggttata	cattctgggg	agccatattt	1500
ttttctattt	ctggaatgtt	gtcaattata	tctgaaagga	gaaatgcaac	atatctggtg	1560
agaggaagcc	tgggagcaaa	cactgccagc	agcatagctg	ggggaacggg	aattaccatc	1620
ctgatcatca	acctgaagaa	gagcttgccc	tatatccaca	tccacagttg	ccagaaattt	1680
tttgagacca	agtgccttat	ggcttccctt	tccactgaaa	ttgtagtgat	gatgctgttt	1740
ctcaccattc	tgggacttgg	tagtgctgtg	tcactcacia	tctgtggagc	tggggaagaa	1800
ctcaaaggaa	acaaggttcc	agagaaacgg	ggccggaaga	agctcctcta	catttttaag	1860
cagcctttca	tgcggccagt	gcagacaacc	caagaggagg	atgggtgttc	ctgcagattc	1920
cctgaggaag	aggaaggcgg	gtgcgagctg	ggttctggcg	tgaaacagac	tttgaatttt	1980
gaccttctca	agttggcggg	agacgtggag	tccaacccag	ggcccatgat	tccagcagtg	2040
gtcttgctct	tactcctttt	ggttgaacaa	gcagcggccc	tgggagagcc	tcagctctgc	2100
tatatcctgg	atgcoatcct	gtttctgtat	ggaattgtcc	tcacctcct	ctactgtcga	2160
ctgaagatcc	aagtgcgaaa	ggcagctata	accagctatg	agaaatcaag	agtgaagtcc	2220
tccaggagcg	cagatgcccc	cgcctatcaa	cagggccaga	accagctcta	caacgagctt	2280
aacctcgga	ggcgcgaga	atacgacgtg	ttggataaga	gaagggggcg	ggaccccag	2340
atgggaggaa	agccccggag	gaagaacctt	caggaggggc	tgtacaacga	gctgcagaag	2400
gataagatgg	ccgaggcccta	ctcagagatc	gggatgaagg	gggagcggcg	ccgcgggaag	2460
gggcacgatg	ggctctacca	ggggctgagc	acagccacaa	aggacacata	cgacgccttg	2520
cacatgcagg	cccttcaccc	ccggtga				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.

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:
- 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.

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.

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.

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.

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.

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+.

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.

13. El linfocito T aislado de la reivindicación 12, en donde dicho receptor quimérico de antígenos es un receptor quimérico de antígenos multcatenario.

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.

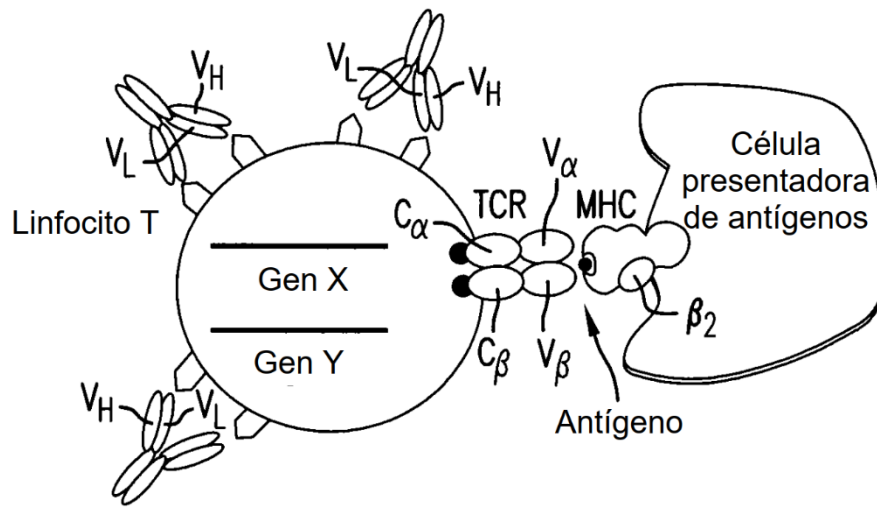


Fig.1

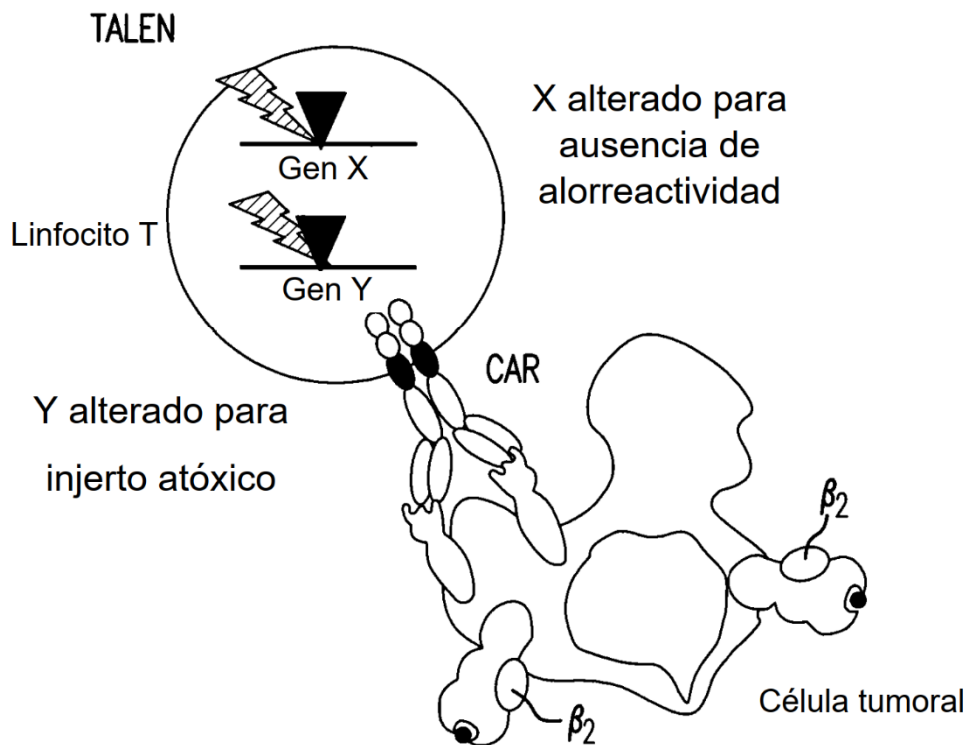
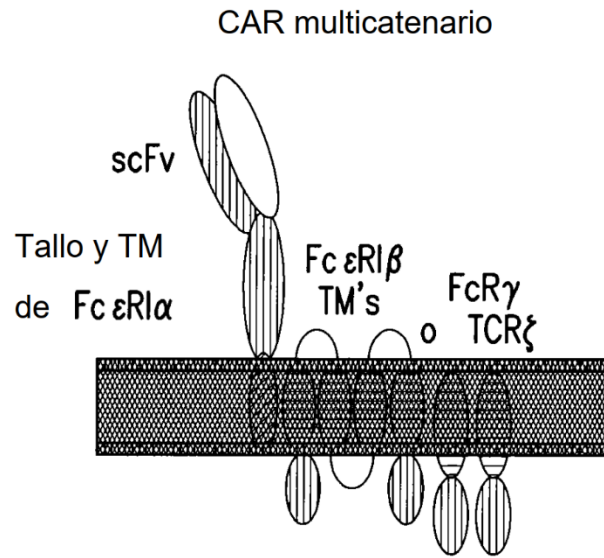


Fig.2



Activación
de dominios
de señalización

- La cadena beta permite que todos los dominios de señalización estén en la posición yuxtamembranaria natural
- La cadena beta ya está colocada para las interacciones de las señales que provienen de $FcR\gamma$ o $TCR\zeta$

Fig.3

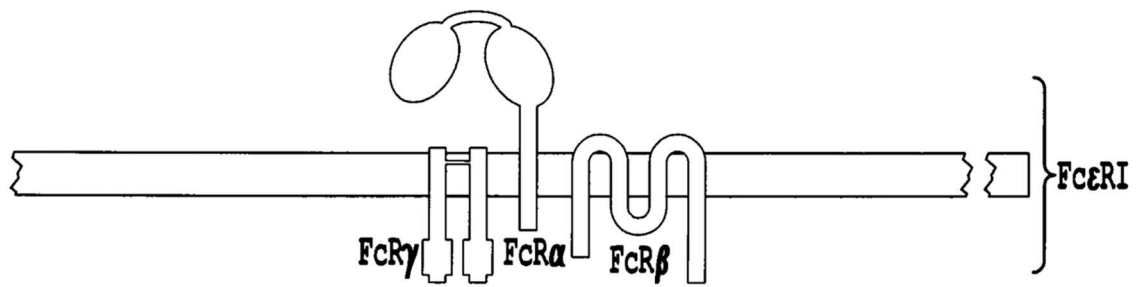


Fig. 4A

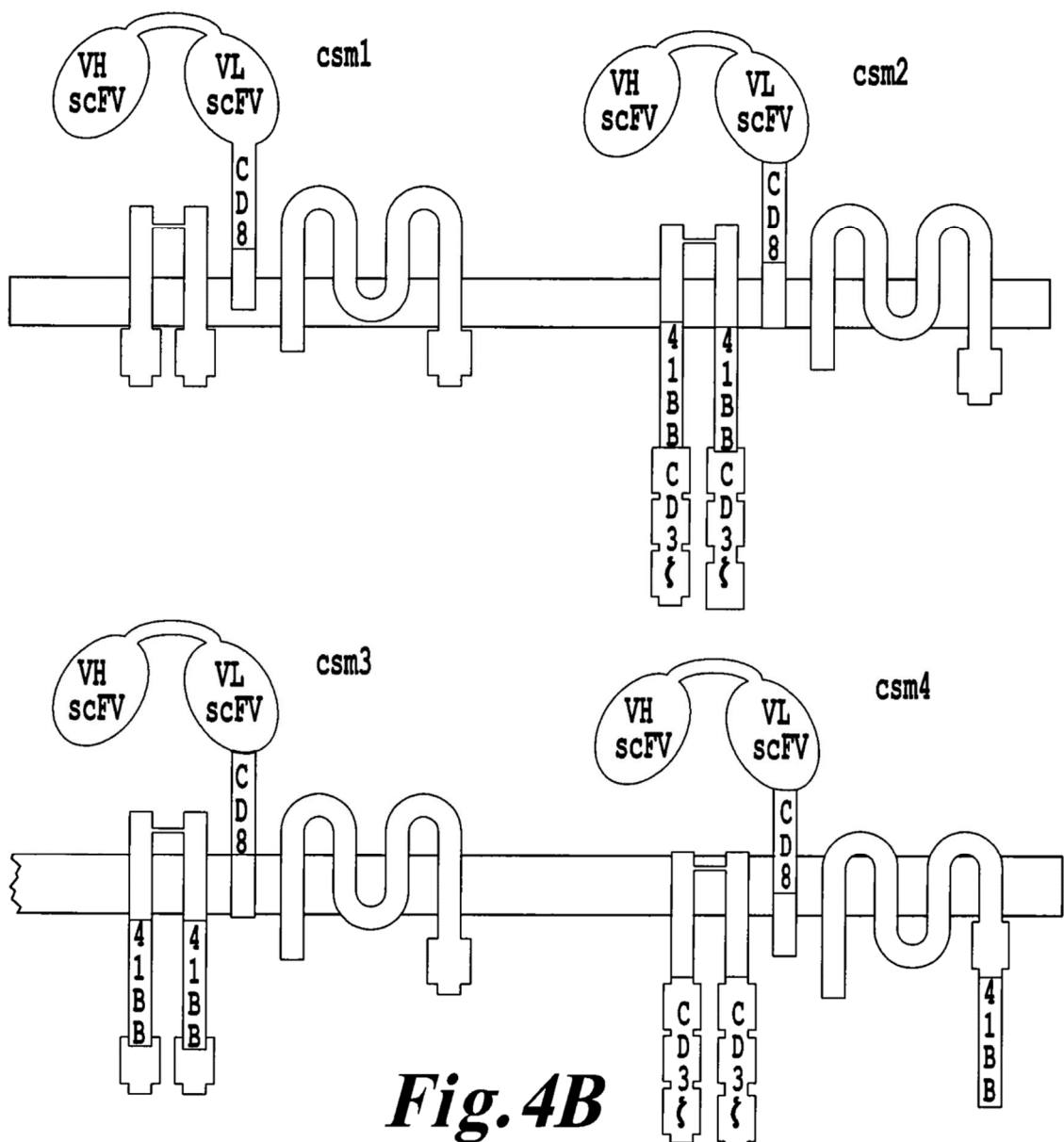


Fig. 4B

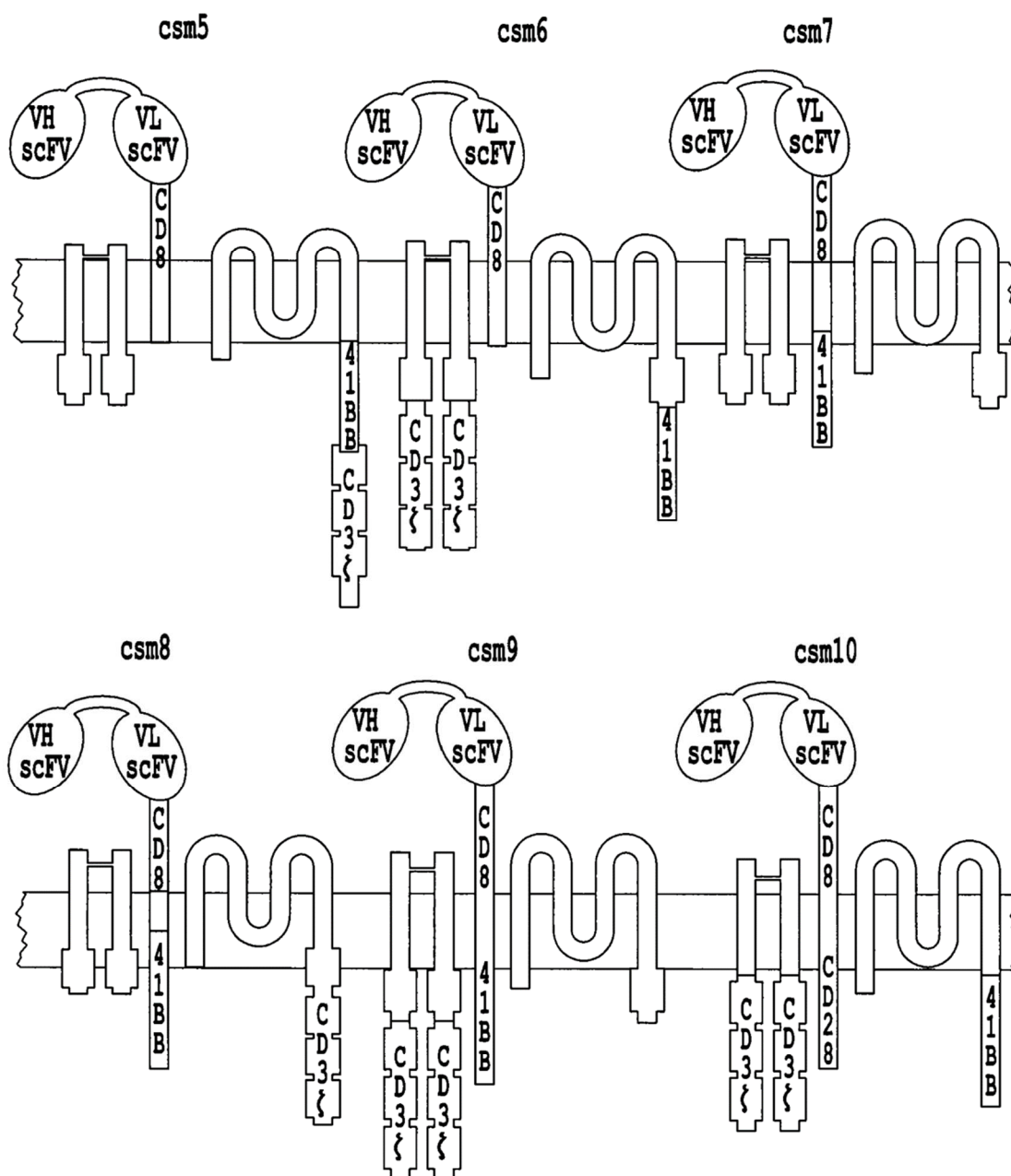
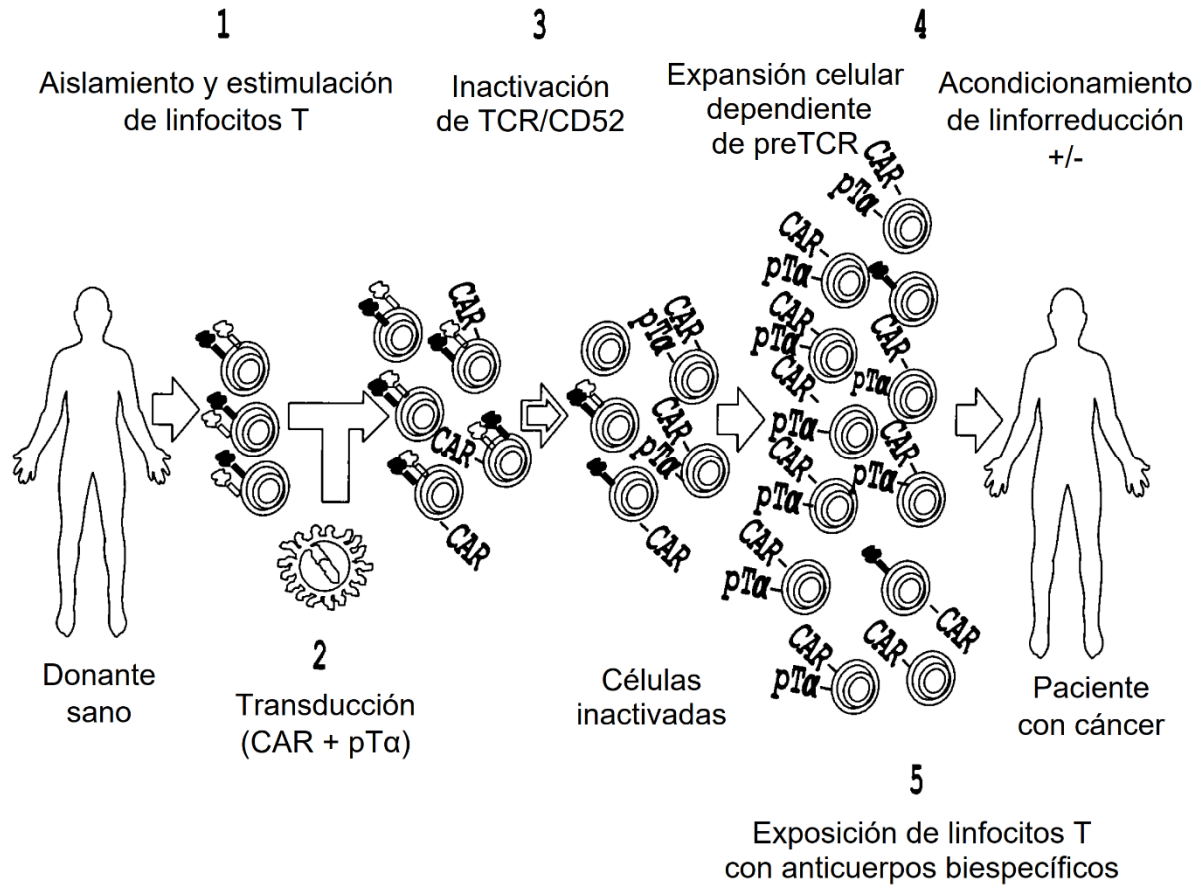


Fig.4C





-  **CD52** La alteración de CD52 proporciona resistencia a quimioterapia
-  **TCR** La alteración de TCR α elimina la alorreactividad (GvHD)
- CAR** Redirección de linfocitos T/reconocimiento del tumor
- pTa** pre-TCR α (pTa) dirige la proliferación celular

Fig.5

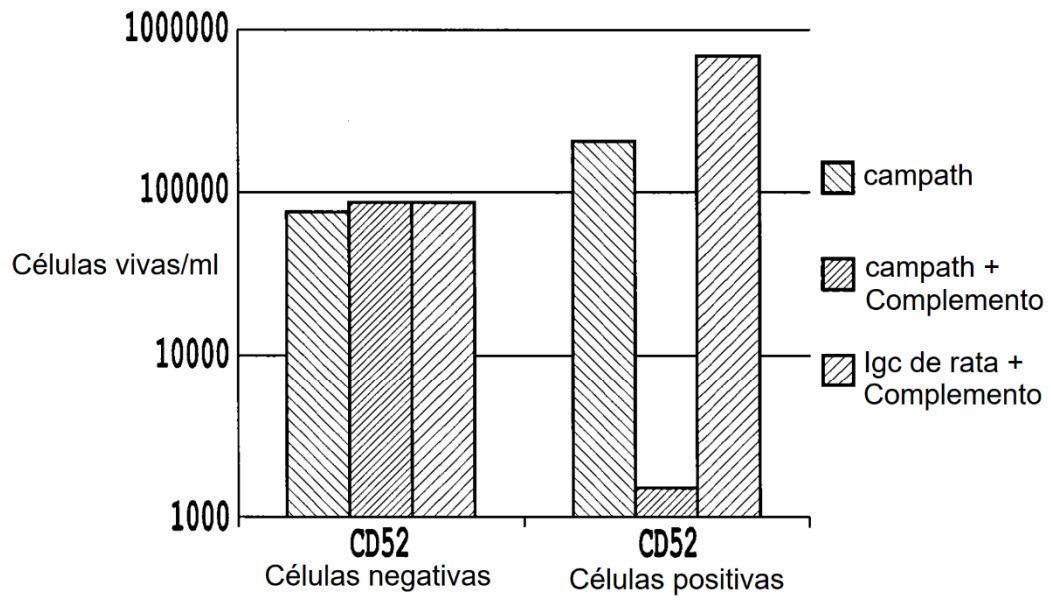


Fig. 6

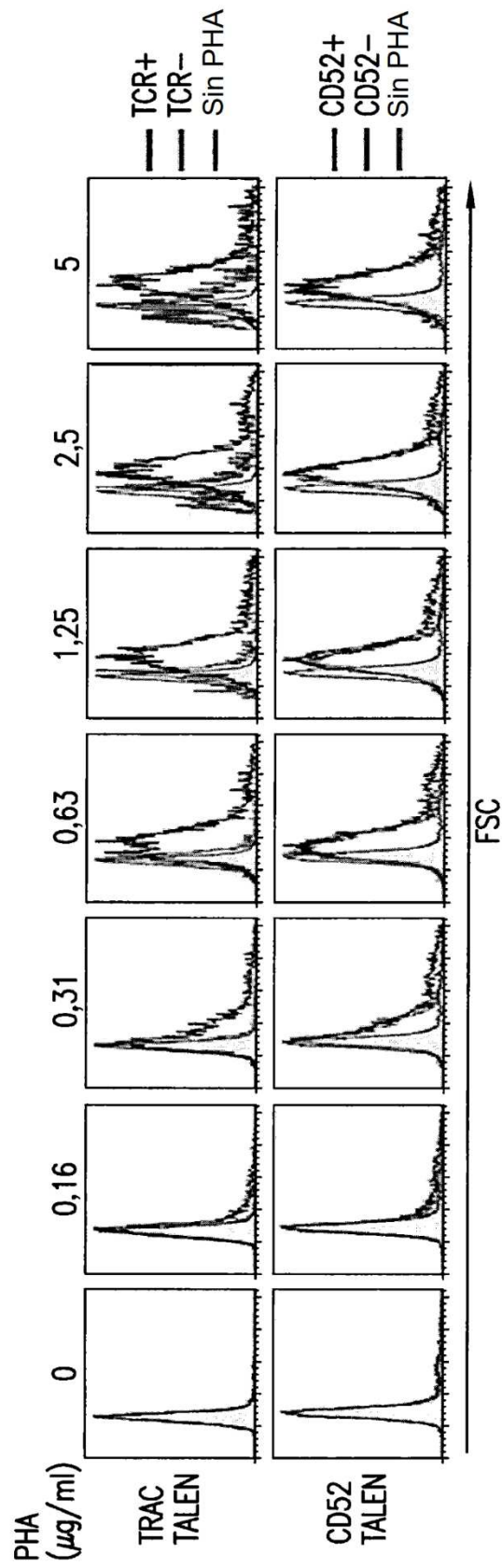


Fig. 7

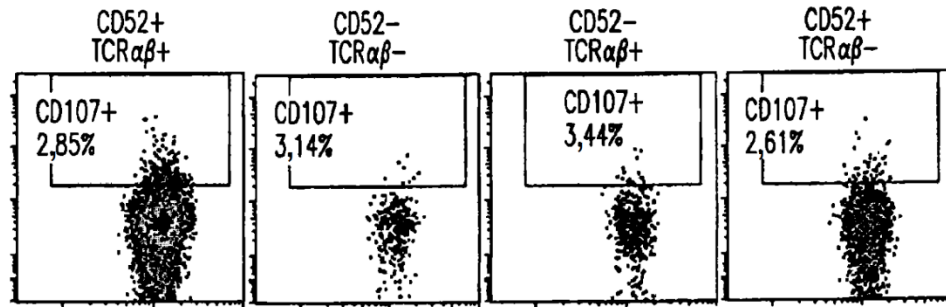


Fig. 8A

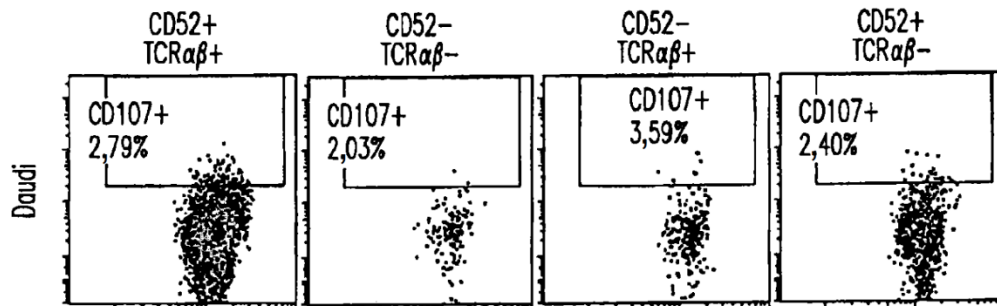


Fig. 8B

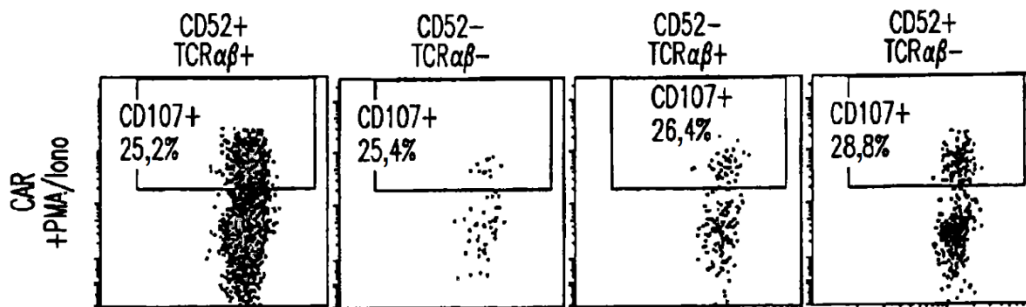


Fig. 8C

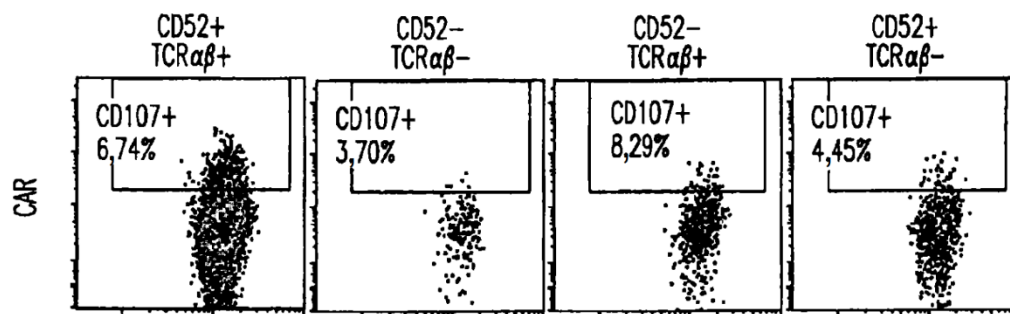


Fig.8D

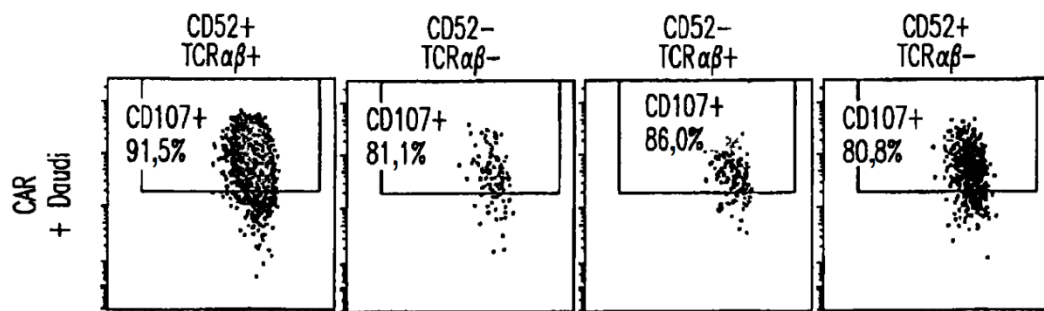


Fig.8E

	DIANA DE LA MITAD IZQUIERDA	Tamaño de espacia- dor (pb)	DIANA DE LA MITAD DERECHA		
TRAC	TTGTCCACAGATATCC	15	CCGTGTACCCAGCTGAGA		
CD52	TTCCTCCTACTCACCAT	15	GGTACAGGTAAGAGCA A		
Posibles dianas inespecíficas	Secuencia emparejada izquierda	Tamaño de espacia- dor (pb)	Secuencia emparejada derecha	Empare- jamien- tos incorec- tos	
1	ttgctctCaccAgtaTA	25	TtTtcaggtaagTgcaa	8	
2	tCActcttacctgGacc	19	CCtacaggtaagGgcCa	7	
3	tctcagAtgAtacacCC	24	AgtacaggCaTgagcCa	8	
4	tGAtcccacagaAatAc	18	gCatTtctgtgggaTCa	8	
5	ttCctctAacctgtaTT	25	gAtCcaggtaagGTcaa	8	
6	tAgtcccCagatatGA	19	aAggtgTgGaTgaggaa	8	
7	ttgtcAcacaTataCcG	21	TgGtatTtgtgTgacaa	8	
8	tAActcttacctgtaGT	16	AgatTtctCtgggGcaa	8	
9	ttActccAactAacTat	16	ccgtTtaccGgctTaga	7	
10	tGgctcAtacctgtaGT	14	aGgAtgagGTggaggaa	8	
11	ttgtcAtacAtgtGcA	21	atgCtgTgtaggTggTa	8	
12	ttgtcccacagaCatTc	18	ccACgtaGcagctgGga	6	
13	tcAcaCctggtacaTAg	27	GtgTtTagtaggGggaa	8	
14	ttgtcccacagCtaCcc	29	gAgtCtTtgtAggacaa	6	
15	tctcaActgAAacaAgg	23	TgtaAtgTCaagagcaa	8	

Fig. 9A

	Transfección de control (Sin ARN)			Transfección con CD52-TALEN+TRAC+TALEN		
	Número sec. analiza- das	Núme- ro indeles	Indeles de frecuencia (menos de)	Número sec. analiza- das	Núme- ro 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

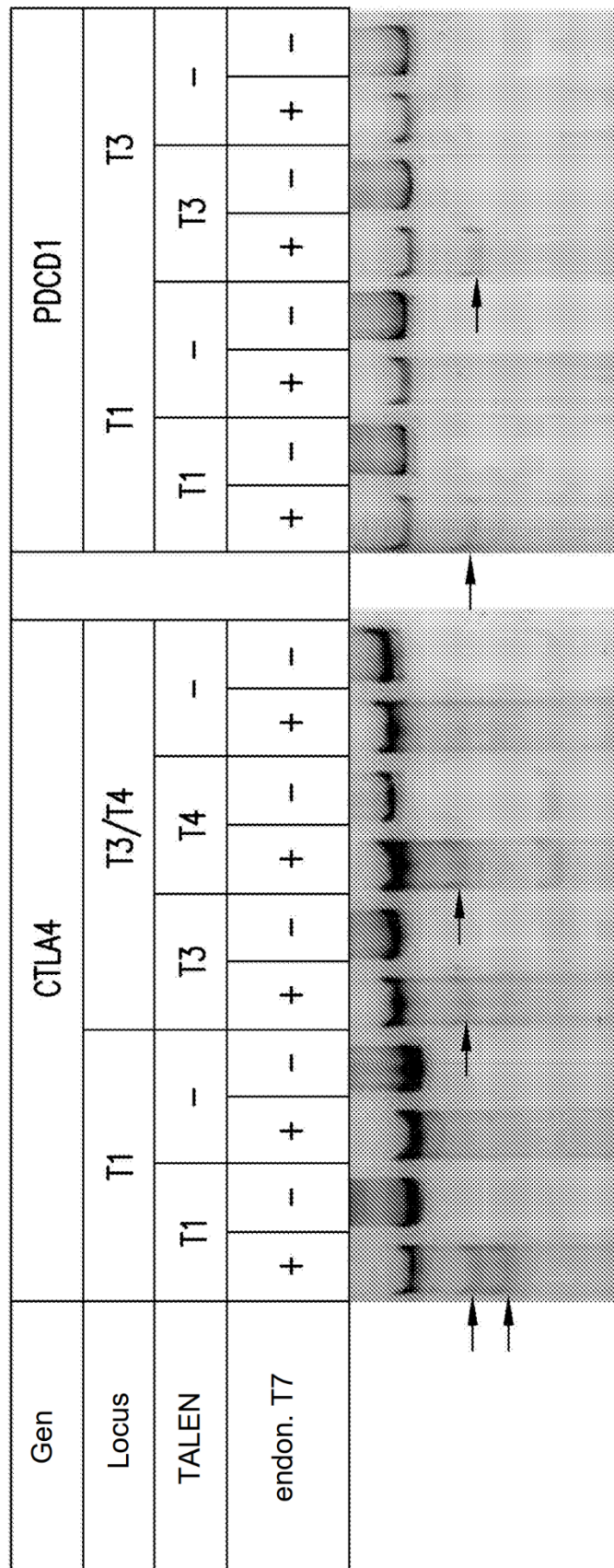


Fig.10

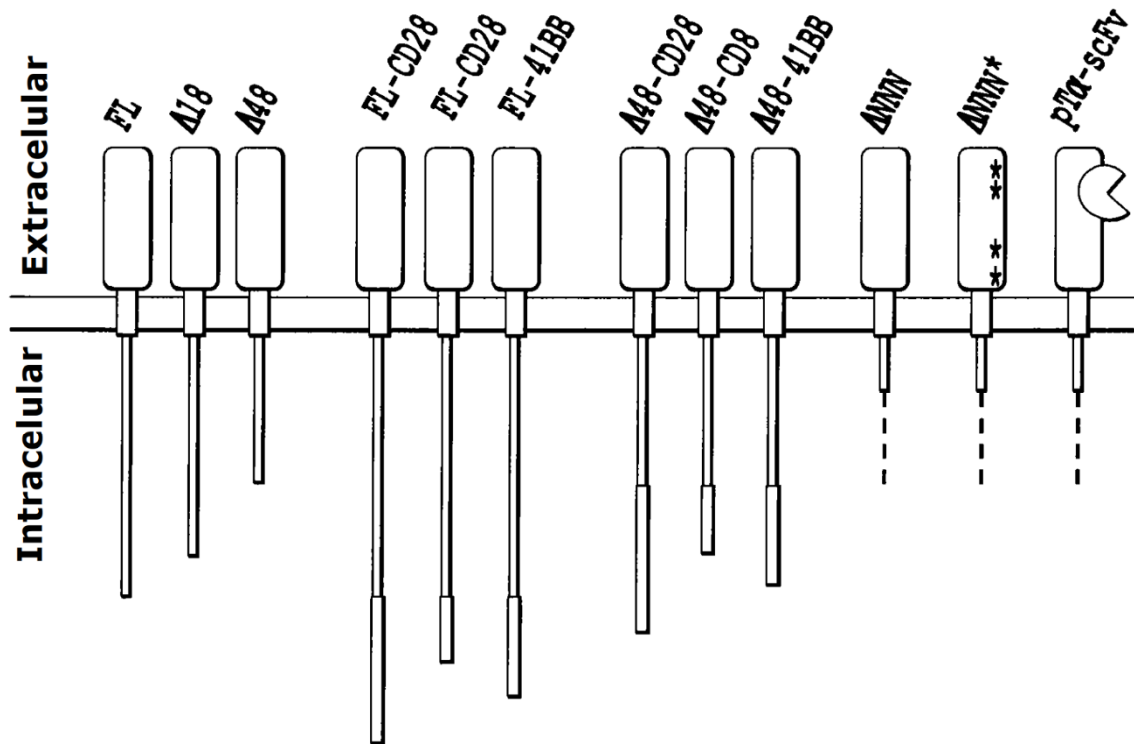


Fig. 11



Fig. 13

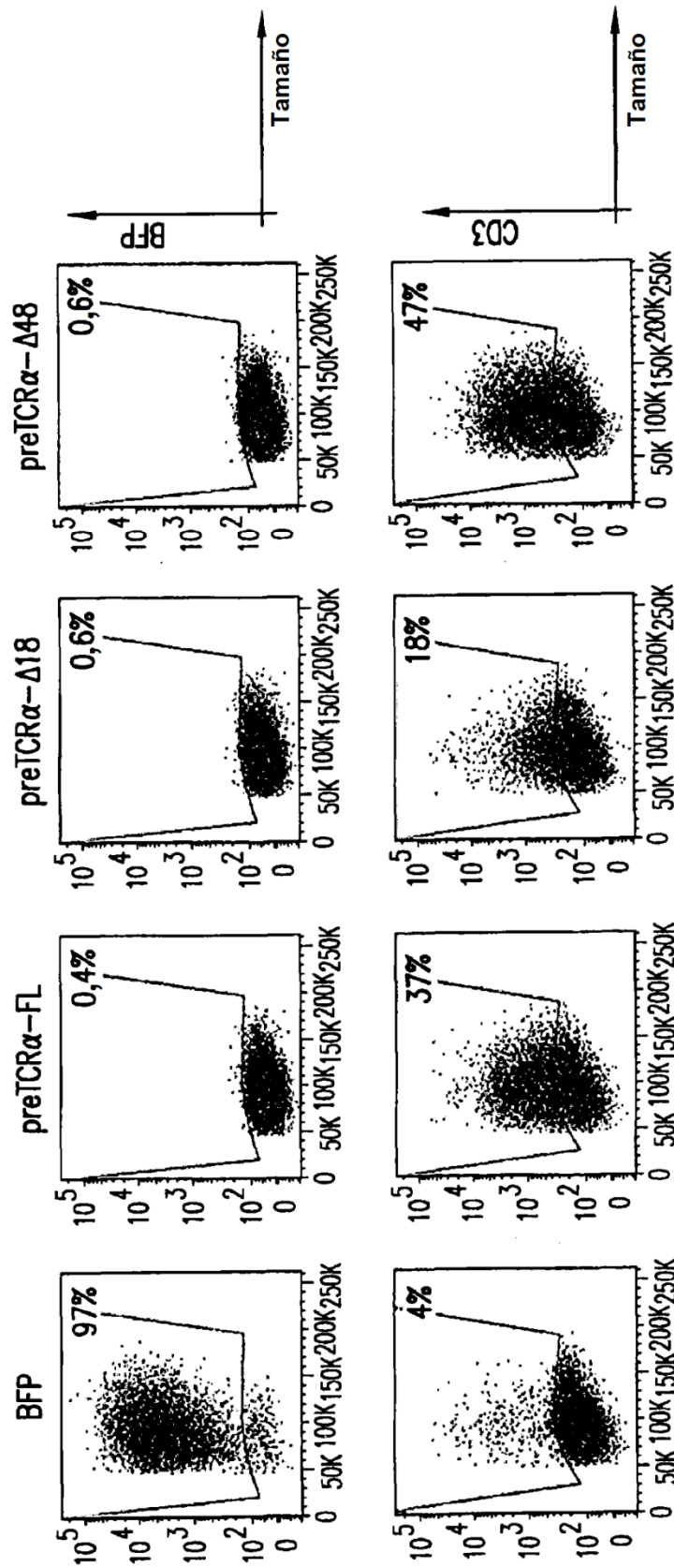


Fig.12

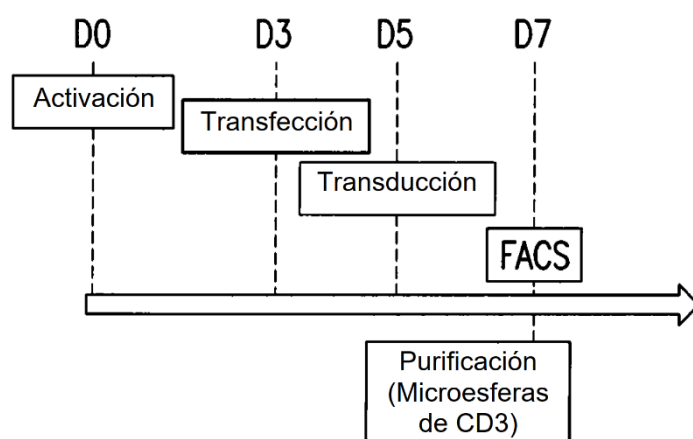


Fig.14A

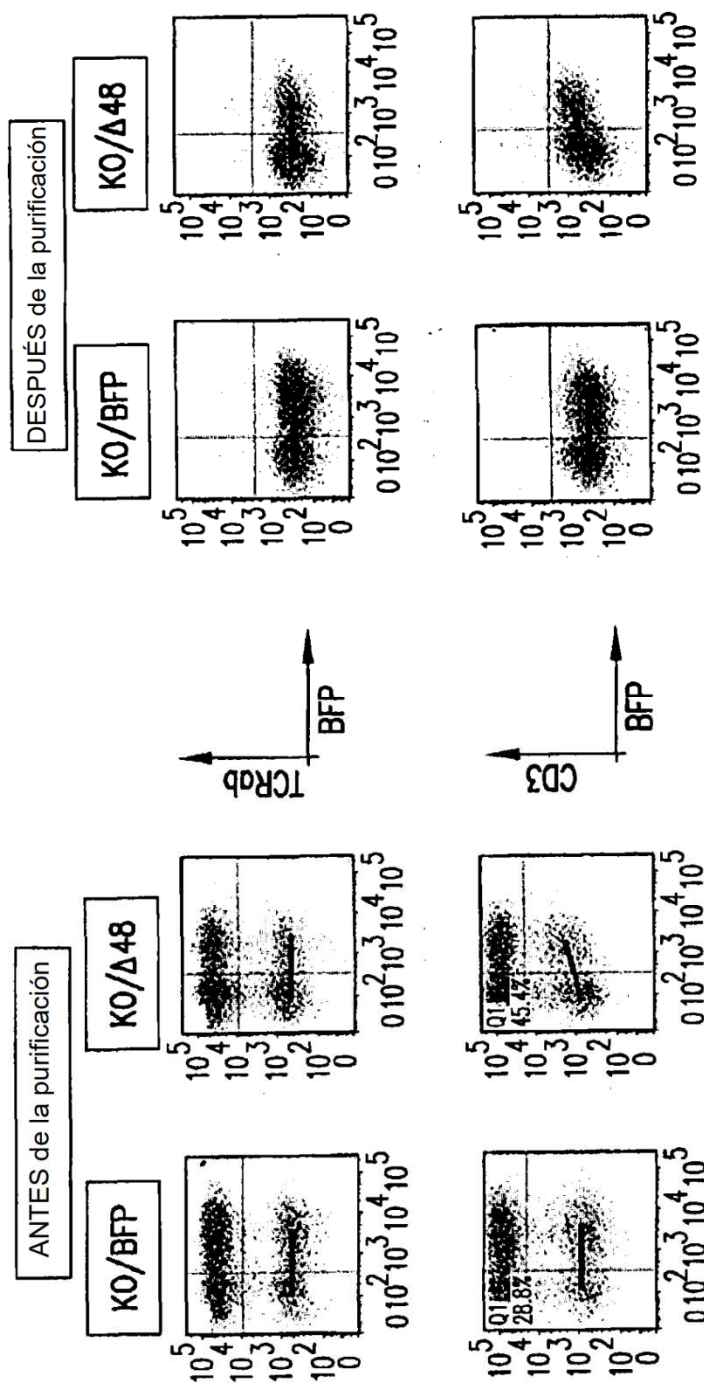


Fig. 14B

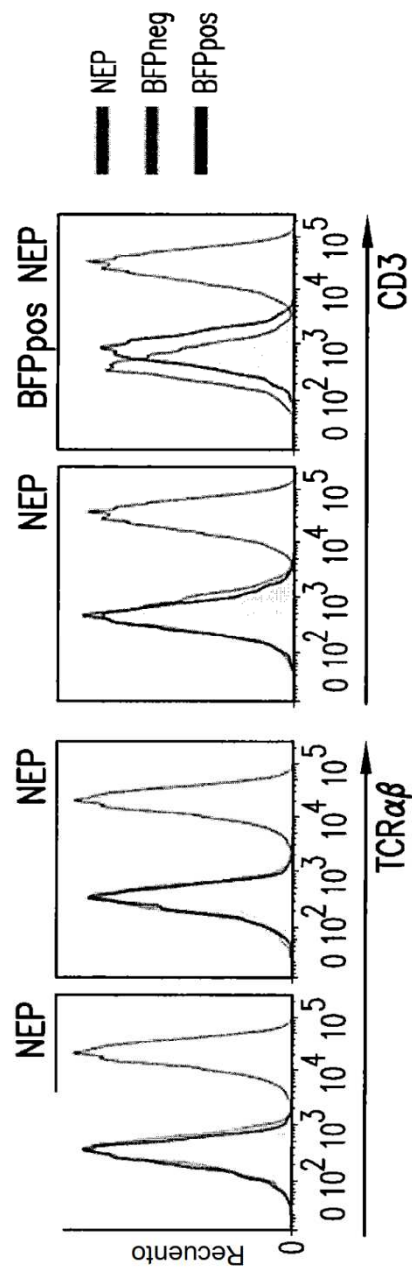


Fig.14C

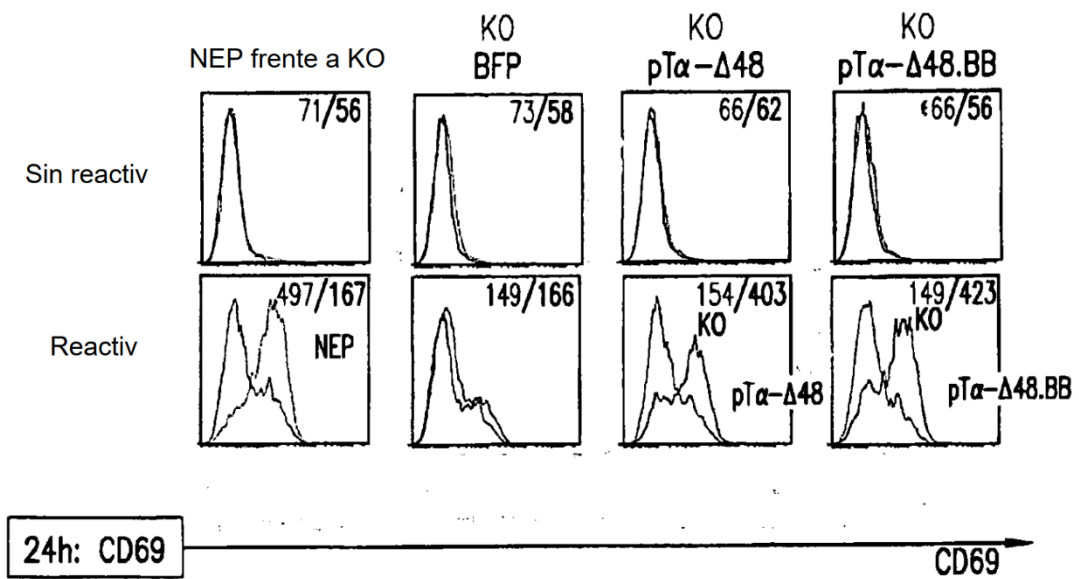


Fig.15A

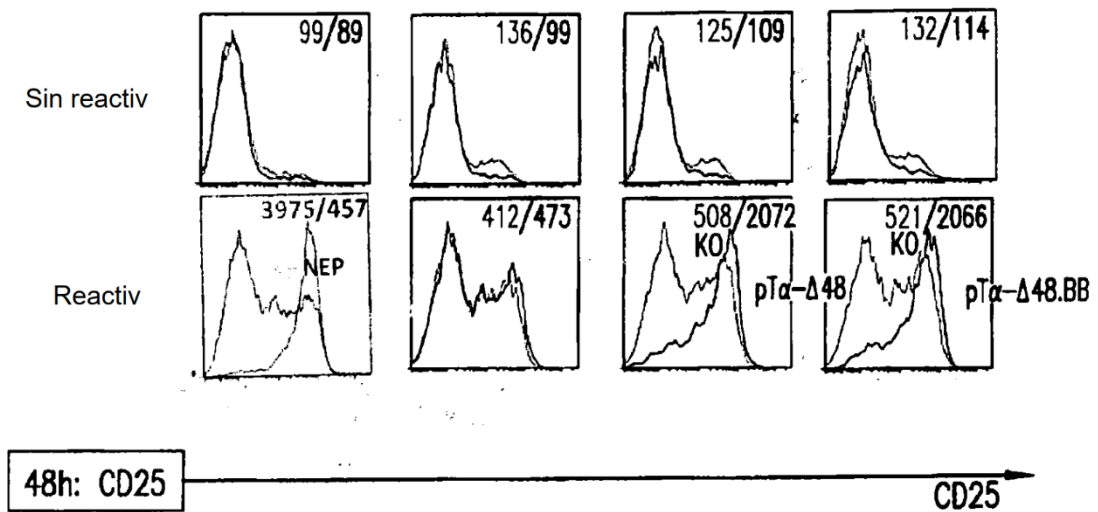


Fig.15B

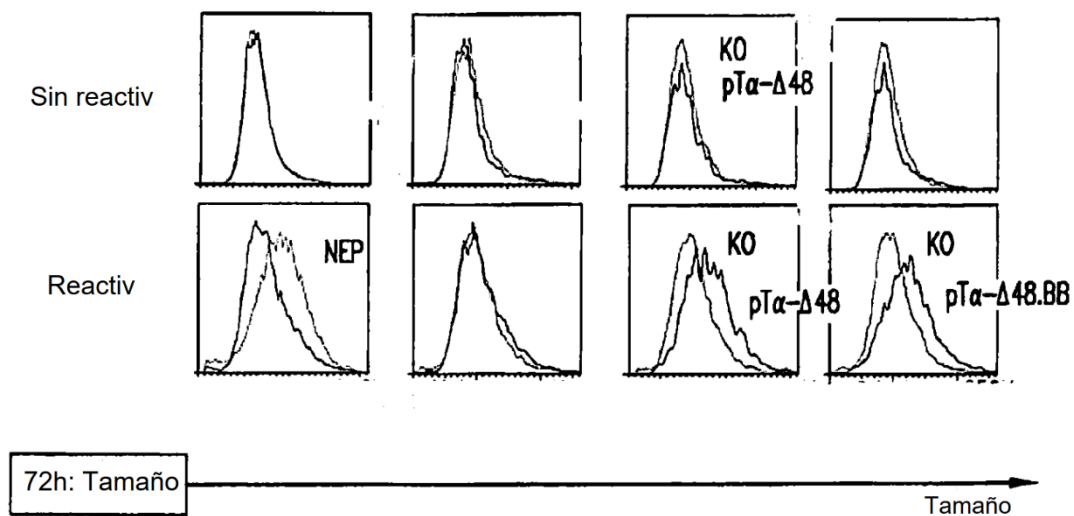


Fig.15C

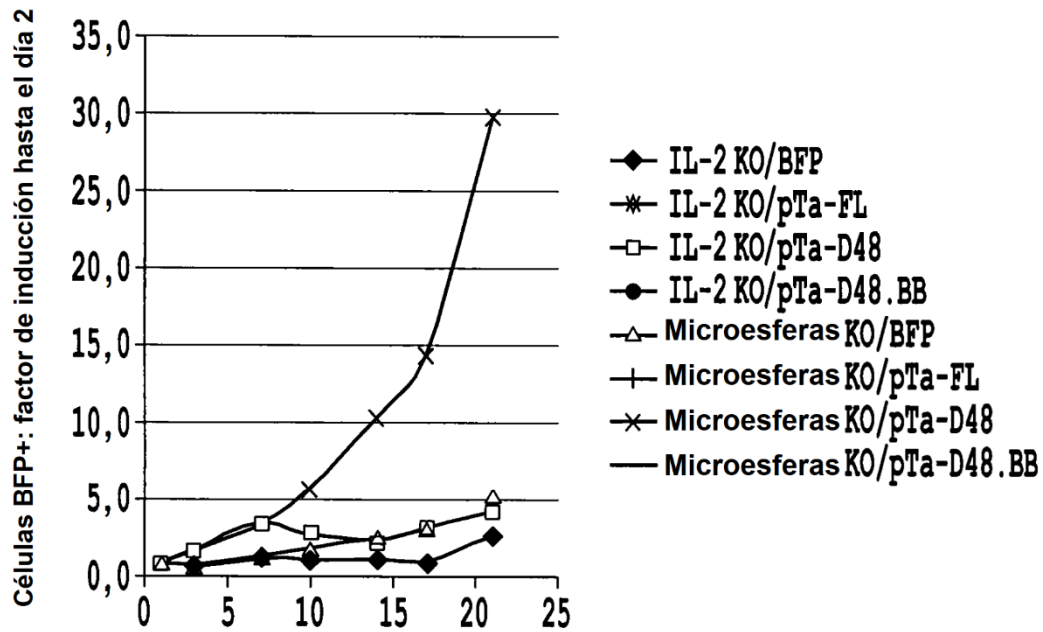


Fig. 16A

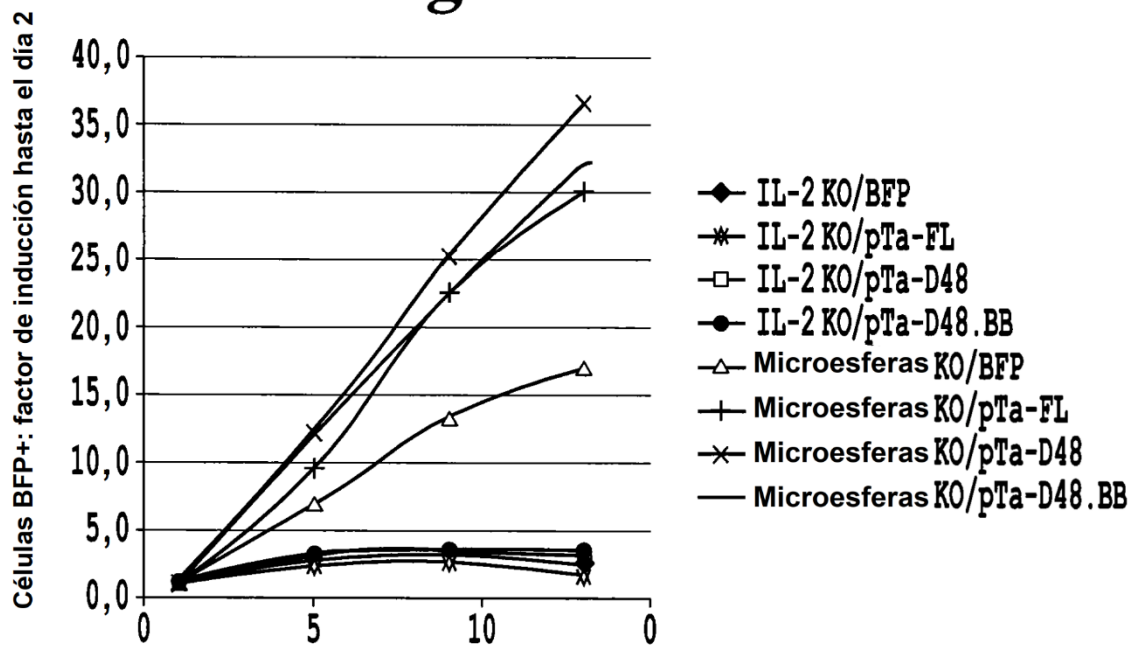


Fig. 16B

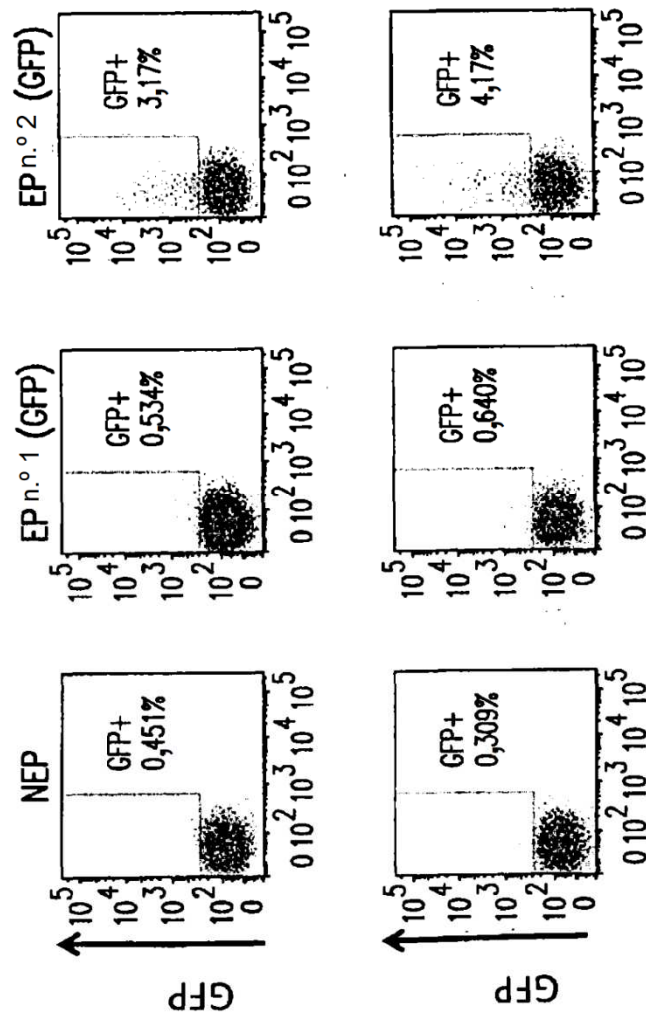


Fig. 17

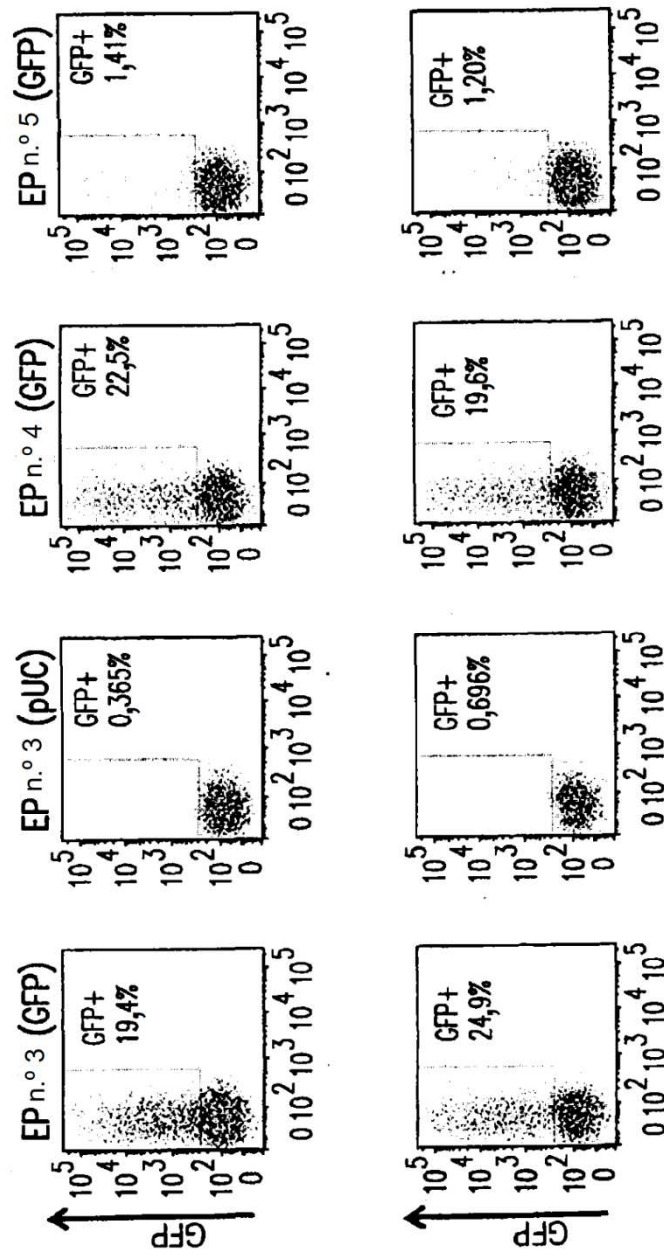


Fig.17-1

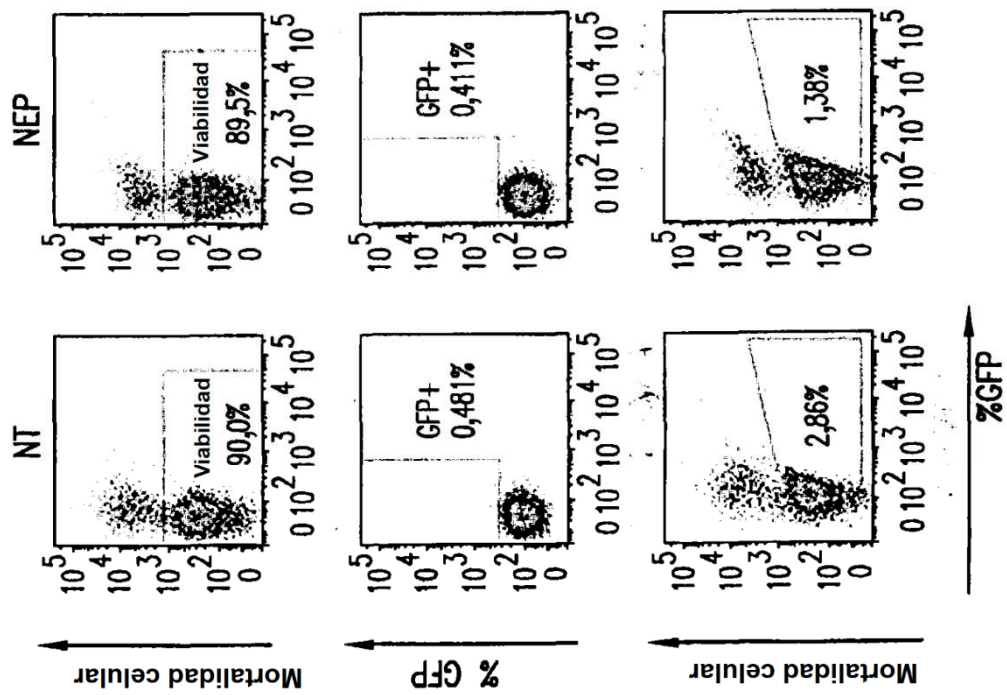


Fig. 18

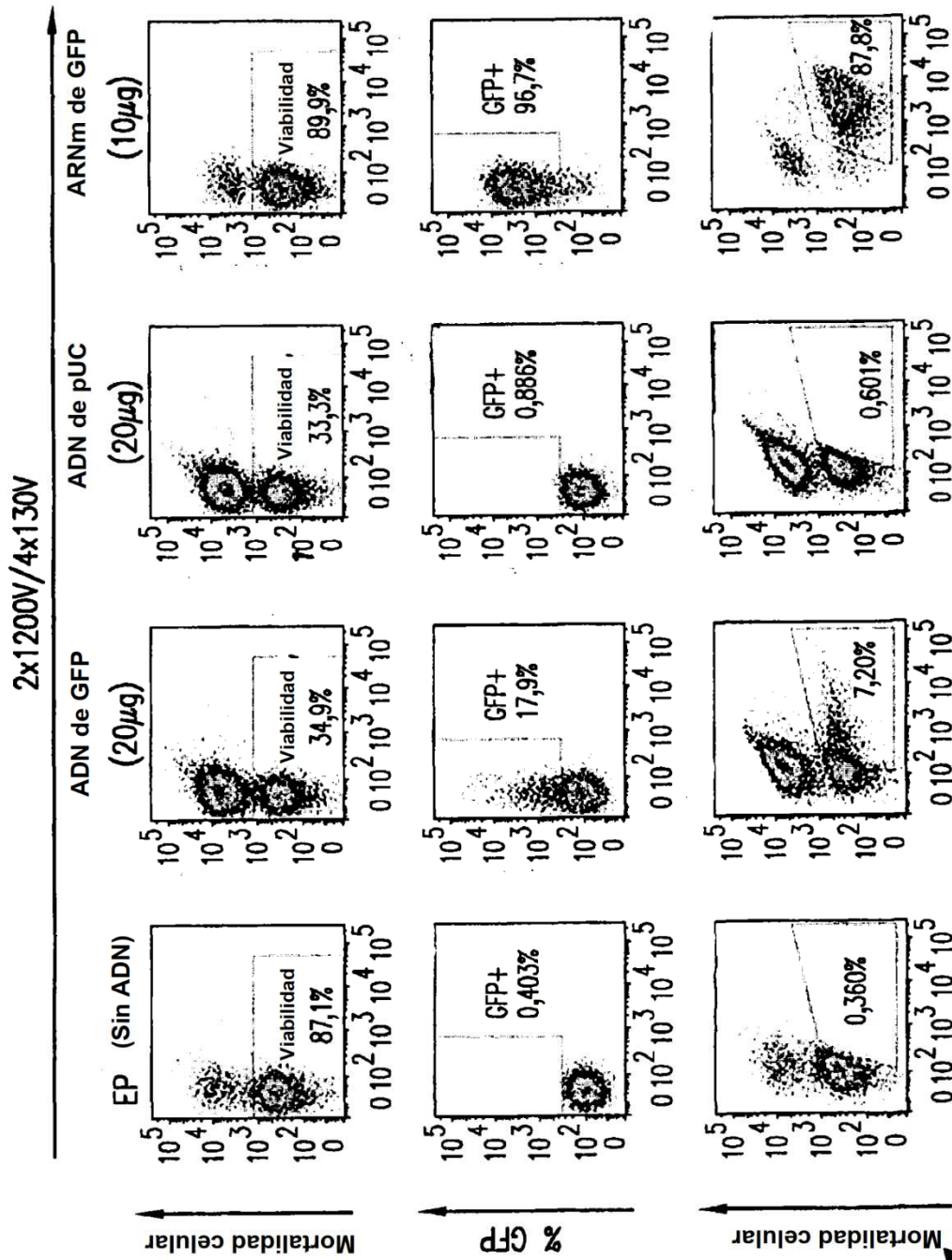


Fig.18-1



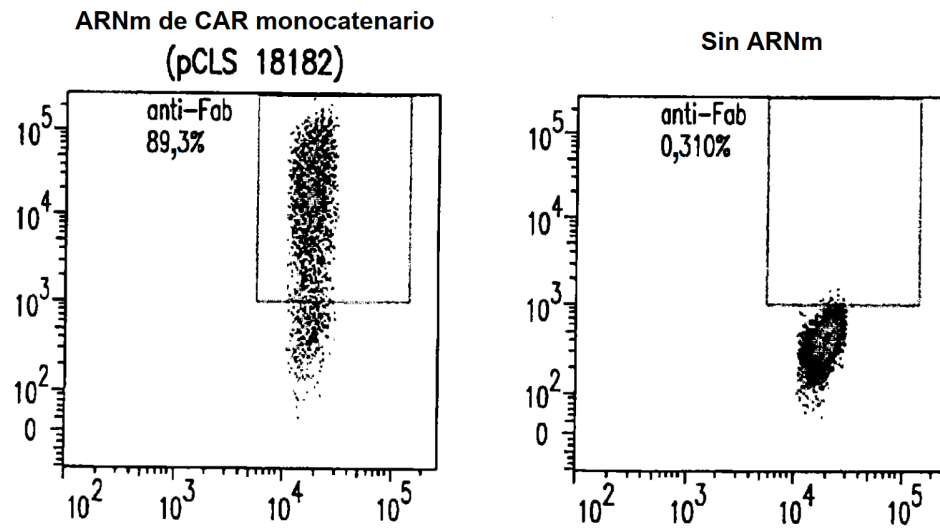


Fig.20A

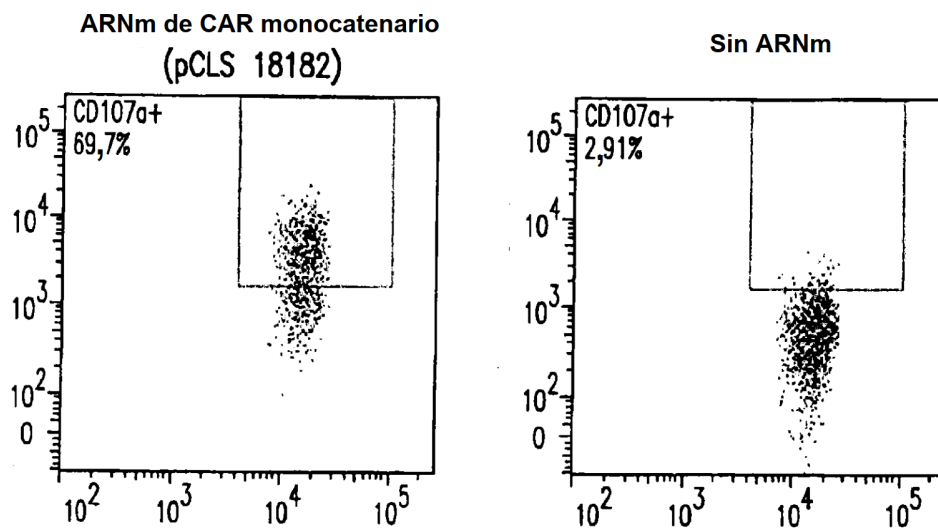


Fig.20B

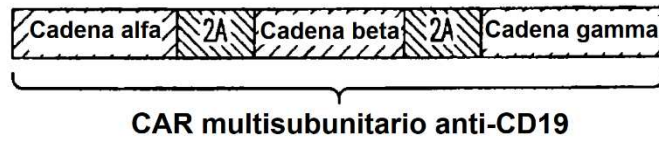


Fig.21A

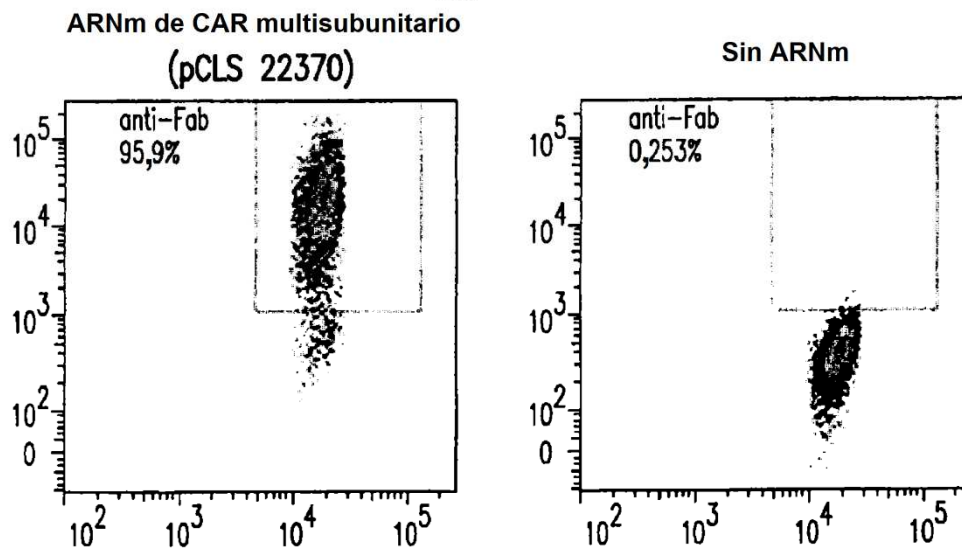


Fig.21B

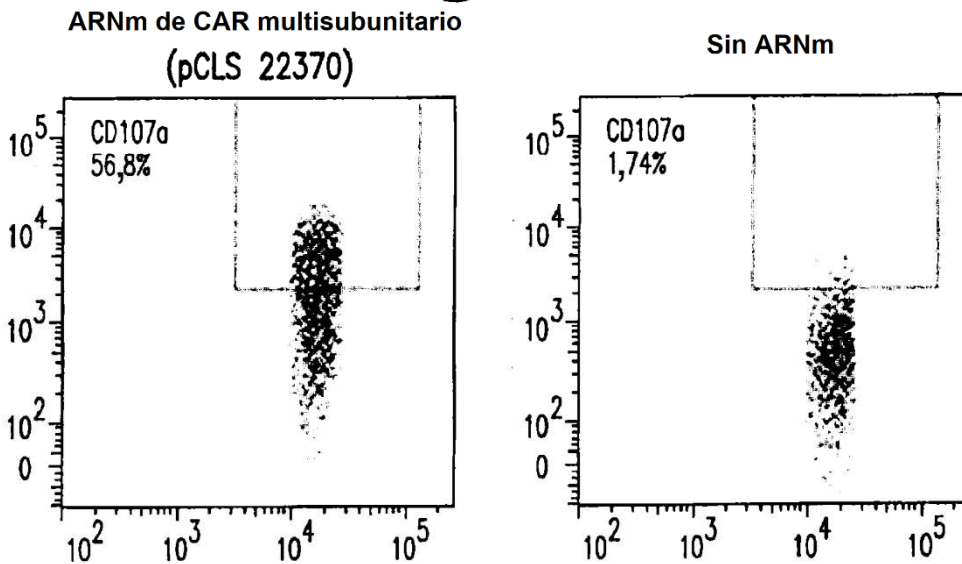


Fig.21C

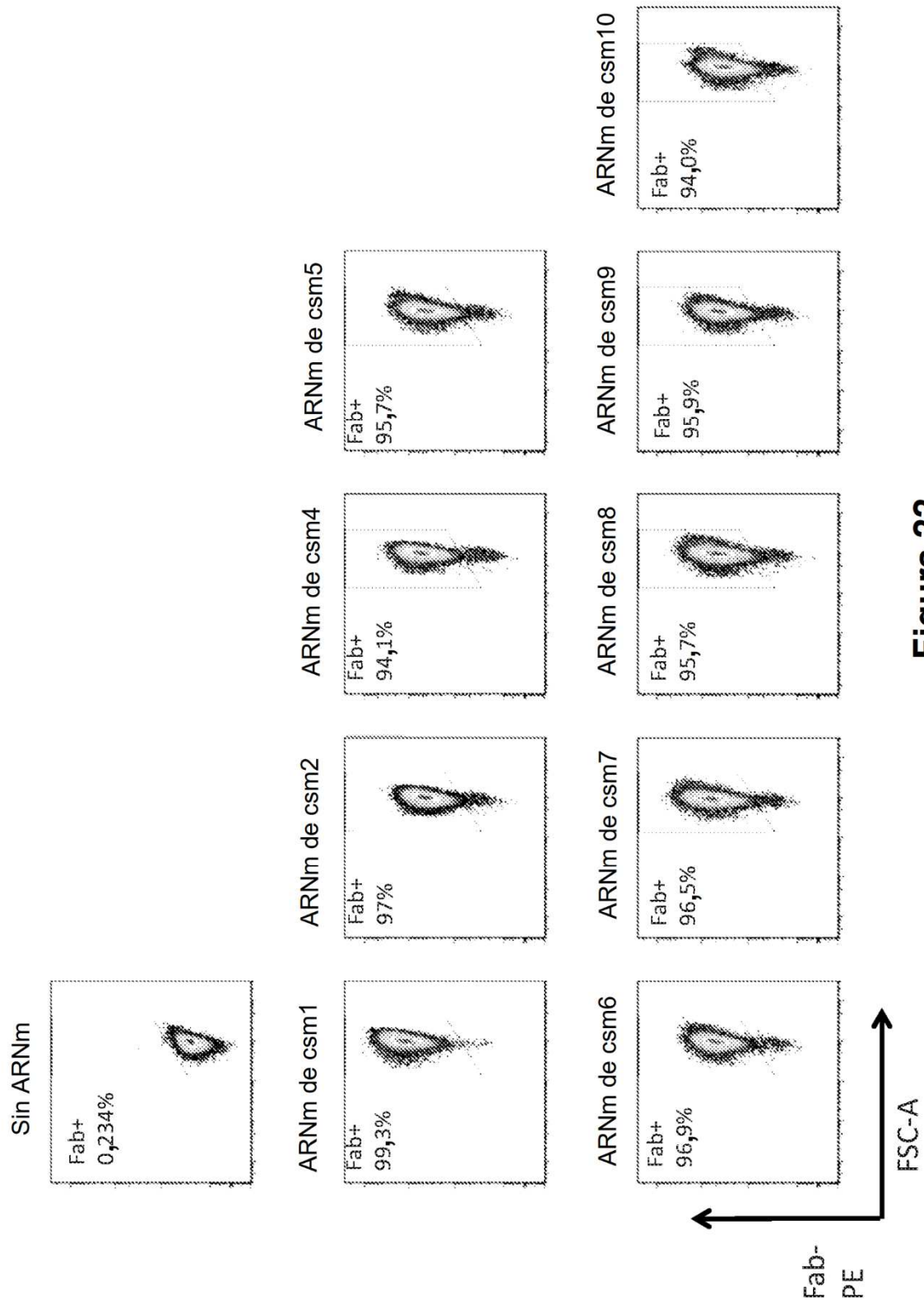


Figura 22

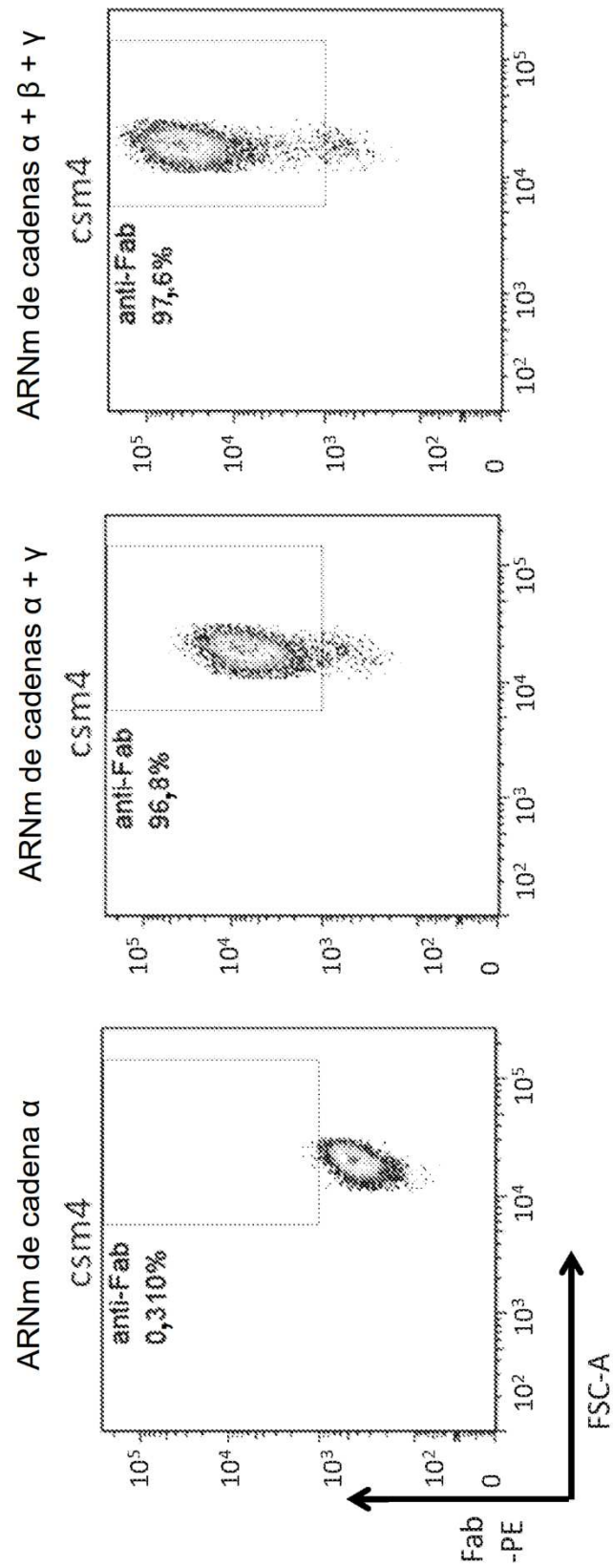


Figura 23

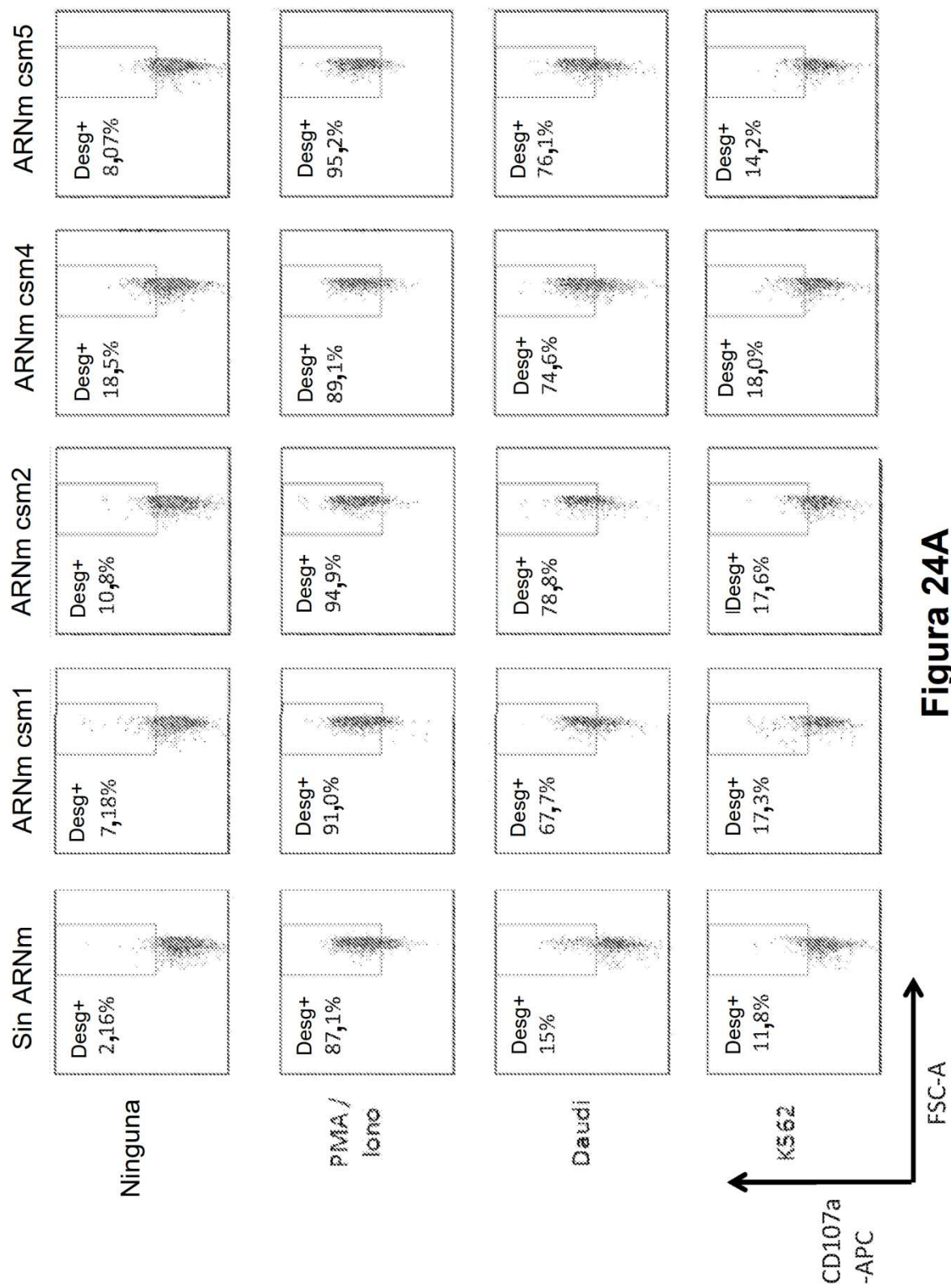


Figura 24A

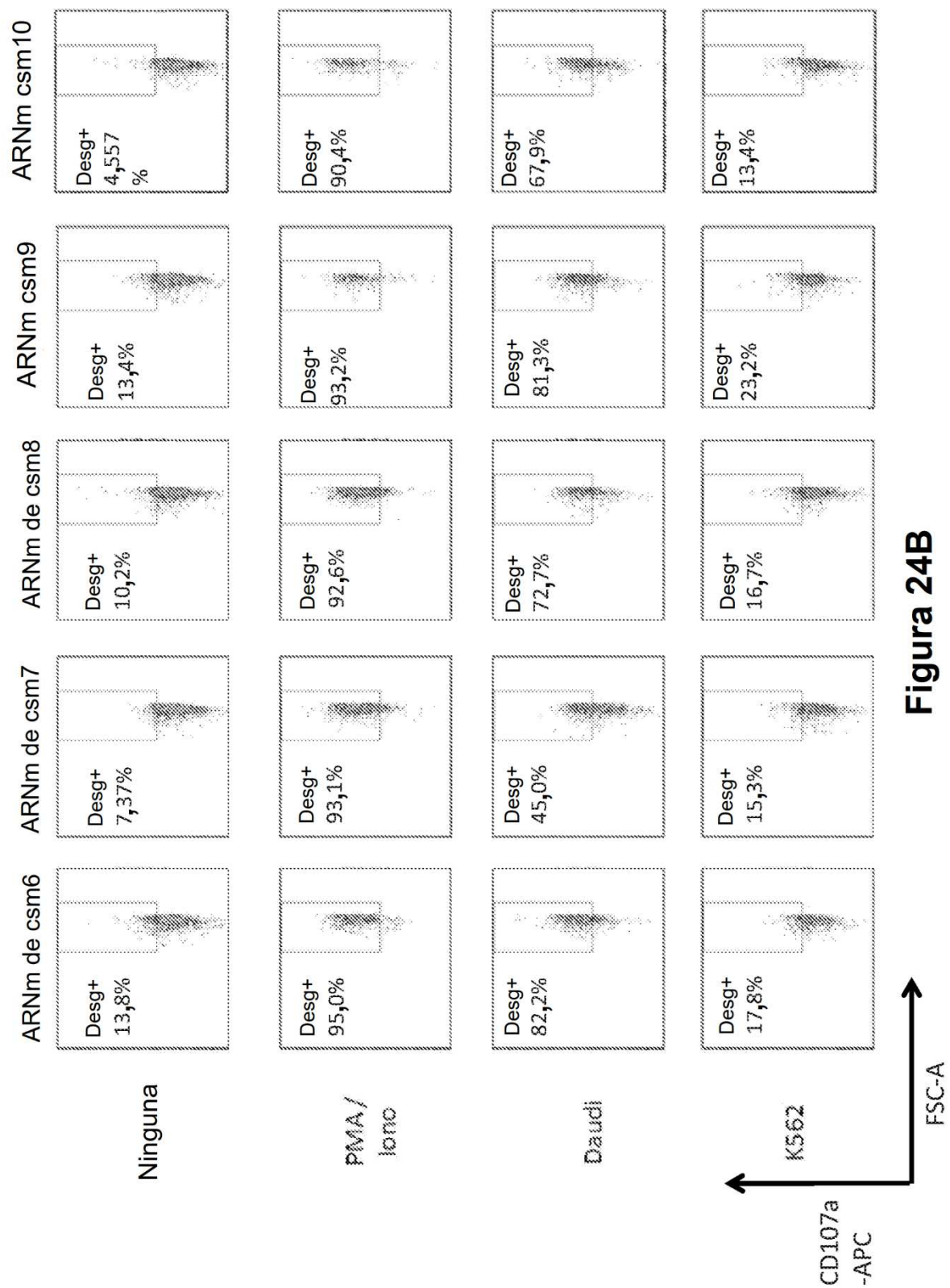


Figura 24B

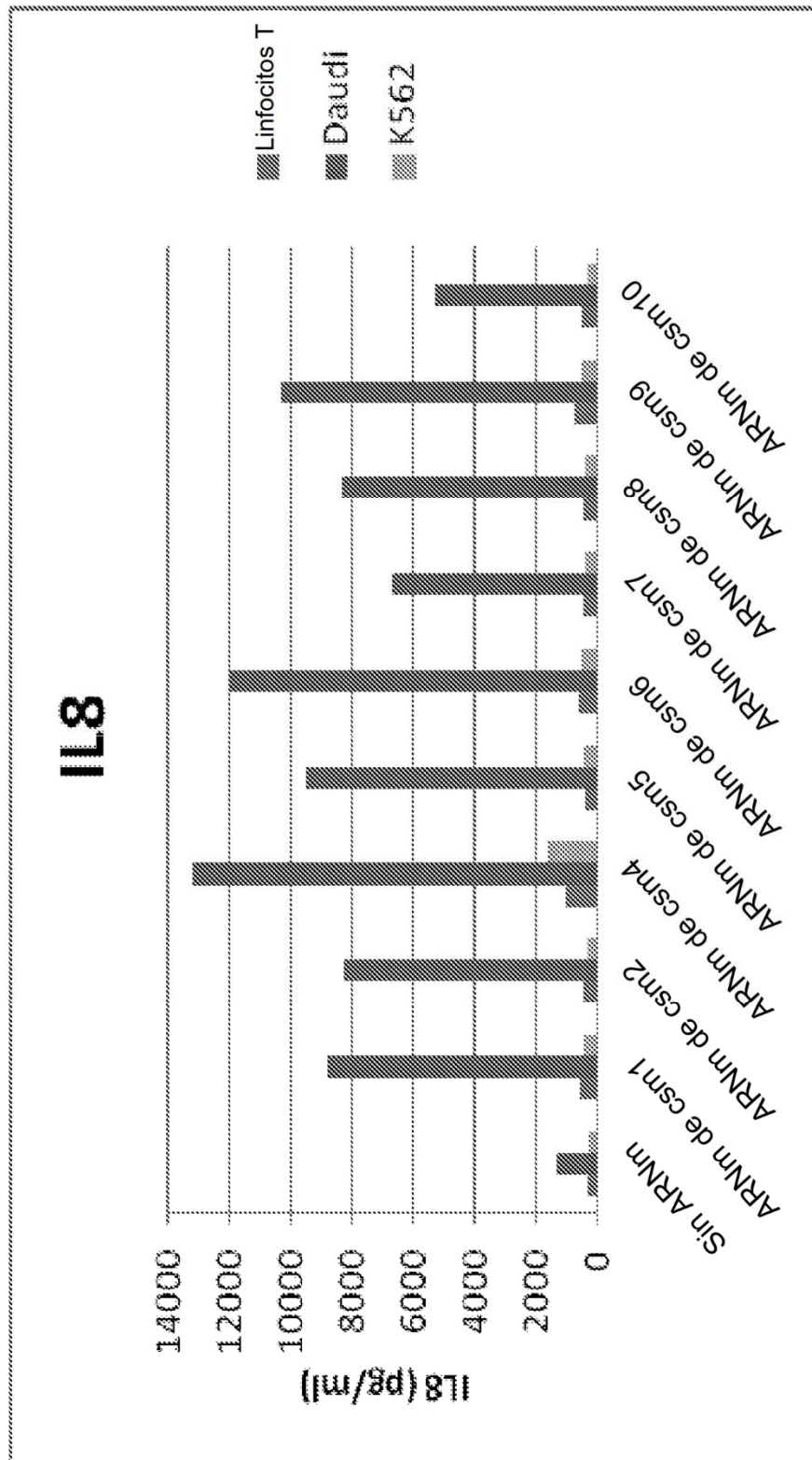


Figura 25A

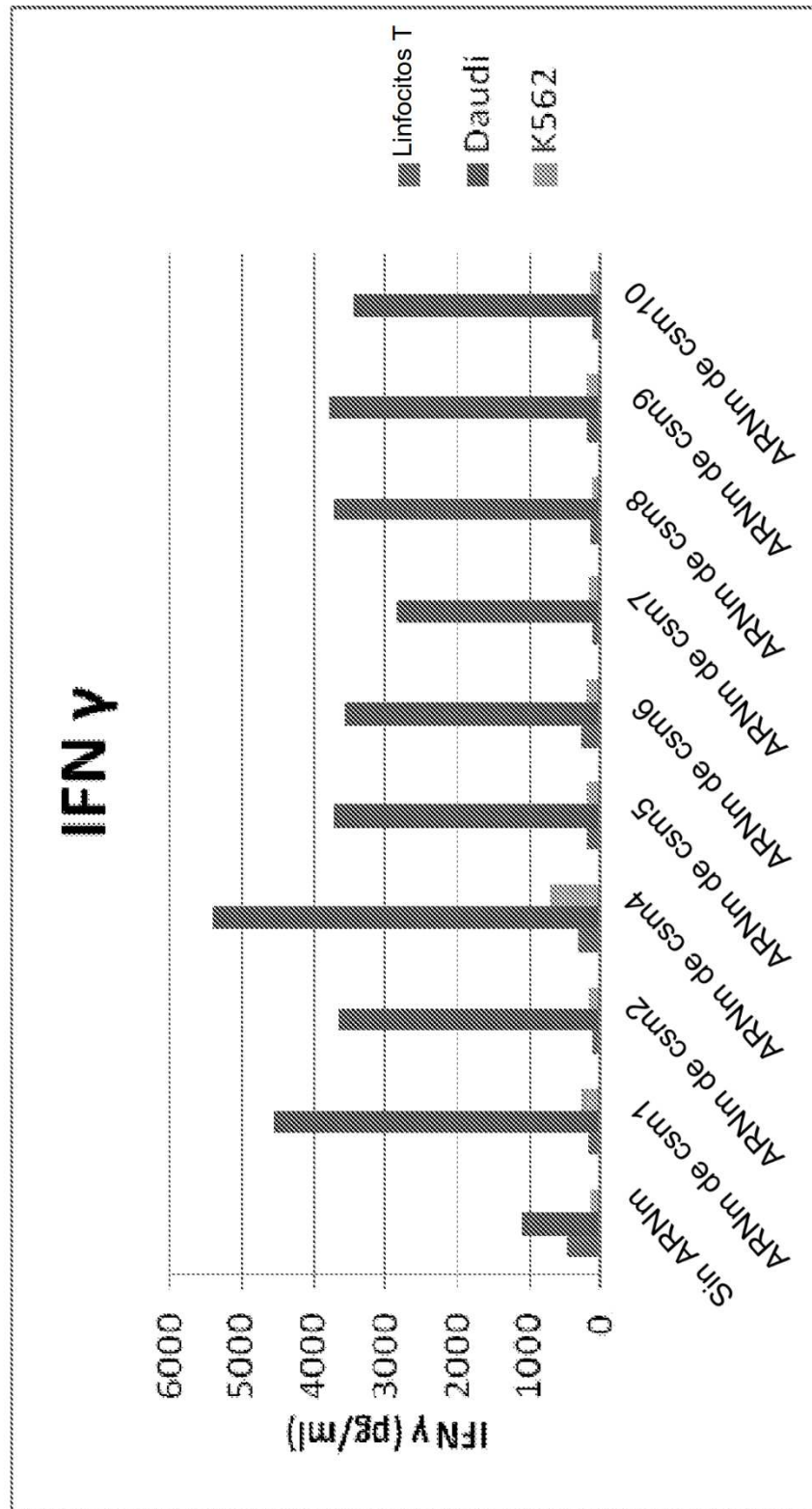


Figura 25B

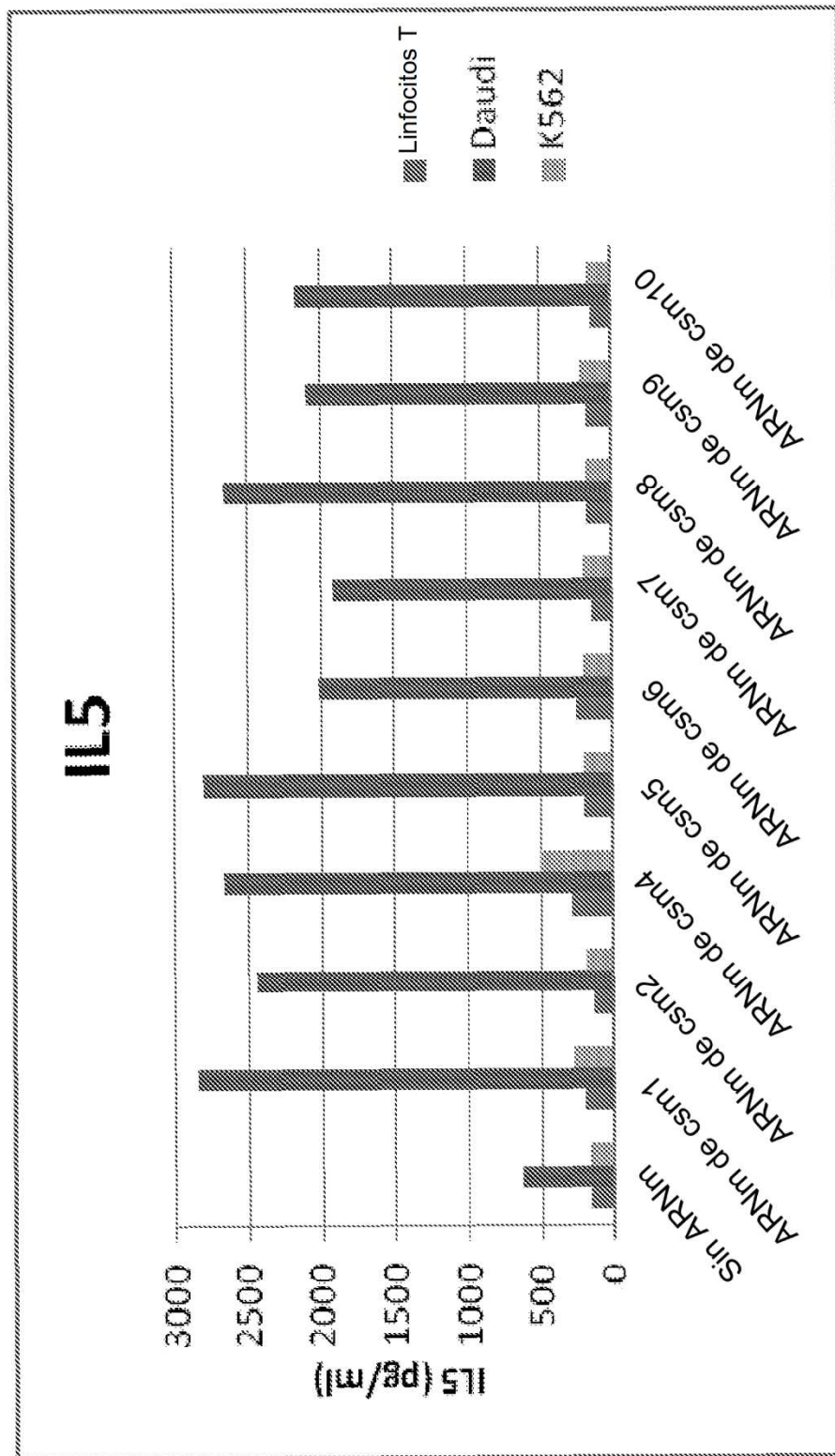


Figura 25C

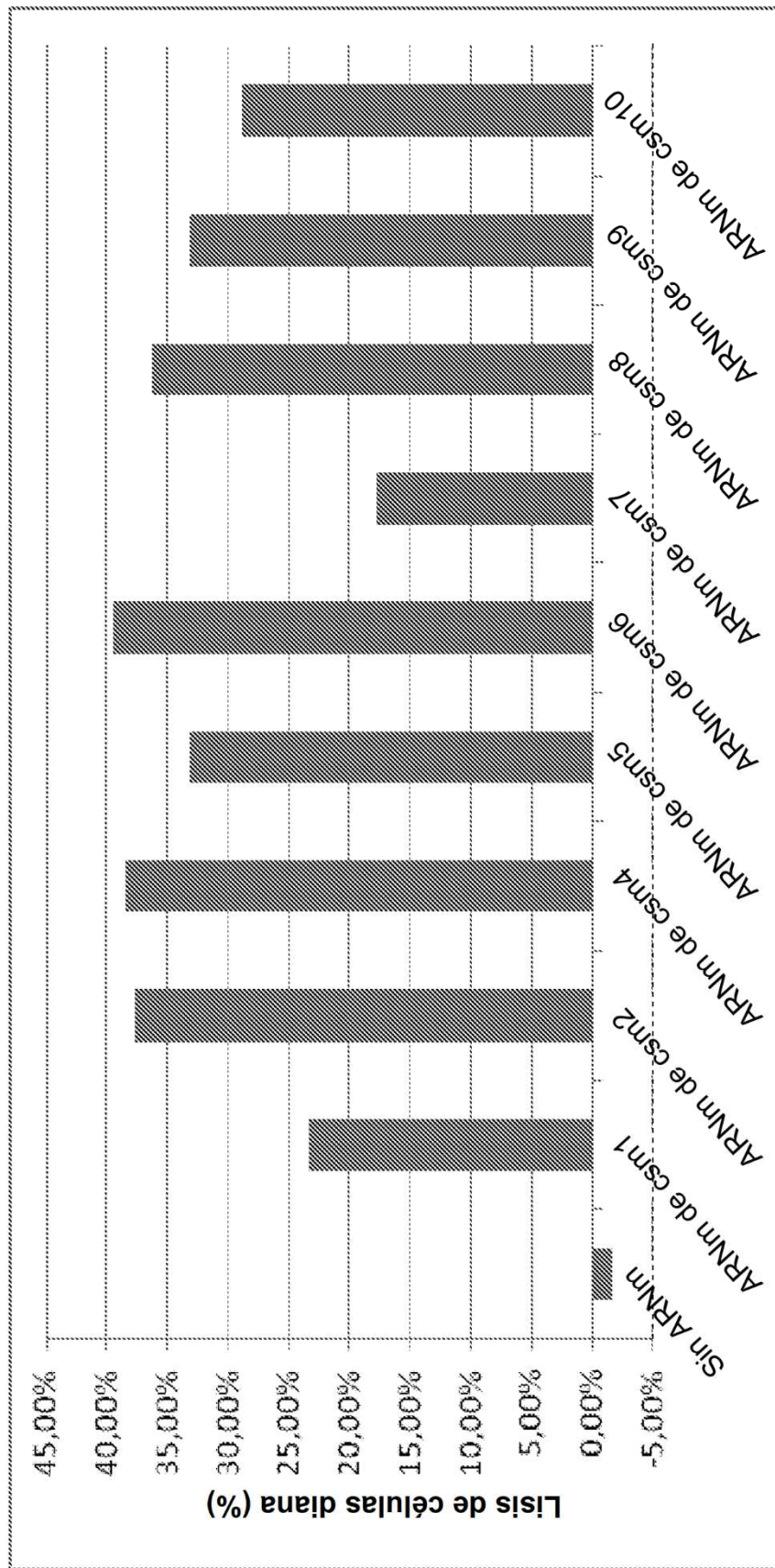
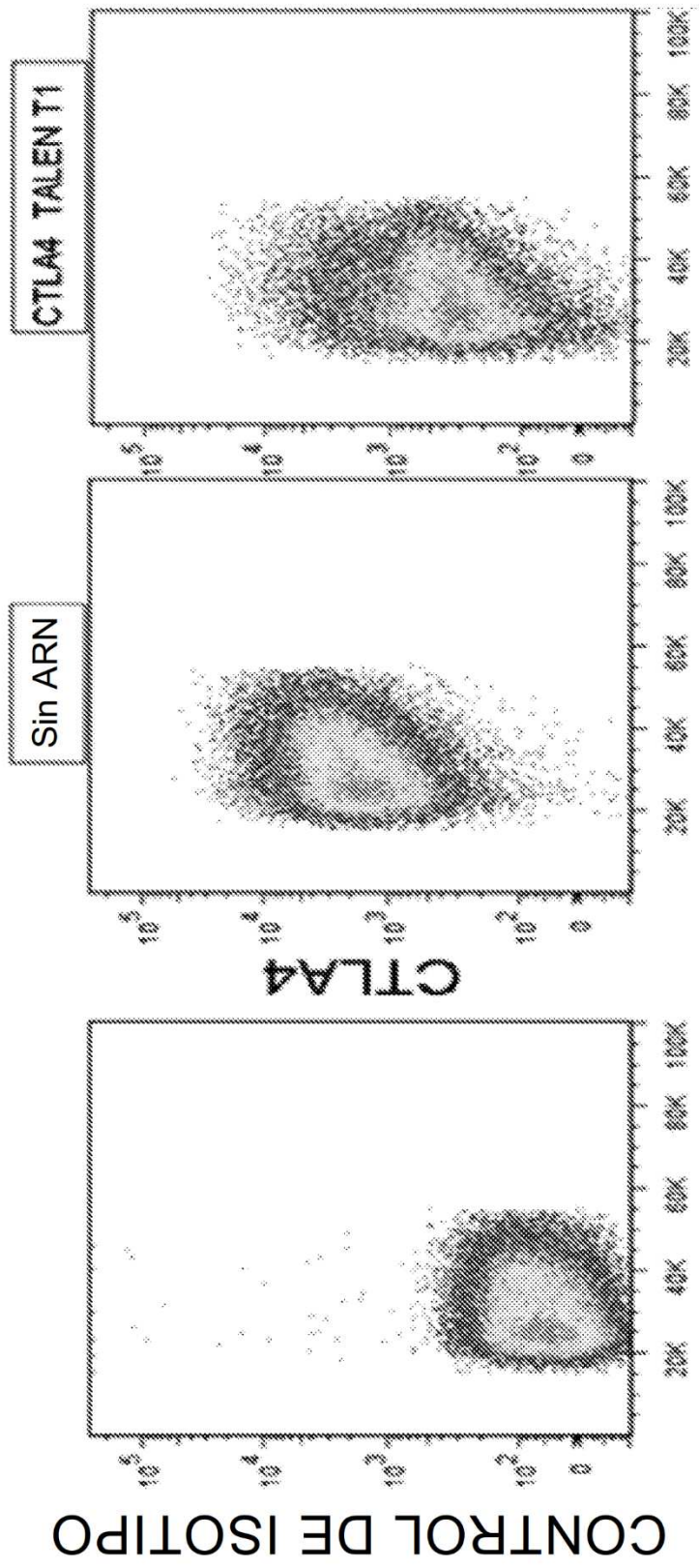
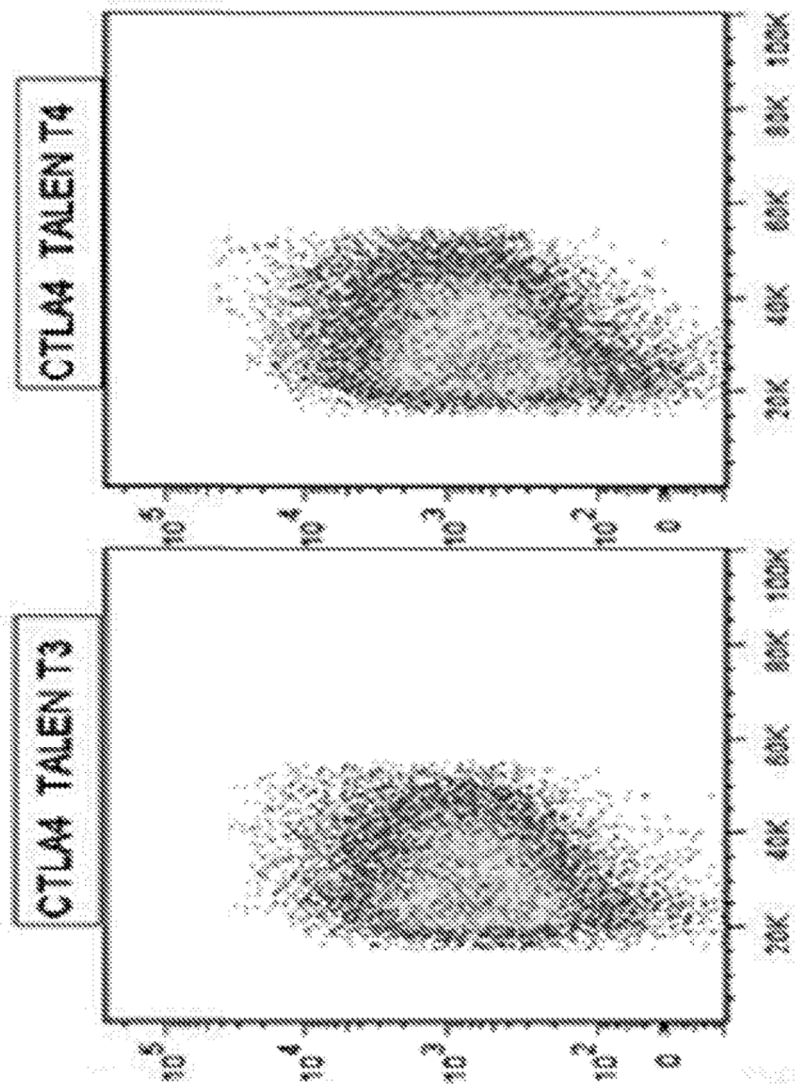


Figura 26

Fig. 27





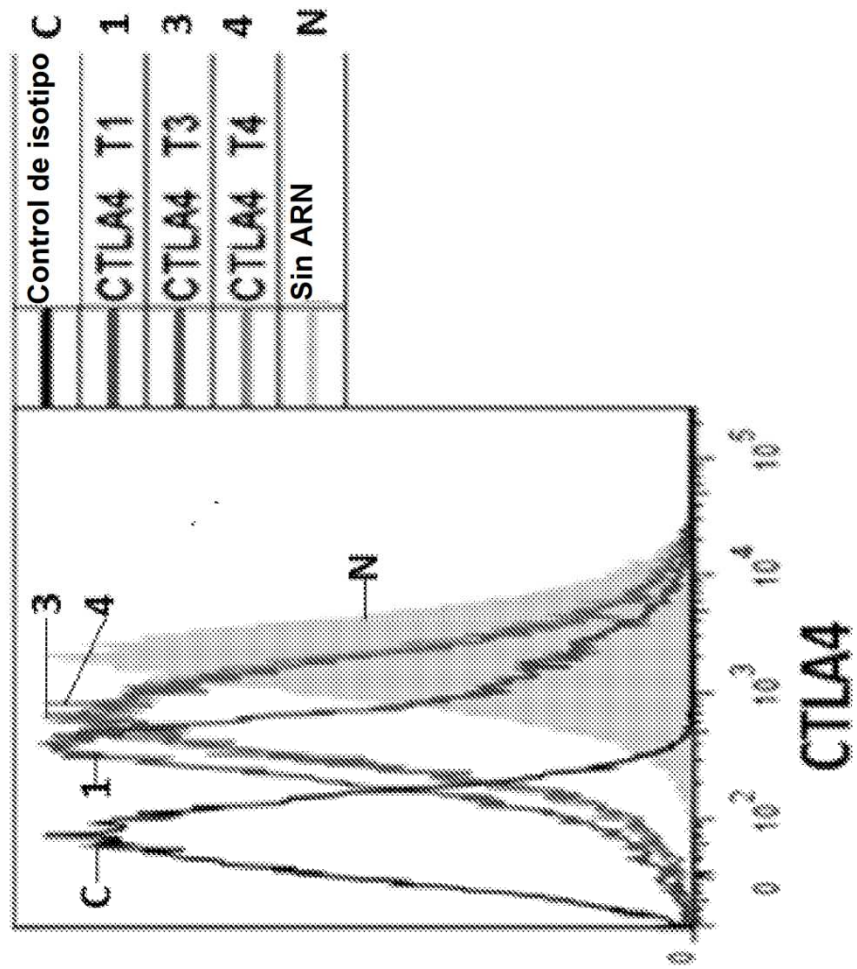


Fig. 28

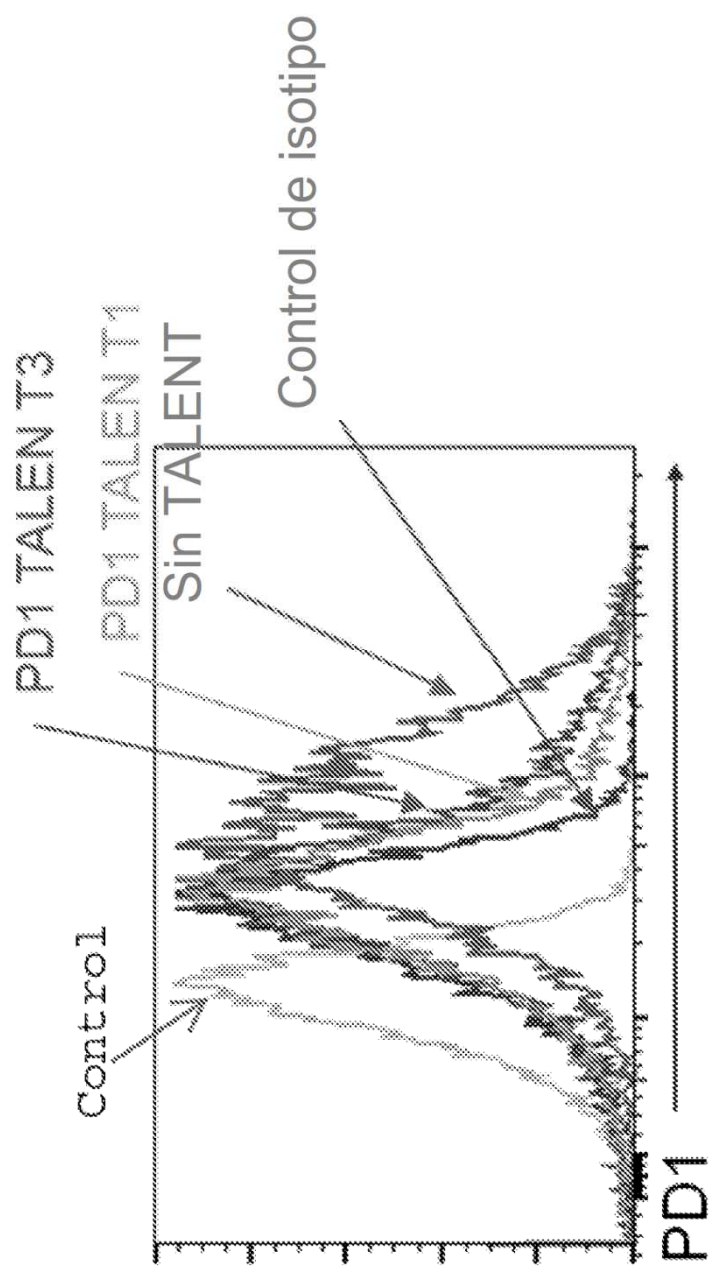


Fig. 29

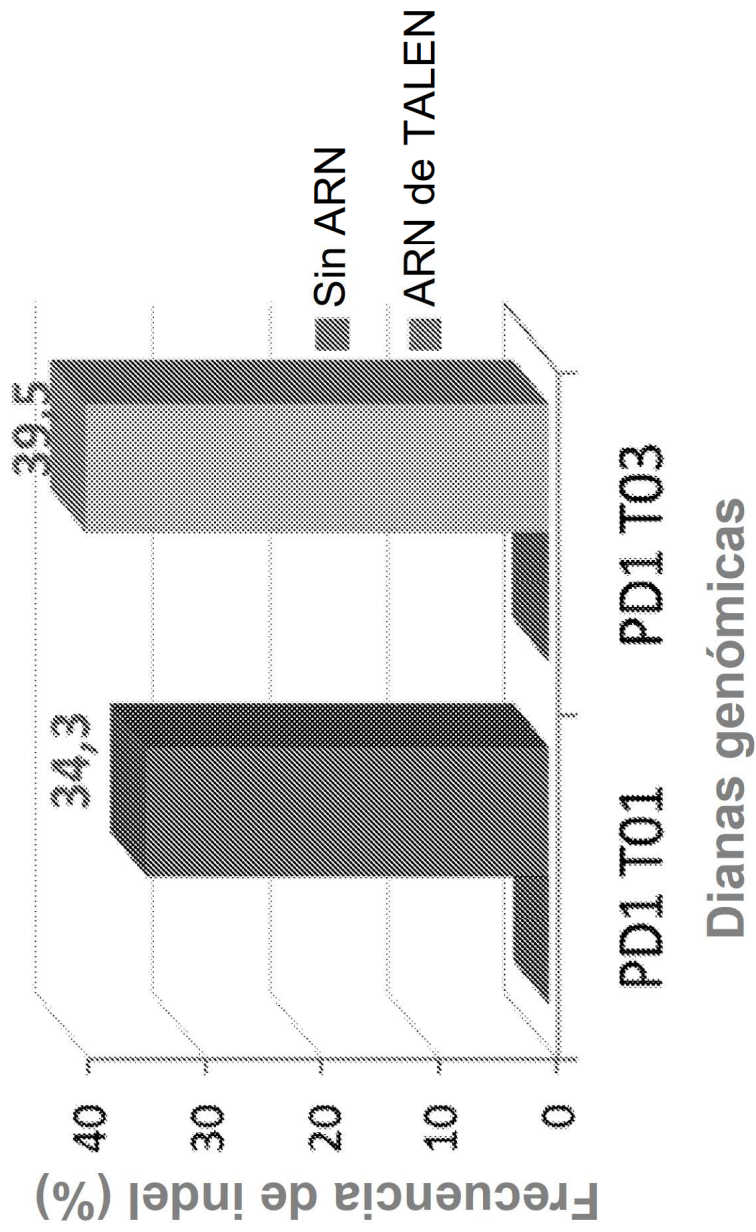


Fig. 30

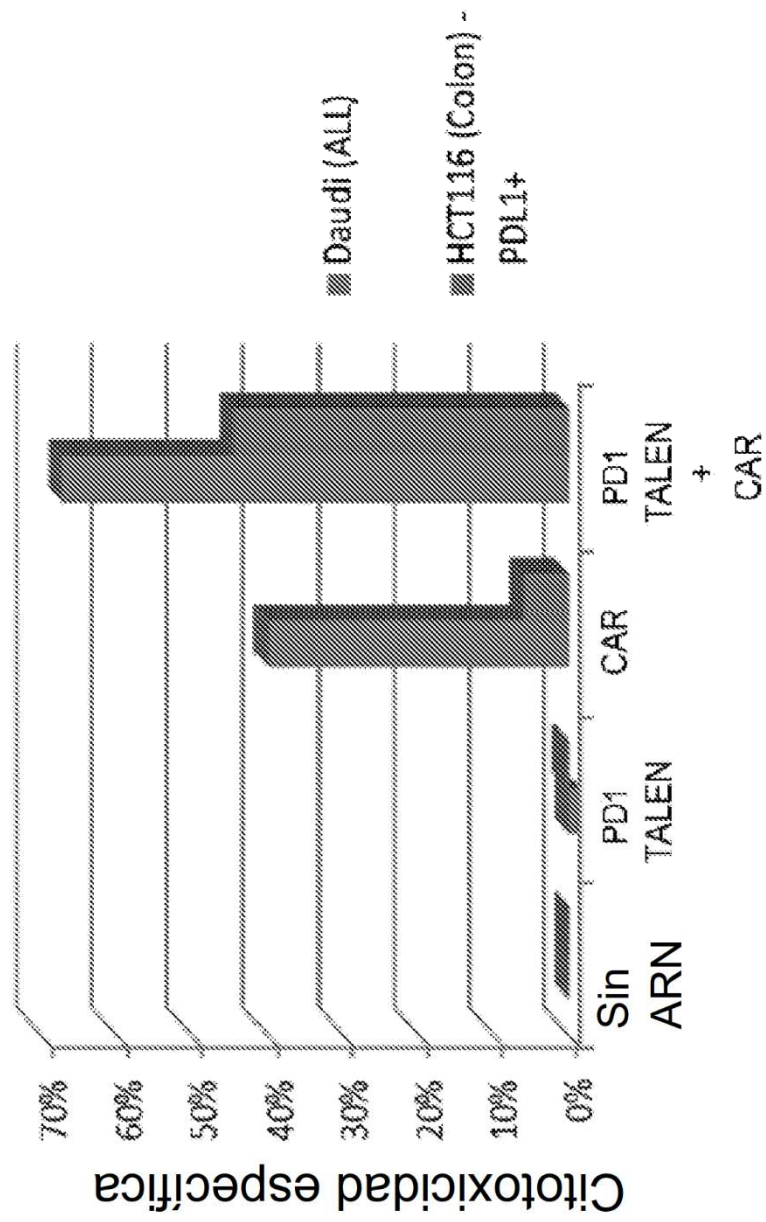


Fig. 31