

VECTORES VÍRICOS Y USO DE LOS MISMOS EN TERAPIAS CELULARES ADOPTIVAS

REFERENCIA CRUZADA CON LA SOLICITUD RELACIONADA

[0001] Esta es una solicitud internacional en virtud del Tratado de Cooperación en materia de Patentes, que reivindica la prioridad con la solicitud provisional de patente en Estados Unidos n.º 62/853.123, presentada el 27 de mayo de 2019, cuyo contenido se incorpora íntegramente a la presente memoria como referencia.

LAS REFERENCIAS A LA LISTA DE SECUENCIAS SE PRESENTAN POR VÍA ELECTRÓNICA

[0002] La copia oficial de la lista de secuencias se presenta por vía electrónica a través de la página web de la EFS como una lista de secuencias en formato ASCII con el nombre de archivo "3000011-013977_SEQLIST_ST25.txt", creado el 26 de mayo de 2020, con un tamaño de 313 426 bytes, la cual se presenta simultáneamente con la especificación. La lista de secuencias contenida en este documento con formato ASCII forma parte de la especificación y se incorpora íntegramente a la presente memoria como referencia.

GENERALIDADES

[0003] 1. Ámbito

[0004] La presente descripción concierne a la fabricación de linfocitos T. En un aspecto, la presente descripción concierne a la fabricación de linfocitos T mediante una casete multicistrónica que posibilita la expresión de una pluralidad de proteínas con un único vector. Más específicamente, la presente descripción concierne a la fabricación de linfocitos T que coexpresan TCR $\alpha\beta$ y CD8 $\alpha\beta$ y al uso de los mismos en terapias celulares adoptivas.

[0005] 2. Generalidades

[0006] La aplicación de la ingeniería genética a los linfocitos humanos con vistas a posibles tratamientos contra enfermedades hereditarias, adquiridas o infecciosas requiere que la transferencia y la expresión de los transgenes sean eficientes. En el caso de la inmunoterapia adoptiva contra el cáncer se han usado receptores de linfocitos T (TCR)

antitumorales naturales y/o recombinantes para dotar de reactividad antitumoral a linfocitos T normales o a linfocitos infiltrantes de tumores.

[0007] Morgan et al. (*J Immunol.* 2003 September 15; 171(6): 3287–3292) dan a conocer un TCR anti-gp100 expresado por un ARN bicistrónico, en el cual la expresión del primer gen, que codifica la cadena TCR β , es controlada por una repetición terminal larga (LTR), y la del segundo gen, que codifica la cadena TCR α , está regida por un sitio de entrada interno al ribosoma (IRES). Los linfocitos T CD4+ genomodificados con este TCR anti-gp100 fueron reactivos a los antígenos.

[0008] Cohen et al. (*J Immunol.* 2005 November 1; 175(9): 5799–5808) dan a conocer un vector retrovítico bicistrónico que posibilita la co-expresión tanto de una cadena TCR α como de una cadena TCR β que se unen a un epítipo de p53. La expresión del primer gen, que codifica la cadena TCR α , es controlada por una LTR, y la del segundo gen, que codifica la cadena TCR β , está regida por un IRES. Los linfocitos transducidos con TCR-p53 fueron capaces de reconocer específicamente y con alta afinidad células presentadoras de antígeno (APC) estimuladas con el péptido, así como células HLA-A2.1+ transfectadas con la proteína p53 de tipo natural (“salvaje”) o mutante.

[0009] Hughes et al. (*Hum Gene Ther.* 2005 April; 16(4): 457–472) dan a conocer varios vectores retrovíticos bicistrónicos que posibilitan la co-expresión de un TCR anti-MART-1. La expresión del primer gen, que codifica la cadena TCR α , está controlada por una LTR, y la del segundo gen, que codifica la cadena TCR β , está regida por un IRES, o viceversa. Además, la expresión del primer gen, que codifica la cadena TCR α , está controlada por una LTR, y la del segundo gen, que codifica la cadena TCR β , está regida por un promotor de PGK, o viceversa. Los linfocitos T transducidos con esos vectores mostraron una elevada actividad efectora.

[00010] Zhao et al. (*J Immunol.* 2005 April 1; 174(7): 4415–4423) dan a conocer vectores retrovíticos bicistrónicos que posibilitan la coexpresión de TCR específicos de NY-ESO-1. La expresión del primer gen, que codifica la cadena TCR α , está controlada por una LTR, y la del segundo gen, que codifica la cadena TCR β , está regida por un IRES, o bien la expresión del primer gen, que codifica la cadena TCR α , está controlada por una LTR, y la

del segundo gen, que codifica la cadena TCR β , está regida por un promotor de PGK. Los linfocitos transducidos pueden reconocer y destruir con eficiencia estirpes de células de melanoma que son positivas para HLA-A2 y NY-ESO-1.

[00011] Morgan et al. (*Gene Therapy* (2008) 15, 1411–1423) dan a conocer vectores lentivíricos bistrónicos que combinan un sitio de escisión de furina y un espaciador de aminoácidos (GSG o SGSG [SEQ ID N.º 8]) seguidos de un péptido 2A de salto ribosómico que posibilitan la expresión de un TCR anti-gp100 o de un TCR anti-MART-1. Cuando la secuencia espaciadora se alargó añadiendo una secuencia marcadora de péptidos sintética V5 se aceleró el procesamiento de las proteínas, lo que dio como resultado un vector lentivírico capaz de lograr una expresión profusa de los TCR en los linfocitos transducidos.

[00012] Persiste la necesidad de sistemas de inserción génica que permitan la expresión eficiente y segura de transgenes destinados a terapias celulares adoptivas.

RESUMEN CONCISO

[00013] En un aspecto, la descripción proporciona un sistema de inserción génica que incluye un vector que comprende una primera secuencia nucleotídica S1, que codifica una proteína Z1, una segunda secuencia nucleotídica S2, que codifica una proteína Z2, una tercera secuencia nucleotídica S3, que codifica una proteína Y1, y una cuarta secuencia nucleotídica S4, que codifica una proteína Y2, en que Z1 y Z2 forman un primer dímero e Y1 y Y2 forman un segundo dímero, en que el primer dímero Z1Z2 es diferente del segundo dímero Y1Y2 y en que el sistema de inserción génica se usa en terapias celulares adoptivas.

[00014] En otro aspecto, las secuencias S1, S2, S3 y S4 se pueden disponer en tándem con una orientación 5' a 3' seleccionada entre S1-S2-S3-S4, S1-S2-S4-S3, S1-S3-S2-S4, S1-S3-S4-S2, S1-S4-S3-S2, S1-S4-S2-S3, S2-S1-S3-S4, S2-S1-S4-S3, S2-S3-S1-S4, S2-S3-S4-S1, S2-S4-S3-S1, S2-S4-S1-S3, S3-S1-S2-S4, S3-S1-S4-S2, S3-S2-S1-S4, S3-S2-S4-S1, S3-S4-S1-S2, S3-S4-S2-S1, S4-S1-S2-S3, S4-S1-S3-S2, S4-S2-S1-S3, S4-S2-S3-S1, S4-S3-S1-S2 o S4-S3-S2-S1.

[00015] En otro aspecto, el vector puede incluir, además, una quinta secuencia nucleotídica S5, que codifica un péptido 2A, y una sexta secuencia nucleotídica S6, que codifica un péptido conector, en que S5 y S6 están ubicadas entre S1 y S2, S1 y S3, S1 y S4, S2 y S3, S2 y S4, y/o S3 y S4.

[00016] En otro aspecto, el péptido 2A puede seleccionarse entre P2A (SEQ ID N.º 3), T2A (SEQ ID N.º 4), E2A (SEQ ID N.º 5) o F2A (SEQ ID N.º 6).

[00017] En otro aspecto, el péptido conector puede ser GSG o SGSG (SEQ ID N.º 8).

[00018] En otro aspecto, el vector puede incluir una séptima secuencia nucleotídica S7, que codifica un péptido de furina (SEQ ID N.º 2), en que S7 queda ubicada entre S1 y S2, S1 y S3, S1 y S4, S2 y S3, S2 y S4, y/o S3 y S4.

[00019] En otro aspecto, el vector puede incluir, además, una secuencia de un elemento regulador postranscripcional (PRE) seleccionado entre un PRE del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) o un PRE del virus de la hepatitis B o VHB (HPRE).

[00020] En otro aspecto, el vector puede incluir, además, una secuencia promotora que controle la transcripción de las secuencias S1, S2, S3, S4, S5, S6 y/o S7, secuencia promotora que es seleccionada entre un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de la fosfoglicerato-cinasa (PGK), un promotor de la proteína básica de la mielina (MBP), un promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo portador de LTR MoMuLV modificado (MNDU3), un promotor de la ubiquitina C, un promotor de EF-1 α o un promotor del virus de las células madre murinas (MSCV).

[00021] En otro aspecto, el primer dímero Z1Z2 puede seleccionarse entre las SEQ ID N.º 13 y 14, 15 y 16, 17 y 18, 19 y 20, 21 y 22, 23 y 24, 25 y 26, 27 y 28, 29 y 30, 31 y 32, 33 y 34, 35 y 36, 37 y 38, 39 y 40, 41 y 42, 43 y 44, 45 y 46, 47 y 48, 49 y 50, 51 y 52, 53 y 54, 55 y 56, 57 y 58, 59 y 60, 61 y 62, 63 y 64, 65 y 66, 67 y 68, 69 y 70, 71 y 72, 73 y 74, 75 y 76, 77 y 78, 79 y 80, 81 y 82, 83 y 84, 85 y 86, 87 y 88, u 89 y 90.

[00022] En otro aspecto, el segundo dímero de Y1 e Y2 se expone en las SEQ ID N.º 11 y 12.

[00023] En otro aspecto, la orientación es S2-S1-S4-S3.

[00024] En otro aspecto, la secuencia del vector es seleccionada entre PTE WPRE (SEQ ID N.º 91), TPE WPRE (SEQ ID N.º 92) o PTE fn WPRE (SEQ ID N.º 93).

[00025] En otro aspecto, la orientación es S4-S3-S2-S1.

[00026] En otro aspecto, el vector tiene la secuencia PTE CD8 TCR WPRE (SEQ ID N.º 94).

[00027] En otro aspecto, el vector vírico se puede seleccionar entre adenovirus, poxvirus, alfavirus, arenavirus, flavivirus, rhabdovirus, retrovirus, lentivirus, herpesvirus, paramixovirus o picornavirus.

[00028] En otro aspecto, el vector es pseudotipado con una proteína de la envoltura de un virus seleccionado entre el virus endógeno felino nativo (RD114), una versión quimérica de la RD114 (RD114TR), el virus de la leucemia del gibbon (GALV), una versión quimérica de la GALV (GALV-TR), el virus anfitriónico de la leucemia murina (MLV 4070A), baculovirus (GP64), el virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), el virus de la gripe aviar (FPV), el virus del ébola (EboV), la glucoproteína de la envoltura del retrovirus de babuino (BaEV), o el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV).

[00029] En otro aspecto, el vector es pseudotipado con una proteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G).

[00030] En un aspecto, la presente descripción concierne a un método para preparar linfocitos T destinados a inmunoterapia, que incluye el aislamiento de linfocitos T de una muestra de sangre procedente de un sujeto humano, la activación de los linfocitos T aislados en presencia de un aminobisfosfonato, la transducción de los linfocitos T activados con el vector descrito en la presente memoria y la expansión de los linfocitos T transducidos.

[00031] En otro aspecto, los linfocitos T pueden aislarse de una muestra humana de leucocitaféresis.

[00032] En otro aspecto, el aminobisfosfonato puede seleccionarse entre ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido zoledrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, una sal de los mismos y/o un hidrato de los mismos.

[00033] En otro aspecto, la activación puede hacerse, además, en presencia de interleucina 2 (IL-2) recombinante humana y de interleucina 15 (IL-15) recombinante humana.

[00034] En otro aspecto, la expansión puede hacerse en presencia de IL-2 e IL-15.

[00035] En otro aspecto, los linfocitos T pueden ser linfocitos T $\gamma\delta$.

[00036] En otro aspecto, el primer dímero Z1Z2 y el segundo dímero Y1Y2 se coexpresan en la superficie de los linfocitos T expandidos.

[00037] En otro aspecto, la presente descripción concierne a una población de linfocitos T expandidos que han sido preparados con el método de los aspectos anteriores.

[00038] En un aspecto, la presente descripción concierne a un método para tratar a un paciente que padece cáncer, el cual comprende la administración al paciente de una composición que comprende la población de linfocitos T expandidos descrita en la presente memoria, en que los linfocitos T destruyen las células cancerosas en cuya superficie presentan un péptido formando un complejo con una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), péptido que es seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID N.º 98 a 255, y en el que el cáncer es seleccionado entre el grupo consistente en cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de células de Merkel, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, carcinoma colorrectal, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer gástrico y cáncer de próstata.

[00039] En otro aspecto, la composición incluye, además, un adyuvante.

[00040] En otro aspecto, el adyuvante es seleccionado entre uno o más de los siguientes: anticuerpo anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, atezolizumab, interferón α , interferón β , oligonucleótidos CpG y

derivados, poli-(I:C) y derivados, ARN, sildenafil, formulaciones particuladas con poli(láctido co-glicólido) (PLG), virosomas, interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21 o IL-23.

[00041] En un aspecto, la presente descripción concierne a un método para desencadenar una respuesta inmunitaria en un paciente que padece cáncer, el cual comprende la administración al paciente de una composición que comprende la población de linfocitos T expandidos descrita en la presente memoria, en que los linfocitos T destruyen las células cancerosas en cuya superficie presentan un péptido formando un complejo con una molécula del MHC, péptido que es seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID N.º 98 a 255, y en el que el cáncer es seleccionado entre el grupo consistente en cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de células de Merkel, cáncer de páncreas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de las vías biliares, cáncer colorrectal, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer de riñón, leucemia, cáncer de ovario, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer gástrico y cáncer de próstata.

[00042] En otro aspecto, la respuesta inmunitaria comprende una respuesta de linfocitos T citotóxicos.

[00043] En un aspecto, la presente descripción proporciona métodos para preparar linfocitos T mediante el uso de una estatina en un método descrito en la presente memoria. En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para preparar linfocitos T mediante la activación de los linfocitos T en presencia de una estatina.

[00044] En otro aspecto más, la presente descripción concierne a un método para preparar linfocitos T destinados a inmunoterapia, el cual incluye la activación de los linfocitos T en presencia de una estatina, la transducción de los linfocitos T activados con el vector de la presente descripción, vector que puede estar pseudotipado con una proteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), y la expansión de los linfocitos T transducidos.

[00045] En otro aspecto, los linfocitos T pueden incluir linfocitos T $\alpha\beta$, linfocitos T $\gamma\delta$ y/o linfocitos T citolíticos naturales (células NKT).

[00046] En otro aspecto, la estatina puede seleccionarse entre atorvastatina, cerivastatina, dalvastatina, fluindostatina, fluvastatina, mevastatina, pravastatina, simvastatina, velostatina o rosuvastatina.

[00047] En un aspecto, la presente descripción concierne a un método para preparar linfocitos T destinados a inmunoterapia, el cual incluye la activación de los linfocitos T, la transducción de los linfocitos T activados con el vector de la presente descripción y la expansión de los linfocitos T transducidos.

[00048] En otro aspecto, la activación puede hacerse en presencia de un anticuerpo anti-CD3 y de un anticuerpo anti-CD28.

[00049] En otro aspecto, la expansión puede hacerse en presencia de IL-7 y de IL-15.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[00050] La Fig. 1 muestra un proceso de fabricación de linfocitos T $\gamma\delta$ de acuerdo con una forma de realización de la presente descripción. La fabricación de los linfocitos T $\gamma\delta$ puede incluir la recolección o la obtención de leucocitos o de PBMC, p. ej., un producto de leucocitaféresis, la reducción de los linfocitos T $\alpha\beta$ de las PBMC o del producto de leucocitaféresis, seguida por la activación, la transducción y la expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$.

[00051] La Fig. 2 expone estrategias de transducción con recombinación de marcos abiertos de lectura (ORF) de acuerdo con algunas formas de realización de la presente descripción.

[00052] La Fig. 3 muestra constructos lentivíricos de acuerdo con ciertas formas de realización de la presente descripción.

[00053] La Fig. 4 muestra lentivirus seudotipados con la RD114TR usados para transducir linfocitos T $\gamma\delta$ el día 3 o el día 6 después de la activación con zoledronato, IL-2 e IL-15. La eficiencia de la transducción se evaluó con anticuerpos dirigidos específicamente contra el TCR ($V\beta 8$) y el CD8 ($CD8\alpha$) mediante citometría de flujo.

[00054] La Fig. 5A muestra un constructo de acuerdo con una forma de realización de la presente descripción.

[00055] La Fig. 5B muestra un constructo de acuerdo con otra forma de realización de la presente descripción.

[00056] La Fig. 5C muestra un constructo de acuerdo con otra forma de realización de la presente descripción.

[00057] La Fig. 5D muestra un constructo de acuerdo con otra forma de realización de la presente descripción.

[00058] La Fig. 6A muestra un constructo de acuerdo con otra forma de realización de la presente descripción.

[00059] La Fig. 6B muestra un constructo de acuerdo con otra forma de realización de la presente descripción.

[00060] La Fig. 7 muestra un esquema de constructos de acuerdo con ciertas formas de realización de la presente descripción.

[00061] La Fig. 8A muestra un constructo de acuerdo con una forma de realización de la presente descripción.

[00062] La Fig. 8B muestra un constructo de acuerdo con otra forma de realización de la presente descripción.

[00063] La Fig. 8C muestra un constructo de acuerdo con otra forma de realización de la presente descripción.

[00064] La Fig. 8D muestra un constructo de acuerdo con otra forma de realización de la presente descripción.

[00065] La Fig. 9A muestra un esquema de constructos de acuerdo con ciertas formas de realización de la presente descripción.

[00066] La Fig. 9B muestra un esquema de constructos de acuerdo con ciertas formas de realización de la presente descripción.

[00067] La Fig. 10 muestra el porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ CD8+TCR+ transducidos con vectores víricos que contenían PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE o TPE.WPRE. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT).

[00068] La Fig. 11 muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) del CD8 y del TCR en linfocitos T $\gamma\delta$ transducidos con vectores víricos portadores de PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE o TPE.WPRE. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT).

[00069] La Fig. 12 muestra la actividad citolítica antitumoral desplegada por linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos del donante 3 que habían sido transducidos con vectores víricos portadores de PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE o TPE.WPRE contra una estirpe de células tumorales que expresaba con profusión el antígeno, p. ej., UACC257 (cuadro superior), o contra una estirpe de células tumorales que expresaba poco el antígeno, p. ej., U2OS (cuadro inferior), determinada con el ensayo de citotoxicidad Incucyte. Como controles se emplearon linfocitos no transducidos y las células diana solas.

[00070] Las Figs. 13A-13C muestran la magnitud de la secreción de interferón (IFN)- γ por linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos del donante 3 que habían sido transducidos con vectores víricos portadores de PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE o TPE.WPRE contra una estirpe de células tumorales que expresaba con profusión el antígeno, p. ej., UACC257 (Fig. 13A) o contra una estirpe de células tumorales que expresaba poco el antígeno, p. ej., U2OS (Fig. 13B), o contra una estirpe de células tumorales no portadora del antígeno, p. ej., MCF-7 (Fig. 13C). Como control se usaron linfocitos no transducidos.

[00071] La Fig. 14 muestra la actividad citolítica antitumoral de linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos del donante 4 y transducidos con vectores víricos portadores de PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE o TPE.WPRE contra una estirpe de células tumorales que expresaba con profusión el antígeno, p. ej., UACC257 (cuadro superior) o contra una estirpe de células tumorales que expresaba poco el antígeno, p. ej., U2OS (cuadro inferior), determinada con el ensayo de citotoxicidad Incucyte. Como controles se emplearon linfocitos no transducidos y las células diana solas.

[00072] Las Figs. 15A-15C muestran la magnitud de la secreción de IFN- γ por linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos del donante 4 que habían sido transducidos con vectores víricos portadores de PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE o TPE.WPRE contra una estirpe de células tumorales que expresaba con profusión el antígeno, p. ej., UACC257 (Fig. 15A) o contra una estirpe de células tumorales que expresaba poco el antígeno, p. ej., U2OS (Fig. 15B), o contra una estirpe de células tumorales no portadora del antígeno, p. ej., MCF-7 (Fig. 15C). Como control se usaron linfocitos no transducidos.

[00073] La Fig. 16 muestra el número de copias del vector vírico insertas en linfocitos T $\gamma\delta$ que habían sido transducidos con vectores víricos que contenían PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE o TPE.WPRE. Como control se usaron linfocitos no transducidos.

[00074] Las Figs. 17A y 17B muestran la expansión (factor de multiplicación) de linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos del donante 3 (Fig. 17A) y del donante 4 (Fig. 17B) transducidos con vectores víricos que contenían PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE o TPE.WPRE. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT).

[00075] La Fig. 18A muestra los fenotipos de memoria de linfocitos T $\gamma\delta$ determinados con citometría de flujo conforme a ciertas formas de realización de la presente descripción.

[00076] La Fig. 18B muestra los fenotipos de memoria de linfocitos T $\gamma\delta$ transducidos con vectores víricos que contenían PTE.CD8.TCR.WPRE, PTE.WPRE, PTE.Fn.WPRE o TPE.WPRE. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT).

[00077] La Fig. 19 muestra una comparación de la eficiencia de la transducción entre linfocitos T $\gamma\delta$ transducidos con un único vector lentivírico (LV) portador de PTE.CD8.TCR.WPRE (cuadro B (120 μ l) y cuadro C (240 μ l)) o transducidos con dos vectores lentivíricos distintos: uno portador de R11KE.WPRE y el otro de CD8.WPRE (cuadros D y E), con cantidades crecientes de ambos vectores víricos, p. ej., 120 μ l del portador de R11KE.WPRE y del portador de CD8.WPRE (cuadro D) y 240 μ l del portador de R11KE.WPRE y del portador de CD8.WPRE (cuadro E). Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT).

[00078] La Fig. 20 muestra la mejora de la eficiencia de transducción lograda en linfocitos T $\gamma\delta$ al transducirlos con cantidades crecientes del vector vírico portador de PTE.CD8.TCR.WPRE, p. ej., 30 μ l, 120 μ l y 240 μ l. Como control se usaron linfocitos no transducidos.

[00079] La Fig. 21 muestra la expresión reforzada de CD8 en linfocitos T CD4+ obtenidos de los donantes 5 y 6 al ser transducidos con varias diluciones de un vector lentivírico (LV) que expresaba un constructo 4-en-1 de la presente descripción, p. ej., LV-PTE.CD8.TCR.WPRE

[00080] La Fig. 22 muestra la detección de la expresión de TCR en linfocitos T CD4+ con diversas diluciones del vector lentivírico (LV) que expresaba un constructo 4-en-1 de la presente descripción, p. ej. LV- PTE.CD8.TCR.WPRE.

[00081] La Fig. 23 muestra el porcentaje de dextrámeros203 (Dex203)+ formados por complejos del péptido diana/MHC en linfocitos T CD4+ y/o CD8+ obtenidos del donante 5 (cuadro superior) y del donante 6 (cuadro inferior) transducidos con un constructo 4-en-1 de la presente descripción, p. ej., LV- PTE.CD8.TCR.WPRE.

[00082] La Fig. 24 muestra la MFI de Dex203 en linfocitos T CD4+ y/o CD8+ obtenidos del donante 5 (cuadro superior) y del donante 6 (cuadro inferior) transducidos con un constructo 4-en-1 de la presente descripción, p. ej., LV- PTE.CD8.TCR.WPRE.

[00083]

La Fig. 25 muestra un diseño experimental para analizar la funcionalidad de los linfocitos T transducidos con el constructo 4-en-1 o con un constructo portador únicamente del TCR conforme a una forma de realización de la presente descripción.

[00084] La Fig. 26 muestra el aumento del porcentaje de linfocitos que segregaban IFN- γ (cuadro superior) y el aumento de la MFI del IFN- γ (cuadro inferior) en linfocitos T CD4-CD8 α + obtenidos de varios donantes y agrupados que habían sido transducidos con un vector lentivírico portador de R11KE.WPRE (LV-TCR) (TCR) o con un vector lentivírico portador de PTE.CD8.TCR.WPRE (LV-CD8.TCR) (TCR+CD8), y que después fueron cultivados conjuntamente con células UACC257 que expresaban la diana con profusión en comparación con un cultivo conjunto con células MCF7 que no expresaban la diana.Como

control se usaron linfocitos no transducidos (NT). (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=4).

[00085] La Fig. 27 muestra el aumento del porcentaje de linfocitos positivos para la granzima B (cuadro superior) y el aumento de la MFI de la granzima B (cuadro inferior) en linfocitos T CD4-CD8 α ⁺ obtenidos de varios donantes agrupados que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o LV-CD8.TCR (TCR+CD8) y que después fueron cultivados conjuntamente con células UACC257 que expresaban la diana con profusión en comparación con un cultivo conjunto con células MCF7 que no expresaban la diana. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT). (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=3).

[00086] La Fig. 28 muestra el aumento del porcentaje de linfocitos positivos para IFN- γ (cuadro superior) y el aumento de la MFI del IFN- γ (cuadro inferior) en linfocitos T CD4-CD8 α ⁺ obtenidos de varios donantes agrupados que habían sido transducidos con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) o no habían sido transducidos (NT) y que después fueron cultivados conjuntamente con células UACC257 que expresaban la diana con profusión en comparación con un cultivo conjunto con células MCF7 que no expresaban la diana. (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=4).

[00087] La Fig. 29 muestra el aumento del porcentaje de linfocitos positivos para la granzima B (cuadro superior) y el aumento de la MFI de la granzima B (cuadro inferior) en linfocitos T CD4-CD8 α ⁺ obtenidos de varios donantes agrupados que habían sido transducidos con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) o no habían sido transducidos (NT) y que después fueron cultivados conjuntamente con células UACC257 que expresaban la diana con profusión en comparación con un cultivo conjunto con células MCF7 que no expresaban la diana. (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=4).

[00088] La Fig. 30 muestra el aumento del porcentaje de linfocitos positivos para IFN- γ (cuadro superior) y el aumento de la MFI del IFN- γ (cuadro inferior) en linfocitos T CD3⁺ obtenidos de varios donantes agrupados que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o LV-CD8.TCR (TCR+CD8) y que después habían sido cultivados conjuntamente con

células UACC257 que expresaban la diana con profusión en comparación con un cultivo conjunto con células MCF7 que no expresaban la diana. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT). (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=4).

[00089] La Fig. 31 muestra el aumento del porcentaje de linfocitos positivos para la granzima B (cuadro superior) y el aumento de la MFI de la granzima B (cuadro inferior) en linfocitos T CD3+ obtenidos de varios donantes agrupados que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o LV-CD8.TCR (TCR+CD8) y que después habían sido cultivados conjuntamente con células UACC257 que expresaban la diana con profusión en comparación con un cultivo conjunto con células MCF7 que no expresaban la diana. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT). (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=3).

[00090] La Fig. 32 muestra el aumento de la secreción de IFN- γ en linfocitos T CD3+ obtenidos de donantes agrupados que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o LV-CD8.TCR (TCR+CD8) y que después fueron cultivados conjuntamente con células UACC257 que expresaban la diana con profusión en comparación con un cultivo conjunto con células MCF7 que no expresaban la diana. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT), células UACC257 y células MCF7. (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=4).

[00091] La Fig. 33 muestra el aumento de la secreción de IFN- γ en linfocitos T CD3+ obtenidos de los donantes 5, 6, 7 y 8 que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o LV-CD8.TCR (TCR+CD8) y que después habían sido cultivados conjuntamente con células UACC257 que expresaban la diana con profusión en comparación con un cultivo conjunto con células MCF7 que no expresaban la diana. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT), células UACC257 solas y células MCF7 solas. (Proporción de células efectoras y diana = 2:1).

[00092] La Fig. 34 muestra los porcentajes de linfocitos CD25+ (cuadro superior), de linfocitos CD69+ (cuadro intermedio) y de linfocitos provistos del receptor humano de lipoproteínas de baja densidad (hLDLR)+ (cuadro inferior) entre linfocitos T CD3+CD4+

tratados con atorvastatina, pravastatina o rosuvastatina. Como controles se emplearon linfocitos preactivados, linfocitos activados sin estatina o con DMSO (control) y DMSO.

[00093] La Fig. 35 muestra los porcentajes de linfocitos CD25+ (cuadro superior), de linfocitos CD69+ (cuadro intermedio) y de linfocitos hLDLR+ (cuadro inferior) entre linfocitos T CD3+CD8+ tratados con atorvastatina, pravastatina o rosuvastatina. Como controles se emplearon linfocitos preactivados, linfocitos activados sin estatina o con DMSO (control) y DMSO.

[00094] La Fig. 36 muestra títulos de vectores lentivíricos de acuerdo con una forma de realización de la presente descripción.

[00095] La Fig. 37 muestra un proceso de fabricación de linfocitos T de acuerdo con una forma de realización de la presente descripción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[00096] Tal y como se emplea en la presente memoria, el término “péptido 2A autoescindible” define péptidos relativamente cortos (del orden de 20 aminoácidos de longitud, dependiendo del virus de origen) que el curso de la traducción actúan impidiendo la formación de un enlace peptídico normal entre la glicina (Gly) y la última prolina (Pro), lo que provoca el salto del ribosoma al codón siguiente y la escisión del péptido naciente entre la Gly y la Pro. Después de la escisión, el péptido 2A acortado permanece fusionado al extremo C-terminal del segmento anterior de la proteína, mientras que la prolina queda añadida al extremo N-terminal del segmento posterior de la proteína. El péptido 2A autoescindible se puede seleccionar entre el tesovirus porcino 1 (P2A), el virus de la rinitis equina A (E2A), el virus *Thosea asigna* (T2A) y el virus de la fiebre aftosa del ganado (F2A), o de cualquier combinación de los mismos (véase, p. ej., en Kim et al., PLOS One 6:e18556, 2011, el contenido del cual, incluidas las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del 2A, se incorpora íntegramente a la presente memoria como referencia). Con la adición de las secuencias conectoras (GSG o SGSG [SEQ ID N.º 8]) antes de la

secuencia 2A autoescindible se puede conseguir una síntesis eficiente de proteínas biológicamente activas, p. ej. de los TCR.

[00097] Tal y como se emplea en la presente memoria, el término “promotor” concierne a una región reguladora del ADN generalmente situada por delante del gen (hacia la región 5’ de la hebra de sentido) que permite la transcripción del gen. El promotor contiene secuencias específicas de ADN y elementos de respuesta que son reconocidos por proteínas conocidas como factores de transcripción. Estos factores se unen a las secuencias del promotor y captan a la ARN-polimerasa, la enzima que sintetiza el ARN a partir de la región codificante del gen. Por ejemplo, la secuencia del promotor usada en la presente memoria puede ser seleccionada entre un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de fosfoglicerato cinasa (PGK), un promotor de la proteína básica de la mielina (MBP), un promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un promotor del virus del sarcoma mieloproliferativo portador de LTR MoMuLV modificado (MNDU3), un promotor de la ubiquitina C, un promotor de EF-1 α o un promotor del virus de células madres murinas (MSCV).

[00098] El término “promotor constitutivo” tal y como se emplea en la presente memoria puede incluir una secuencia reguladora que dirige la transcripción de un gen en la mayoría de células o de tejidos durante la mayor parte del tiempo. En ciertas formas de realización sin ánimo de limitación, el promotor constitutivo puede seleccionarse entre el grupo consistente en un promotor de MSCV, un promotor de ubiquitina C (Ubc), un promotor de CMV, un promotor de EF-1 α , un promotor de PGK, un promotor de β -actina y un promotor de ROSA26.

[00099] En ciertas formas de realización, el promotor puede ser un promotor inducible. La actividad de un promotor inducible puede aumentar o disminuir como respuesta a una señal. Por ejemplo, un promotor inducible puede fomentar la transcripción como respuesta a la presencia de una señal, como la activación del linfocito T, o al β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG). Un promotor inducible puede fomentar la transcripción como respuesta a la ausencia de una señal, como la del fosfato. En cualquiera de esas situaciones la magnitud de la transcripción puede ser proporcional o no

a la magnitud de la señal, o a la carencia de la misma. Ejemplos de promotores inducibles que son adecuados para células hospedadoras procariotas son, entre otros y sin ánimo de limitación: promotores NFAT, CD69, lac, tac, trc, trp, pho, recA, tetA, nar, fago PL, cspA, T7 y PBAD (véase Terpe K. 2006 Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 211; cuyo contenido se incorpora íntegramente a la presente memoria como referencia).

[000100] En ciertas formas de realización, el promotor inducible puede incluir un factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT) o un elemento de respuesta transcripcional (TRE) AP1. Tras el reconocimiento del complejo de péptido relacionado-MHC1, el NFAT puede sufrir una traslocación hacia el núcleo dependiente del Ca^{2+} donde promueve la transcripción de genes que albergan un NFAT TRE. Los NFAT TRE adecuados son conocidos en la disciplina, entre ellos se encuentra el NFAT TRE del promotor de la IL-2 humana (Macian et al (2001) Oncogene, 2001 Apr. 30; 20(19):2476-89). Zhang et al. ("Tumor-Infiltrating Lymphocytes Genetically Engineered with an Inducible Gene Encoding Interleukin-12 for the Immunotherapy of Metastatic Melanoma", Clin. Cancer Res. 21:2278-2288, 2015) describen el uso en un ensayo clínico con linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) genéticamente modificados para que segreguen una IL-12 monocatenaria, cuya expresión es controlada por un promotor NFAT inducible. Los contenidos de esas referencias citadas se incorporan íntegramente a la presente memoria como referencia.

[000101] En ciertas formas de realización, el promotor inducible puede incluir un promotor CD69, p. ej., como el dado a conocer en la patente de EE. UU. 5.759.805, cuyo contenido se incorpora íntegramente como referencia. El CD69 puede encontrarse entre las primeras moléculas de activación de la superficie celular que se sintetizan *de novo* en los linfocitos T activados. En los 60 minutos posteriores a la estimulación de los linfocitos T se puede observar ya la expresión de CD69 que, sin embargo, permanece ausente en los linfocitos en reposo. La expresión de CD69 también puede ser inducida en los timocitos, los linfocitos B, los linfocitos citolíticos naturales (células NK) y los neutrófilos. Cuatro regiones no codificantes denominadas CNS1 a 4 y localizadas en las 50 kb que preceden al promotor del CD69 murino pueden contribuir al control temporal y del desarrollo de la activación de los linfocitos B y T a través del CD69. La región CNS2 puede actuar como un potente potenciador. Kulemzin et al. describen, en el contexto de linfocitos T primarios, una

variante del promotor CD69 inducible por la activación que proporciona la máxima inducción ("Design and analysis of stably integrated reporters for inducible transgene expression in human T cells and chimeric antigen receptor (CAR) NK cell lines," BMC Medical Genomics 2019, 12(Suppl 2):44, 88-95; cuyo contenido se incorpora íntegramente como referencia). Por lo tanto, este promotor puede servir para estimular la expresión de proteínas en linfocitos T o en linfocitos T CAR humanos que estén activados, pero no en reposo.

[000102] En ciertas formas de realización, el promotor inducible puede ser un promotor inducible por IPTG. Un promotor inducible por IPTG puede designar cualquier secuencia polinucleotídica que fomente la transcripción como respuesta a la presencia de IPTG o de cualquier otro derivado de la lactosa que promueva la transcripción del operón lac (p. ej. alolactosa). En la disciplina se conocen numerosos ejemplos de promotores inducibles por IPTG, tales como los promotores tac (p. ej. tacl, tacll, etc.) , los promotores lac, y derivados de los mismos (p. ej. lacUV5, taclac, etcétera).

[000103] En un aspecto, la expresión de un vector vírico 4-en-1, p. ej. un vector lentivírico, portador de secuencias codificantes de la cadena α de CD8, la cadena β de CD8, la cadena α de TCR y la cadena β de TCR puede estar regulada por un promotor constitutivo o inducible. Por ejemplo, la Fig. 5A muestra un vector vírico 4-en-1 que contiene PTE CD8 TCR WPRE (SEQ ID N.º 94) provisto de secuencias con codones optimizados que codifican las cadenas α del CD8 (SEQ ID N.º 12) y β del CD8 (SEQ ID N.º 13) situadas por delante de las secuencias que codifican el TCR, p. ej., la cadena α del TCR R11KE (SEQ ID N.º 13) y la cadena β del R11KE (SEQ ID N.º 14), controladas por un promotor constitutivo del MSCV (SEQ ID N.º 1). Las mismas secuencias codificantes descritas antes también pueden estar controladas por un promotor inducible, p. ej., un promotor NFAT, CD69 o IPTG.

[000104] En otro aspecto, la expresión de un vector vírico 3-en-1 portador de secuencias codificantes de una proteína de fusión, una cadena α de TCR y una cadena β de TCR puede estar regulada por un promotor constitutivo o inducible. Por ejemplo, la Fig. 5B muestra un vector vírico que contiene CD8aCD4Fusión.TCR WPRE (SEQ ID N.º 256)

provista de una secuencia con codones optimizados que codifica una proteína de fusión, en la cual el dominio extracelular de CD8 α está fusionado con el dominio transmembrana de CD4 y con el dominio intracelular de CD4, y las secuencias que codifican la cadena α del TCR R11KE (SEQ ID N.º 13) y la cadena β del R11KE (SEQ ID N.º 14) están reguladas por el promotor del MSCV (SEQ ID N.º 1). La Fig. 5C muestra un vector vírico que contiene CD8aCD4Fusión.TCR WPRE (SEQ ID N.º 257) provista de una secuencia con codones optimizados que codifica una proteína de fusión, en la cual el dominio extracelular de CD8 β está fusionado con el dominio transmembrana de CD4 y con el dominio intracelular de CD4, y las secuencias que codifican la cadena α del TCR R11KE (SEQ ID N.º 13) y la cadena β del R11KE (SEQ ID N.º 14) están reguladas por el promotor del MSCV (SEQ ID N.º 1). La Fig. 5D muestra un vector vírico que contiene CD8bCD8aFusión.TCR WPRE (SEQ ID N.º 258) provisto de secuencias que codifican una proteína de fusión, en la cual el dominio extracelular de CD8 β está fusionado con el dominio transmembrana de CD8 α y con el dominio intracelular de CD8 α , y las secuencias que codifican la cadena α del TCR R11KE (SEQ ID N.º 13) y la cadena β del R11KE (SEQ ID N.º 14) están reguladas por el promotor del MSCV (SEQ ID N.º 1). Las mismas secuencias codificantes descritas antes también pueden estar controladas por un promotor inducible, p. ej., un promotor NFAT, CD69 o IPTG.

[000105] En un aspecto, la expresión de un vector vírico 4-en-1 de la presente descripción puede ser controlada por promotores bidireccionales constitutivos y/o inducibles. Por ejemplo, la Fig. 6A muestra un vector vírico 4-en-1 que contiene PGK.CD8.EF1a.TCR (SEQ ID N.º 259) provisto de secuencias con codones optimizados que codifican la cadena α del CD8 y la cadena β del CD8 situadas por delante de las secuencias que codifican la cadena α del TCR R11KE y la cadena β del R11KE, en el cual las secuencias codificantes de la cadena α del CD8, la cadena β del CD8 y las secuencias codificantes de la cadena α del TCR R11KE y la cadena β del R11KE pueden estar separadas por promotores bidireccionales, p. ej., el promotor de PGK y el promotor de EF-1 α . El promotor de PGK puede estar situado en el extremo 3' de las secuencias con codones optimizados que codifican la cadena α del CD8 y la cadena β del CD8 para regular la expresión de estas dos cadenas α y β del CD8. El promotor de EF-1 α puede estar situado en el extremo 5' de

las secuencias que codifican la cadena α del TCR R11KE y la cadena β del R11KE para regular la expresión de estas dos cadenas α y β del TCR R11KE.

[000106] La Fig. 6B muestra otro vector 4-en-1 que contiene PGK.TCR.EF1a.CD8 (SEQ ID N.º 260) portador de secuencias que codifican la cadena α del TCR R11KE y la cadena β del R11KE situadas por delante de las secuencias con codones optimizados que codifican la cadena α del CD8 y la cadena β del CD8, en el cual las secuencias codificantes de la cadena α del TCR R11KE y la cadena β del R11KE y las secuencias codificantes de la cadena α del CD8 y la cadena β del CD8 pueden estar separadas por promotores bidireccionales, p. ej., el promotor de PGK y el promotor de EF-1 α . El promotor de PGK puede estar situado en el extremo 3' de las secuencias que codifican la cadena α del TCR R11KE y la cadena β del R11KE para regular la expresión de estas dos cadenas α y β del R11KE. El promotor de EF-1 α puede estar situado en el extremo 5' de las secuencias con codones optimizados que codifican la cadena α del CD8 y la cadena β del CD8 para regular la expresión de estas dos cadenas α y β del CD8.

[000107] Algunas formas de realización de la presente descripción pueden incluir vectores víricos que contengan secuencias codificantes de una cadena α de TCR y de una cadena β de TCR y secuencias que codifiquen otras proteínas, tales como citocinas (entre otras, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 o IL-21), una proteína de fusión formada por la IL-15 con el receptor de la IL-15 (IL-15R), un receptor del TGF- β dominante-negativo (DN TGF β RII), y/o el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento transformante β . En ciertas formas de realización, esas secuencias codificantes pueden estar controladas por un promotor o por promotores bidireccionales.

[000108] La Fig. 7 muestra un vector vírico que contiene secuencias codificantes de la cadena α de TCR y la cadena β de TCR situadas por delante de las secuencias codificantes de las citocinas, en el que las secuencias codificantes de la cadena α y la cadena β del TCR y las secuencias codificantes de las citocinas pueden estar separadas por promotores bidireccionales. Los promotores bidireccionales pueden estar organizados en dirección 5' a 3', en las combinaciones de constitutivo-constitutivo, constitutivo-inducible, inducible-constitutivo o inducible-inducible. Por ejemplo, un promotor constitutivo

como, p. ej., el promotor de MSCV, PGK o EF1- α puede estar situado en el extremo 3' de las secuencias que codifican la cadena α del TCR y la cadena β del TCR para regular la expresión de estas dos cadenas α y β del TCR. Y un promotor inducible como, por ejemplo, el promotor NFAT, CD69 e IPTG, puede estar situado en el extremo 5' de las secuencias que codifican las citocinas para regular la expresión de estas citocinas. La Fig. 8A muestra un promotor NFAT inducible con un promotor mínimo de IL-2 situado en el extremo 5' de las secuencias que codifican la IL-12, p. ej., la proteína de fusión IL-12 α (p35)/IL-12 β (p40) (SEQ ID N.º 261) para regular la expresión de la proteína de fusión IL-12 α (p35)/IL-12 β (p40) en el vector vírico mostrado en la Fig. 7. La Fig. 8B muestra un promotor de CD69 inducible con elementos potenciadores CNS1 y CNS2 situado en el extremo 5' de las secuencias que codifican la IL-12, p. ej., la proteína de fusión IL-12 α (p35)/IL-12 β (p40) (SEQ ID N.º 262) para regular la expresión de la proteína de fusión IL-12 α (p35)/IL-12 β (p40) en el vector vírico mostrado en la Fig. 7. La Fig. 8C muestra un promotor NFAT inducible con un promotor mínimo de IL-2 situado en el extremo 5' de las secuencias que codifican la IL-18, p. ej., la variante 1 de la IL-18 (SEQ ID N.º 263) para regular la expresión de la variante 1 de la IL-18 en el vector vírico mostrado en la Fig. 7. La Fig. 8D muestra un promotor CD69 inducible con elementos potenciadores CNS1 y CNS2 situado en el extremo 5' de las secuencias que codifican la IL-18, p. ej., la variante 1 de la IL-18 (SEQ ID N.º 264) para regular la expresión de la variante 1 de la IL-18 en el vector vírico mostrado en la Fig. 7.

[000109] En un aspecto, la descripción proporciona un constructo 4-en-1 con una orientación de CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α en dirección extremo 5'a extremo 3'. En otro aspecto, la descripción proporciona un constructo 4-en-1 con una orientación de CD8 β -CD8 α -TCR α -TCR β en dirección extremo 5'a extremo 3'. En otro aspecto, la descripción proporciona un constructo 4-en-1 con una orientación de CD8 α -CD8 β -TCR β -TCR α en dirección extremo 5'a extremo 3'. En otro aspecto, la descripción proporciona un constructo 4-en-1 con una orientación de CD8 α -CD8 β -TCR α -TCR β en dirección extremo 5' a extremo 3'.

[000110] En un aspecto, la descripción proporciona un constructo 4-en-1 con una orientación en dirección extremo 5' a extremo 3' que no incluye a TCR β -TCR α -CD8 α -

CD8 β . En otro aspecto, la descripción proporciona un constructo 4-en-1 con una orientación en dirección extremo 5' a extremo 3' que no incluye a TCR β -TCR α -CD8 β -CD8 α . En otro aspecto, la descripción proporciona un constructo 4-en-1 con una orientación en dirección extremo 5' a extremo 3' que no incluye a TCR α -TCR β -CD8 α -CD8 β . En otro aspecto, la descripción proporciona un constructo 4-en-1 con una orientación en dirección extremo 5' a extremo 3' que no incluye a TCR α -TCR β -CD8 β -CD8 α .

[000111] En un aspecto, la descripción proporciona un constructo 4-en-1 con una orientación de CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α en dirección extremo 5' a extremo 3'. En un aspecto no limitante, la descripción proporciona un constructo 4-en-1 con una orientación en dirección extremo 5' a extremo 3' que no incluye a TCR β -TCR α -CD8 α -CD8 β .

[000112] En ciertas formas de realización, los vectores víricos de la presente descripción pueden contener secuencias codificantes de la cadena α de TCR y la cadena β de TCR y secuencias codificantes de inhibidores del TGF- β , p. ej., el receptor del TGF- β dominante-negativo (DN TGF β RII) y/o el dominio extracelular de un receptor del factor de crecimiento transformante- β . La Fig. 9A muestra un vector vírico que contiene secuencias codificantes de la cadena α de TCR y la cadena β de TCR situadas por delante de las secuencias codificantes del DN TGF β RII, en el que las secuencias codificantes de la cadena α y la cadena β del TCR y las secuencias codificantes del DN TGF β RII pueden estar separadas por promotores bidireccionales. Por ejemplo, la Fig. 9A muestra un promotor constitutivo, p. ej., un promotor de MSCV, Ubc, CMB, EF-1 α o de PGK, que puede estar situado en el extremo 3' de las secuencias que codifican la cadena α del TCR y la cadena β del TCR para regular la expresión de estas dos cadenas α y β del TCR; y otro promotor constitutivo que puede estar situado en el extremo 5' de las secuencias que codifican el DN TGF β RII para regular la expresión de este último.

[000113] O alternativamente, la Fig. 9B muestra un vector vírico que contiene un promotor constitutivo, p. ej., un promotor de MSCV, Ubc, CMV, EF-1 α o de PGK, situado en el extremo 5' de las secuencias codificantes del DN TGF β RII situadas por delante de las secuencias que codifican la cadena α del TCR y la cadena β del TCR para controlar la

expresión del DN TGFbRII, de la cadena α del TCR y de la cadena β del TCR. Las mismas secuencias codificantes descritas antes también pueden estar controladas por un promotor inducible, p. ej., un promotor NFAT, CD69 o IPTG.

[000114] Tal y como se usa en la presente memoria, el término “cistrón” define un segmento de la molécula de ADN que especifica la formación de una cadena polipeptídica, es decir, que codifica una cadena polipeptídica. Por ejemplo, “bicistrón” define dos segmentos de la molécula de ADN que especifican la formación de dos cadenas polipeptídicas, es decir, codifican dos cadenas polipeptídicas; “tricistrón” define tres segmentos de la molécula de ADN que especifica la formación de tres cadenas polipeptídicas, es decir, que codifican tres cadenas polipeptídicas; etc.

[000115] Tal y como se emplea en la presente memoria, el término “ARN multicistrónico” o “ARN-multicistrónico” define un ARN que contiene la información genética necesaria para traducir varias proteínas. En cambio, un ARN monocistrónico contiene la información genética necesaria para traducir una sola proteína. En el contexto de la presente descripción, el ARN multicistrónico transcrito a partir del lentivirus que aparece en los ejemplos 2 a 4 puede ser traducido en cuatro proteínas (4-en-1): cadena TCR α , cadena TCR β , cadena CD8 α y cadena CD8 β ; o bien traducido en dos proteínas (2-en-1): la cadena TCR α y la cadena TCR β o la cadena CD8 α y la cadena CD8 β .

[000116] Tal y como se emplea en la presente memoria, el término “dispuesto en tándem” define la disposición de los genes de forma contigua, uno después o detrás del otro, en una sola fila en una secuencia de ácidos nucleicos. Los genes permanecen unidos en solución de continuidad en la secuencia de ácidos nucleicos, con las hebras de sentido de cada gen ligadas juntas en la secuencia de ácidos nucleicos.

[000117] Tal y como se emplea en la presente memoria, el término “cadena o hebra de sentido” define la hebra de ADN de un gen que es traducida o es traducible en proteína. Cuando en una secuencia de ácidos nucleicos el gen está orientado en la dirección 5’ a 3’ (“sentido”) con respecto al promotor, la “cadena de sentido” está situada en el extremo 5’ por detrás del promotor, en la cual el primer codón de ácidos nucleicos que codifica la proteína queda próximo al promotor y el último codón está situado distalmente al promotor.

[000118] Tal y como se emplea en la presente memoria, el término “vector vírico” designa un constructo de vector de ácidos nucleicos que incluye al menos un elemento de origen vírico y que tiene la capacidad de ser empaquetado en una partícula vírica que actúa como vector, y que codifica al menos un ácido nucleico exógeno. El vector y/o la partícula pueden ser utilizados con el fin de transferir cualquier ácido nucleico a células, en condiciones *in vitro* o *in vivo*. En la disciplina se conocen numerosas formas de vectores víricos. El término “virión” se usa para designar una sola partícula vírica infecciosa. “Vector vírico”, “partícula de vector vírico” y “partícula vírica” también designan una partícula vírica completa con su ADN o ARN nuclear y su cubierta proteica como existe fuera de la célula. Por ejemplo, se puede seleccionar un vector vírico entre los adenovirus, poxvirus, alfavirus, arenavirus, flavivirus, rhabdovirus, retrovirus, lentivirus, herpesvirus, paramixovirus o picornavirus.

[000119] Los términos “linfocito T” o “célula T” son reconocidos en la disciplina y abarcan los timocitos, linfocitos T vírgenes, linfocitos T inmaduros, linfocitos T maduros, linfocitos T en reposo y linfocitos T activados. Algunas poblaciones ilustrativas de linfocitos T que son aptas para formas de realización particulares son, entre otras, los linfocitos T cooperadores (HTL; linfocito T CD4+), linfocito T citotóxico (CTL; linfocito T CD8+), linfocito T CD4+CD8+, linfocito T CD4-CD8-, linfocito T citolítico natural (NKT), linfocitos T que expresan TCR $\alpha\beta$ (linfocitos T $\alpha\beta$), linfocitos T que expresan TCR $\gamma\delta$ (linfocitos T $\gamma\delta$), o cualquier otro subtipo de linfocitos T. Otras poblaciones ilustrativas de linfocitos T aptos para el uso en formas de realización particulares son, entre otras, los linfocitos T que expresan uno o más de los marcadores siguientes: CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127, CD197 y HLA-DR y si se desea, se pueden aislar aún más mediante técnicas de selección positiva o negativa.

[000120] El término “estatina”, “vastatina”, o utilizado indistintamente en la presente memoria como “inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa” define un fármaco que inhibe a la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Esta enzima interviene en la conversión de la HMG-CoA en mevalonato, que es una de las etapas de la biosíntesis del colesterol. Tal inhibición se determina fácilmente con ensayos estándar bien conocidos por las personas versadas en la disciplina.

[000121] Las estatinas preferidas para el uso de acuerdo con la presente descripción incluyen la atorvastatina, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 4.681.893; la atorvastatina cálcica, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 5.273.995; la cerivastatina, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 5.502.199; la dalvastatina, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 5.316.765; la fluindostatina, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 4.915.954; la fluvastatina, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 4.739.073; la lovastatina, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 4.231.938; la mevastatina, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 3.983.140; la pravastatina, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 4.346.227; la simvastatina, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 4.444.784; la velostatina, dada a conocer en la patente de EE.UU. N.º 4.448.784 y en la patente de EE.UU. N.º 4.450.171; y la rosuvastatina, dada a conocer en las patentes de EE.UU. N.º 6.858.618 y 7.511.140, cuyos contenidos se incorporan íntegramente a la presente memoria como referencia. Ejemplos representativos de inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa pueden ser la atorvastatina; la atorvastatina cálcica, también llamada Liptor®; la lovastatina, también llamada Mevacor®; la pravastatina, también llamada Pravachol®; la simvastatina, también llamada Zocor®, y la rosuvastatina.

[000122] En un aspecto, la presente descripción concierne a la activación, la transducción y/o la expansión de linfocitos T, p. ej. linfocitos infiltrantes en tumores, linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+ y linfocitos T $\gamma\delta$, que pueden ser utilizados para la expresión de transgenes. En otro aspecto, la descripción concierne a la activación, la transducción y la expansión de linfocitos T $\gamma\delta$ acompañada de la eliminación simultánea de los linfocitos portadores de TCR α y/o β .

[000123] En un aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden ser aislados de una muestra compleja que se cultiva *in vitro*. En otro aspecto, la población entera de PBMC puede ser activada y expandida, sin eliminar antes poblaciones celulares concretas, como monocitos, linfocitos T $\alpha\beta$, linfocitos B y células NK. En otro aspecto se pueden generar poblaciones de linfocitos T $\gamma\delta$ antes de su activación y expansión específica. En otro aspecto, la activación y la expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$ se pueden efectuar sin la presencia de APC naturales o genomodificadas. En otros aspectos, el aislamiento y la expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$

se puede llevar a cabo a partir de especímenes tumorales mediante mitógenos inmovilizados de linfocitos T $\gamma\delta$, como anticuerpos específicos contra TCR $\gamma\delta$, y otros agentes activadores de los TCR $\gamma\delta$, como las lectinas. En otro aspecto, el aislamiento y la expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$ a partir de especímenes tumorales se puede efectuar en ausencia de mitógenos de los linfocitos T $\gamma\delta$, como anticuerpos específicos contra TCR $\gamma\delta$, y otros agentes activadores de los TCR $\gamma\delta$, como las lectinas.

[000124] En un aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ son aislados de la leucocitaféresis de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. En otro aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ no se aíslan de entre los linfocitos monomorfonucleares de sangre periférica (PBMC).

[000125] En un aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ aislados se pueden expandir con rapidez en respuesta al contacto con uno o más antígenos. Algunos linfocitos T $\gamma\delta$, como los linfocitos T V γ 9V δ 2+ se pueden expandir con rapidez *in vitro* en respuesta al contacto con ciertos antígenos, como prenol-pirofosfatos, alquilaminas y metabolitos o extractos microbianos durante el cultivo celular. Los linfocitos T $\gamma\delta$ estimulados exhiben numerosas moléculas de presentación de antígenos, coestimuladoras y de adhesión que pueden facilitar el aislamiento de los linfocitos T $\gamma\delta$ de una muestra compleja. Los linfocitos T $\gamma\delta$ contenidos en una muestra compleja pueden ser estimulados *in vitro* con al menos un antígeno durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días u otro período de tiempo adecuado. La estimulación de los linfocitos T $\gamma\delta$ con un antígeno adecuado puede expandir la población de linfocitos T $\gamma\delta$ en condiciones *in vitro*.

[000126] Algunos ejemplos no limitantes de antígenos que pueden ser utilizados para estimular la expansión de linfocitos T $\gamma\delta$ procedentes de una muestra compleja en condiciones *in vitro* incluyen: prenol-pirofosfatos, como el pirofosfato de isopentenilo (IPP), alquilaminas, metabolitos de microbios patógenos humanos, metabolitos de bacterias comensales, metil-3-butenil-1-pirofosfato (2M3B1PP), pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo (HMB-PP), pirofosfato de etilo (EPP), pirofosfato de farnesilo (FPP), fosfato de dimetilalilo (DMAP), pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), trifosfato de etil-adenosina (EPPPA), pirofosfato de geranilo (GPP), pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), trifosfato de isopentenil-adenosina (IPPPA), fosfato de monoetilo (MEP), pirofosfato de monoetilo

(MEPP), 3-formil-1-butil-pirofosfato (TUBAg 1), X-pirofosfato (TUBAg 2), trifosfato de 3-formil-1-butil-uridina (TUBAg 3), trifosfato de 3-formil-1-butil-desoxitimidina (TUBAg 4), monoetilalquilaminas, pirofosfato de alilo, pirofosfato de crotoilo, trifosfato de dimetilalilo- γ -uridina, trifosfato de crotoil- γ -uridina, trifosfato de alil- γ -uridina, etilamina, isobutilamina, sec-butilamina, iso-amilamina y bisfosfonatos nitrogenados.

[000127] La activación y la expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$ se puede efectuar con agentes activadores y coestimuladores descritos en la presente memoria con el fin de desencadenar la proliferación de linfocitos T $\gamma\delta$ específicos y asegurar la persistencia de las poblaciones. En un aspecto, la activación y la expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$ de distintos cultivos se puede lograr con distintos subgrupos clonales o poblaciones policlonales mixtas. En otro aspecto, se pueden usar diferentes agonistas para identificar los agentes que proporcionen señales activadoras específicas de $\gamma\delta$. En otro aspecto, los agentes que proporcionan señales activadoras específicas de $\gamma\delta$ pueden ser diferentes anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra los TCR $\gamma\delta$. En otro aspecto se pueden usar agentes coestimuladores que ayuden a desencadenar una proliferación de linfocitos T $\gamma\delta$ específicos sin estimular la energía ni la apoptosis de los linfocitos. Estos agentes coestimuladores pueden incluir ligandos que se unan a receptores que se expresan en linfocitos $\gamma\delta$, tales como NKG2D, CD161, CD70, JAML, molécula accesoria de DNAX-1 (DNAM-1), ICOS, CD27, CD137, CD30, HVEM, SLAM, CD122, DAP y CD28. En otro aspecto, los agentes coestimuladores pueden ser anticuerpos específicos de epítomos únicos situados en las moléculas CD2 y CD3. CD2 y CD3 pueden tener distintas estructuras conformacionales cuando se expresan en linfocitos T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. En otro aspecto, anticuerpos específicos contra el CD3 y el CD2 pueden conducir a una activación distinta de los linfocitos T $\gamma\delta$.

[000128] Se puede expandir *ex vivo* una población de linfocitos T $\gamma\delta$ antes de proceder a la genomodificación de los linfocitos T $\gamma\delta$. Ejemplos no limitantes de reactivos que pueden servir para facilitar la expansión de una población de linfocitos T $\gamma\delta$ en condiciones *in vitro* son: anticuerpos anti-CD3 o anti-CD2, anti-CD27, anti-CD30, anti-CD70 o anti-OX40, IL-2, IL-15, IL-12, IL-9, IL-33, IL-18 o IL-21, CD70 (ligando del CD27), fitohemaglutinina (PHA), concavalina A (ConA), fitolaca (PWM), aglutinina del cacahuete (PNA), aglutinina de soja

(SBA), aglutinina de lenteja [*Lens culinaris*] (LCA), aglutinina de guisante [*Pisum sativum*] (PSA), aglutinina de *Helix pomatia* (HPA), lectina de veza [*Vicia graminea*] (VGA) u otro mitógeno adecuado capaz de estimular la proliferación de los linfocitos T.

[000129] La capacidad de los linfocitos T $\gamma\delta$ para reconocer un amplio espectro de antígenos se puede reforzar mediante la genomodificación de los linfocitos T $\gamma\delta$. En un aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden ser genomodificados para proporcionar un tratamiento alogénico universal que reconozca un antígeno de elección *in vivo*. La genomodificación de los linfocitos T $\gamma\delta$ puede incluir la integración estable en el genoma de linfocitos T $\gamma\delta$ aislados de un constructo que exprese una fracción reconocedora de tumores, como un TCR $\alpha\beta$, un TCR $\gamma\delta$ o un receptor antigénico quimérico (CAR), que combine tanto la función de unión a antígeno como la de activación de linfocitos T en un mismo receptor, un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un dominio de activación de linfocitos, una citocina (por ejemplo, IL-15, IL-12, IL-2, IL-7, IL-21, IL-18, IL-19, IL-33, IL-4, IL-9, IL-23 o IL-1 β) para reforzar la proliferación, la supervivencia y el funcionamiento de los linfocitos T en condiciones *ex vivo* e *in vivo*. La genomodificación del linfocito T $\gamma\delta$ aislado también puede incluir la delección o la alteración de la expresión de uno o más genes endógenos propios del genoma de los linfocitos T $\gamma\delta$ aislados, como un locus o loci del MHC.

[000130] Se pueden generar linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados con diversos métodos. Por ejemplo, en un linfocito T $\gamma\delta$ se puede introducir de forma estable un polinucleótido que codifique un casete de expresión que comprenda una fracción de reconocimiento tumoral, u otro tipo de fracción de reconocimiento, mediante un sistema de transposón/transposasas o un sistema vírico de transferencia génica, como un sistema retrovírico o lentivírico, u otro método adecuado, como transfección, electroporación, transducción, lipofección, fosfato de calcio (CaPO₄), sustancias de nanoingeniería como Ormosil, métodos con vectores víricos, tales como adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados, u otro método adecuado. En terapia génica humana se han usado diversos métodos víricos, como los métodos descritos en la WO 1993020221, cuyo contenido se incorpora íntegramente a la presente memoria. Ejemplos no limitantes de métodos víricos que pueden servir para genomodificar linfocitos T $\gamma\delta$ consisten en

métodos víricos basados en γ-retrovirus, adenovirus, lentivirus, virus del herpes simple, virus vacunal (vaccinia), poxvirus, o virus adenoasociados.

[000131] En un aspecto, los constructos y vectores descritos en la presente memoria se usan con los métodos descritos en U.S. 16/200.308, presentada el 26 de noviembre de 2018, cuyo contenido se incorpora íntegramente como referencia.

[000132] En un aspecto, los virus conciernen tanto a virus naturales como a virus artificiales. De acuerdo con algunas formas de realización de la presente descripción los virus pueden tener envoltura o no tenerla. Los parvovirus (como los AAV) constituyen un ejemplo de virus sin envoltura. En una forma de realización preferida, los virus pueden ser virus con envoltura. En formas de realización preferidas, los virus pueden ser retrovirus y, en particular, lentivirus. Las proteínas de la envoltura vírica que pueden promover la infección vírica de células eucariotas pueden incluir vectores lentivíricos (LV) derivados del VIH-1 seudotipados con glucoproteínas (GP) de la envoltura extraídas del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), del retrovirus endógeno felino modificado (RD114TR) (SEQ ID N.º 97) o del virus de la leucemia del gibón modificado (GALVTR). Estas proteínas de la envoltura pueden promover eficazmente la entrada de otros virus, como los parvovirus, incluidos los virus adenoasociados (AAV), lo cual demuestra su amplia eficacia. Por ejemplo, se pueden usar otras proteínas de la envoltura vírica como la 4070 env del virus de la leucemia murina de Moloney (MLV) (como se describe en Merten et al., *J. Virol.* 79:834-840, 2005; el contenido del cual se incorpora íntegramente a la presente memoria como referencia), la RD114 env, proteína de la envoltura quimérica del virus RD114pro o RDpro (quimera entre el RD114 y el VIH, construida sustituyendo la secuencia de corte del péptido R del RD114 por la secuencia de corte de la matriz/cápside (MA/CA) del VIH-1, como se describe en Bell et al. *Experimental Biology and Medicine* 2010; 235: 1269–1276; el contenido del cual se incorpora íntegramente a la presente memoria como referencia), la GP64 env de baculovirus (como se describe en Wang et al. *J. Virol.* 81:10869-10878, 2007; el contenido del cual se incorpora íntegramente a la presente memoria como referencia), o la GALV env (como se describe en Merten et al., *J. Virol.* 79:834-840, 2005; el contenido del cual se incorpora íntegramente a la presente memoria como referencia), o derivados de las mismas.

[000133] Las formas de realización de la presente descripción se basan en el descubrimiento de que con una sola casete lentivírica es posible crear un vector lentivírico, vector que permitirá la expresión de al menos cuatro proteínas monoméricas individuales de dos dímeros distintos a partir de un solo ARNm multicistrónico, de modo que los dímeros se expresen conjuntamente en la superficie celular. Por ejemplo, la integración de una sola copia del vector lentivírico fue suficiente para transformar linfocitos T $\gamma\delta$ y que expresaran al mismo tiempo TCR $\alpha\beta$ y CD8 $\alpha\beta$.

[000134] En un aspecto, la presente descripción concierne a vectores que contienen una casete multicistrónica dentro de un mismo vector que es capaz de hacer que se expresen más de uno, más de dos, más de tres, más de cuatro genes, más de cinco genes o más de seis genes, en los cuales los polipéptidos codificados por esos genes pueden interactuar entre sí, o pueden formar dímeros. Los dímeros pueden ser homodímeros, es decir, dos proteínas idénticas que forman un dímero, o heterodímeros, es decir, dos proteínas de estructura distinta que forman un dímero.

[000135] En un aspecto, un vector lentivírico puede contener una primera secuencia nucleotídica S1, que codifique una proteína Z, una segunda secuencia nucleotídica S2, que codifique una proteína Z2, una tercera secuencia nucleotídica S3, que codifique una proteína Y1, y una cuarta secuencia nucleotídica S4, que codifique una proteína Y2, en que Z1 y Z2 formen un primer dímero e Y1 y Y2 formen un segundo dímero, en que el primer dímero Z1Z2 será diferente del segundo dímero Y1Y2.

[000136] En un aspecto, el primer vector lentivírico puede contener una casete bicistrónica (2-en-1) que codifique un dímero Z1Z2, y el segundo vector lentivírico puede contener una casete bicistrónica (2-en-1) que codifique un dímero Y1Y2. En los vectores 2-en-1, S1 y S2 pueden estar dispuestos en tándem con S1-S2 o S2-S1 en orientación 5' a 3'. De forma similar, en los vectores 2-en-1, S3 y S4 pueden estar dispuestos en tándem con S3-S4 o S4-S3 en orientación 5' a 3'. Z1 y Z2 o Y1 e Y2 pueden estar separadas por uno o más péptidos 2A autoescindibles.

[000137] En otro aspecto, un mismo vector lentivírico (4-en-1) puede codificar conjuntamente dos dímeros distintos Z1Z2 e Y1Y2, en los cuales Z1, Z2, Y1 e Y2 pueden

estar separadas por uno o más péptidos 2A autoescindibles. Por ejemplo, las secuencias S1, S2, S3 y S4 se pueden disponer en tándem con una orientación 5' a 3' seleccionada entre S1-S2-S3-S4, S1-S2-S4-S3, S1-S3-S2-S4, S1-S3-S4-S2, S1-S4-S3-S2, S1-S4-S2-S3, S2-S1-S3-S4, S2-S1-S4-S3, S2-S3-S1-S4, S2-S3-S4-S1, S2-S4-S3-S1, S2-S4-S1-S3, S3-S1-S2-S4, S3-S1-S4-S2, S3-S2-S1-S4, S3-S2-S4-S1, S3-S4-S1-S2, S3-S4-S2-S1, S4-S1-S2-S3, S4-S1-S3-S2, S4-S2-S1-S3, S4-S2-S3-S1, S4-S3-S1-S2 o S4-S3-S2-S1.

[000138] En un aspecto, el dímero Z1Z2 pueden ser TCR provistos de una cadena TCR α y una cadena TCR β .

[000139] En un aspecto, los TCR y las proteínas de unión a antígeno que son aptos para el uso con los constructos, los métodos y las formas de realización descritas en la presente memoria incluyen, por ejemplo, los citados en la Tabla 2 (SEQ ID N.º 13 a 90) y los TCR y las proteínas de unión a antígeno descritas en la Publicación de EE.UU. 20170267738, la Publicación de EE.UU. 20170312350, la Publicación de EE.UU. 20180051080, la Publicación de EE.UU. 20180164315, la Publicación de EE.UU. 20180161396, la Publicación de EE.UU. 20180162922, la Publicación de EE.UU. 20180273602, la Publicación de EE.UU. 20190016801, la Publicación de EE.UU. 20190002556, la Publicación de EE.UU. 20190135914, la Patente de EE.UU. 10.538.573, la Patente de EE.UU. 10.626.160, la Publicación de EE.UU. 20190321478, la Publicación de EE.UU. 20190256572, la Patente de EE.UU. 10.550.182, la Patente de EE.UU. 10.526.407, la Publicación de EE.UU. 20190284276, la Publicación de EE.UU. 20190016802 y la Patente de EE.UU. 10.583.573, cuyos contenidos y listas de secuencias descritas en ellas se incorporan íntegramente a la presente memoria como referencias.

[000140] En otro aspecto, el dímero Z1Z2 puede ser una cadena TCR α y una cadena TCR β seleccionadas entre R11KEA (SEQ ID N.º 13 y 14), R20P1H7 (SEQ ID N.º 15 y 16), R7P1D5 (SEQ ID N.º 17 y 18), R10P2G12 (SEQ ID N.º 19 y 20), R10P1A7 (SEQ ID N.º 21 y 22), R4P1D10 (SEQ ID N.º 23 y 24), R4P3F9 (SEQ ID N.º 25 y 26), R4P3H3 (SEQ ID N.º 27 y 28), R36P3F9 (SEQ ID N.º 29 y 30), R52P2G11 (SEQ ID N.º 31 y 32), R53P2A9 (SEQ ID N.º 33 y 34), R26P1A9 (SEQ ID N.º 35 y 36), R26P2A6 (SEQ ID N.º 37 y 38), R26P3H1 (SEQ ID N.º 39 y 40), R35P3A4 (SEQ ID N.º 41 y 42), R37P1C9 (SEQ ID N.º 43

y 44), R37P1H1 (SEQ ID N.º 45 y 46), R42P3A9 (SEQ ID N.º 47 y 48), R43P3F2 (SEQ ID N.º 49 y 50), R43P3G5 (SEQ ID N.º 51 y 52), R59P2E7 (SEQ ID N.º 53 y 54), R11P3D3 (SEQ ID N.º 55 y 56), R16P1C10 (SEQ ID N.º 57 y 58), R16P1E8 (SEQ ID N.º 59 y 60), R17P1A9 (SEQ ID N.º 61 y 62), R17P1D7 (SEQ ID N.º 63 y 64), R17P1G3 (SEQ ID N.º 65 y 66), R17P2B6 (SEQ ID N.º 67 y 68), R11P3D3KE (SEQ ID N.º 69 y 70), R39P1C12 (SEQ ID N.º 71 y 72), R39P1F5 (SEQ ID N.º 73 y 74), R40P1C2 (SEQ ID N.º 75 y 76), R41P3E6 (SEQ ID N.º 77 y 78), R43P3G4 (SEQ ID N.º 79 y 80), R44P3B3 (SEQ ID N.º 81 y 82), R44P3E7 (SEQ ID N.º 83 y 84), R49P2B7 (SEQ ID N.º 85 y 86), R55P1G7 (SEQ ID N.º 87 y 88), o R59P2A7 (SEQ ID N.º 89 y 90). En un aspecto, las secuencias exhiben al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o al menos aproximadamente un 98 % con cualquiera de las SEQ ID N.º 13 a 90.

[000141] La Tabla 1 contiene ejemplos de los péptidos a los cuales se unen los TCR cuando el péptido está formando un complejo con una molécula del MHC.

Tabla 1:

Nombres de los TCR	Péptido (nombre/secuencia/SEQ ID N.º)
R20P1H7, R7P1D5 y R10P2G12	MAG-003 (KVLEHVVRV) (SEQ ID N.º 215)
R10P1A7	IGF2BP3-001 (KIQEILTQV) (SEQ ID N.º 123)
R4P1D10, R4P3F9 y R4P3H3	COL6A3-002 (FLLDGSANV) (SEQ ID N.º 238)
R36P3F9, R52P2G11 y R53P2A9	DCAF4L2-001 (ILQDGQFLV) (SEQ ID N.º 193)
R26P1A9, R26P2A6, R26P3H1, R35P3A4, R37P1C9, R37P1H1, R42P3A9, R43P3F2, R43P3G5 y R59P2E7	MAGEA1-003 (KVLEYVIKV) (SEQ ID N.º 202)
R11KEA, R11P3D3, R16P1C10, R16P1E8, R17P1A9, R17P1D7, R17P1G3, R17P2B6 y	PRAME-004 (SLLQHLIGL) (SEQ ID N.º 147)

R11P3D3KE	
R39P1C12, R39P1F5, R40P1C2, R41P3E6, R43P3G4, R44P3B3, R44P3E7, R49P2B7, R55P1G7 y R59P2A7	SPINK2-001 (ALSVLRLAL) (SEQ ID N.º 248)

[000142] En un aspecto, los péptidos antigénicos asociados a tumores (AAT) que son susceptibles de uso con los métodos y las formas de realización descritos en la presente memoria son, por ejemplo, los citados en la Tabla 3 y aquellos péptidos AAT descritos en la publicación de EE.UU. 20160187351, publicación de EE.UU. 20170165335, publicación de EE.UU. 20170035807, publicación de EE.UU. 20160280759, publicación de EE.UU. 20160287687, publicación de EE.UU. 20160346371, publicación de EE.UU. 20160368965, publicación de EE.UU. 20170022251, publicación de EE.UU. 20170002055, publicación de EE.UU. 20170029486, publicación de EE.UU. 20170037089, publicación de EE.UU. 20170136108, publicación de EE.UU. 20170101473, publicación de EE.UU. 20170096461, publicación de EE.UU. 20170165337, publicación de EE.UU. 20170189505, publicación de EE.UU. 20170173132, publicación de EE.UU. 20170296640, publicación de EE.UU. 20170253633, publicación de EE.UU. 20170260249, publicación de EE.UU. 20180051080, publicación de EE.UU. N.º 20180164315, publicación de EE.UU. 20180291082, publicación de EE.UU. 20180291083, publicación de EE.UU. 20190255110, patente de EE.UU. 9.717.774, patente de EE.UU. 9.895.415, publicación de EE.UU. 20190247433, publicación de EE.UU. 20190292520, publicación de EE.UU. 20200085930, patente de EE.UU. 10.336.809, patente de EE.UU. 10.131.703, patente de EE.UU. 10.081.664, patente de EE.UU. 10.081.664, patentes de EE.UU. 10.093.715, 10.583.573, y US20200085930, cuyos contenidos, secuencias y listas de secuencias descritas en ellas se incorporan íntegramente a la presente memoria como referencias.

[000143] En otro aspecto, el dímero Z1Z2 puede estar formado por módulos de señalización diméricos de linfocitos T, como CD3δ/ε, CD3γ/ε, y CD247 ζ/ζ o ζ/η, un dímero formado por una región variable de TCRα (Vα) y una región variable de TCRβ (Vβ), un dímero formado por una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) y una

región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL), un dímero de V α y V H , un dímero de V α y VL, un dímero de V β y V H o un dímero de V β y VL.

[000144] En otro aspecto, Y1Y2 puede ser una cadena CD8 α y una cadena CD8 β o cualquier otro receptor de membrana dimérico que sea adecuado, preferentemente los expresados en los linfocitos T CD8+ y/o los linfocitos T CD4+.

[000145] La furina es una proproteína convertasa similar a la subtilisina ubicua, entre cuyos sustratos naturales se encuentran ciertas proteínas séricas y receptores de factores de crecimiento, como el receptor del factor de crecimiento insulinoide. La secuencia de consenso para la escisión por la furina es RXXR (SEQ ID N.º 7) pero el potencial para la escisión real depende de la estructura terciaria del sustrato y de los aminoácidos aledaños al sitio de reconocimiento. La incorporación de un sitio de escisión para la furina y de secuencias conectoras (GSG o SGSG [SEQ ID N.º 8]) puede posibilitar una expresión génica de gran eficiencia.

[000146] En un aspecto, se puede situar una secuencia nucleotídica consistente en furina-conector-péptido 2A dispuesta en tándem entre Z1 y Z2, entre Z1 e Y1, entre Z1 e Y2, entre Z2 e Y1, entre Z2 e Y2 y/o entre Y1 e Y2. La furina puede tener una secuencia de consenso de RXXR (SEQ ID N.º 7), p. ej. RAKR (SEQ ID N.º 2). La secuencia del conector puede ser GSG o SGSG (SEQ ID N.º 8). El péptido 2A puede seleccionarse entre P2A (SEQ ID N.º 3), T2A (SEQ ID N.º 4), E2A (SEQ ID N.º 5) o F2A (SEQ ID N.º 6), o cualquier combinación de los mismos.

[000147] En otro aspecto, se puede situar una secuencia nucleotídica consistente en conector-péptido 2A dispuesta en tándem entre Z1 y Z2, entre Z1 e Y1, entre Z1 e Y2, entre Z2 e Y1, entre Z2 e Y2 y/o entre Y1 e Y2. La secuencia del conector puede ser GSG o SGSG (SEQ ID N.º 8). El péptido 2A puede seleccionarse entre P2A (SEQ ID N.º 3), T2A (SEQ ID N.º 4), E2A (SEQ ID N.º 5) o F2A (SEQ ID N.º 6), o cualquier combinación de los mismos.

[000148] En un aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados (o transducidos) se pueden expandir *ex vivo* sin la estimulación con una célula presentadora de antígeno o con aminobisfosfonato. Los linfocitos T genomodificados que reaccionan al antígeno de la

presente descripción se pueden expandir *ex vivo* e *in vivo*. En otro aspecto, una población activa de linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la presente descripción se pueden expandir *ex vivo* sin la estimulación antigénica proporcionada por una célula presentadora de antígeno, un péptido antigénico, una molécula no peptídica, un compuesto de molécula pequeña, como un aminobisfosfonato, pero usando ciertos anticuerpos, citocinas, mitógenos o proteínas de fusión, como la fusión de IL-17 con Fc, la fusión de MICA con Fc y la fusión de CD70 con Fc. Ejemplos de anticuerpos que pueden servir para la expansión de una población de linfocitos T $\gamma\delta$ pueden incluir anticuerpos anti-CD3, anti-CD27, anti-CD30, anti-CD70, anti-OX40, anti-NKG2D o anti-CD2, ejemplos de citocinas pueden incluir IL-2, IL-15, IL-12, IL-21, IL-18, IL-9, IL-7 y/o IL-33, y ejemplos de mitógenos pueden incluir el CD70, el ligando del CD27 humano, fitohemaglutinina (PHA), concavalina A (ConA), mitógeno de fitolaca (PWM), aglutinina de cacahuete (PNA), aglutinina de soja (SBA), aglutinina de lenteja [*Lens culinaris*] (LCA), aglutinina de guisante [*Pisum sativum*] (PSA), aglutinina de *Helix pomatia* (HPA), lectina de veza [*Vicia graminea*] (VGA) u otro mitógeno adecuado que sea capaz de estimular la proliferación de los linfocitos T. En otro aspecto, una población de linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados se puede expandir en menos de 60 días, en menos de 48 días, en menos de 36 días, en menos de 24 días, en menos de 12 días o en menos de 6 días. En otro aspecto, una población de linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados se puede expandir desde unos 7 días a unos 49 días, desde unos 7 días a unos 42 días, desde unos 7 días a unos 35 días, desde unos 7 días a unos 28 días, desde unos 7 días a unos 21 días o desde unos 7 días a unos 14 días.

[000149] En otro aspecto, la presente descripción proporciona métodos para la expresión *ex vivo* de una población de linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados para terapias de transferencia adoptiva. Los linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la descripción se pueden expandir *ex vivo*. Los linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la descripción se pueden expandir *in vitro* sin activación por APC, o sin cultivo conjunto con APC, ni aminofosfatos.

[000150] Métodos de tratamiento

[000151] Las composiciones que contienen linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados que se describen en la presente memoria pueden ser administradas para tratamientos

profilácticos y/o terapéuticos. En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto que ya sufre una enfermedad o un trastorno en una cantidad suficiente para curar o por lo menos paliar los síntomas de la enfermedad o del trastorno. Un linfocito T γδ genomodificado también se puede administrar para reducir la probabilidad de desarrollar, contraer o agravar una enfermedad. Las cantidades eficaces de una población de linfocitos T γδ genomodificados para el uso terapéutico pueden variar dependiendo de la gravedad y del curso de la enfermedad o del trastorno, del tratamiento previo, del estado de salud del sujeto, del peso, y/o de la respuesta a los fármacos, y/o del criterio del médico responsable.

[000152] La composición de la presente descripción también puede incluir uno o más adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej. respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T CD8-positivos y linfocitos T cooperadores (TH) contra un antígeno, por lo que podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados figuran, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX®, AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, Imiquimod (ALDARA®), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón α o β o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOM, JuvImmune®, LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel®, micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas pseudovíricas, YF-17D, VEGF trap, R848, β-glucano, Pam3Cys, estimulón QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribí, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p. ej. MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Allison and Krummel, 1995). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se les ha atribuido una influencia directa en

la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej. el TNF-), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (p. ej. GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE.UU. N.º 5.849.589, incorporada íntegramente en la presente memoria como referencia) y en el que actúan como inmunoadyuvantes (p. ej. IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN- α , IFN- β) [Gabrilovich 1996].

[000153] También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos TH1 y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta TH1 provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta TH2. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, habiendo obtenido en algunos experimentos respuestas de anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg, 2006). La patente de EE. UU. N.º 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un

componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

[000154] Otros ejemplos de adyuvantes útiles también incluyen, entre otros, CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y derivados de los mismos (p. ej., AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab®, Celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafil, vardenafil, sorafenib, temozolomida, temsirolimús, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos que reconocen estructuras clave del sistema inmunitario (p. ej., anti-CD40, anti-TGF- β , anti-receptor TNF- α) y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

[000155] Los adyuvantes preferidos son anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, atezolizumab, interferón- α , interferón β , oligonucleótidos CpG y derivados, poli(I:C) y derivados, ARN, sildenafil, formulaciones de partículas con poli(láctido co-glicólido) (PLG), virosomas y/o interleucinas (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21 e IL-23.

[000156] En una forma de realización preferida la composición farmacéutica conforme a la invención, el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod, resiquimod e interferón- α .

[000157] En una forma de realización preferida la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod y resiquimod. En otra forma de realización

preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención, el adyuvante es ciclofosfamida, imiquimod o resiquimod. Los adyuvantes más preferidos son: Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poli-ICLC (Hiltonol®) y AcM anti-CD40 o combinaciones de los anteriores.

[000158] Los linfocitos T γδ genomodificados de la presente descripción se pueden usar para tratar un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad, por ejemplo, un cáncer descrito en la presente memoria.

[000159] Un método para tratar una enfermedad (es decir, una dolencia) en un sujeto con linfocitos T γδ puede incluir la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos T γδ genomodificados. Los linfocitos T γδ de la presente descripción se pueden administrar con distintas pautas (es decir, con diferente cronología, concentración, dosificación, intervalo entre tratamientos y/o formulación). Un sujeto también puede ser preacondicionado con, por ejemplo, quimioterapia, radiación o una combinación de ambas, antes de recibir los linfocitos T γδ genomodificados de la presente descripción. La población de linfocitos T γδ genomodificados también se puede congelar o criogenizar antes de ser administrada a un sujeto. La población de linfocitos T γδ genomodificados puede incluir dos o más células que expresen porciones de reconocimiento tumoral idénticas, diferentes o una combinación de idénticas o diferentes. Por ejemplo, la población de linfocitos T γδ genomodificados puede incluir varios linfocitos T γδ genomodificados distintos que estén diseñados para reconocer antígenos diferentes, o epítomos diferentes del mismo antígeno.

[000160] Los linfocitos T γδ de la presente descripción se pueden usar para tratar diversas enfermedades. En un aspecto, los linfocitos T γδ genomodificados de la presente descripción se pueden destinar al tratamiento del cáncer, como tumores sólidos o neoplasias malignas hematológicas. Ejemplos no limitantes de tipos de cáncer son: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma corticosuprarrenal, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer del apéndice, astrocitomas, neuroblastoma, basalioma, colangiocarcinoma, cáncer vesical, cáncer óseo, tumores cerebrales, como astrocitoma cerebelar, astrocitoma cerebral/glioma

maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma hipotalámico y de las vías visuales, cáncer de mama, adenomas bronquiales, linfoma de Burkitt, carcinoma de origen primario desconocido, linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebelar, cáncer de cuello uterino, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de linfocitos T, tumor de células redondas pequeñas desmoplásico, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, tumores germinales, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal, gliomas, leucemia de células pilosas (tricoleucemia), cáncer de cabeza y cuello, cáncer cardíaco, cáncer hepatocelular (hepático), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer renal, cáncer laríngeo, cáncer labial y de la cavidad bucal, liposarcoma, cáncer hepático, cánceres de pulmón, como el cáncer de pulmón amicrocítico y el cáncer de pulmón microcítico, linfomas, leucemias, macroglobulinemia, histiocitoma fibroso maligno de hueso/osteosarcoma, meduloblastoma, melanomas, mesotelioma, cáncer epidermoide de cuello metastásico con foco primario oculto, cáncer bucal, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, síndromes mielodisplásicos, leucemia mieloide, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, carcinoma rinofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer bucal, cáncer bucofaríngeo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer de ovario, epiteloma ovárico, tumor germinal ovárico, cáncer de páncreas, cáncer de las células de los islotes pancreáticos, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer paratiroideo, cáncer del pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, astrocitoma pineal, germinoma pineal, adenoma hipofisario, blastoma pleuropulmonar, neoplasia plasmocítica, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de células transicionales del uréter y de la pelvis renal, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcomas, cánceres cutáneos, carcinoma cutáneo de células de Merkel, cáncer del intestino delgado, sarcoma de partes blandas, carcinoma epidermoide, cáncer de estómago, linfoma de linfocitos T, cáncer de

garganta, timoma, carcinoma tímico, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico (gestacional), cánceres de foco primario desconocido, cáncer uretral, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar, macroglobulinemia de Waldenstrom y tumor de Wilms.

[000161] En un aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la presente descripción se pueden usar para tratar una enfermedad infecciosa. En otro aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la presente descripción se pueden usar para tratar una enfermedad infecciosa, una enfermedad infecciosa que puede estar causada por un virus. En otro aspecto más, los linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la presente descripción se pueden usar para tratar una enfermedad inmunitaria, como una enfermedad autoinmunitaria.

[000162] El tratamiento con los linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la presente descripción se puede proporcionar al sujeto antes, durante o después del inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento se puede proporcionar al sujeto al cabo de 1 día, 1 semana, 6 meses, 12 meses o 2 años después del inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento se puede proporcionar al sujeto durante más de 1 día, 1 semana, 1 mes, 6 meses, 12 meses, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años o más después del inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento se puede proporcionar al sujeto durante menos de 1 día, 1 semana, 1 mes, 6 meses, 12 meses o 2 años tras el inicio clínico de la enfermedad. El tratamiento también puede incluir el tratar a un ser humano en un ensayo clínico. El tratamiento puede incluir la administración a un sujeto de una composición farmacéutica que comprenda linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la presente descripción.

[000163] En otro aspecto, la administración de linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la presente descripción a un sujeto puede modular la actividad de linfocitos endógenos en el cuerpo del sujeto. En otro aspecto, la administración de linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados a un sujeto puede proporcionar un antígeno a un linfocito T endógeno y puede reforzar una respuesta inmunitaria. En otro aspecto, el linfocito T de memoria puede ser un linfocito T CD4+. En otro aspecto, el linfocito T de memoria puede ser un linfocito T CD8+. En otro aspecto, la administración de linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la presente descripción a un sujeto puede activar la citotoxicidad de otra célula inmunitaria. En otro aspecto, la otra célula inmunitaria puede ser un linfocito T CD8+. En otro aspecto, la otra célula inmunitaria

puede ser un linfocito T citolítico natural (NK). En otro aspecto, la administración de linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la presente descripción a un sujeto puede suprimir un linfocito T regulador. En otro aspecto, el linfocito T regulador puede ser un linfocito Treg FOX3+. En otro aspecto, el linfocito T regulador puede ser un linfocito Treg FOX3-. Ejemplos no limitantes de células cuya actividad puede ser modulada por linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados de la descripción son: células madre hematopoyéticas, linfocitos B, CD4, CD8, glóbulos rojos, glóbulos blancos, células dendríticas, incluidas células dendríticas presentadoras de antígeno, leucocitos, macrófagos, linfocitos B de memoria, linfocitos T de memoria, monocitos, linfocitos citolíticos naturales (NK), granulocitos neutrófilos, linfocitos T cooperadores y linfocitos T citolíticos.

[000164] Durante la mayoría de los trasplantes de médula ósea se suele emplear habitualmente una combinación de ciclofosfamida e irradiación corporal total para impedir el rechazo de las células madre hematopoyéticas (HSC) trasplantadas por parte del sistema inmunitario del sujeto. En un aspecto, se puede efectuar la incubación de la médula ósea del donante con interleucina-2 (IL-2) *ex vivo* para potenciar la generación de linfocitos citolíticos en la médula del donante. La interleucina-2 (IL-2) es una citocina que puede ser necesaria para el crecimiento, la proliferación y la diferenciación de los linfocitos naturales. Los estudios actuales sobre la transferencia adoptiva de linfocitos T $\gamma\delta$ en seres humanos pueden requerir la administración conjunta de los linfocitos T $\gamma\delta$ y de interleucina-2. No obstante, tanto las dosis altas como las dosis bajas de IL-2 pueden causar efectos secundarios altamente tóxicos. La toxicidad de la IL-2 puede afectar a varios órganos o aparatos, sobre todo al corazón, los pulmones, los riñones y el sistema nervioso central. En otro aspecto, la descripción proporciona un método para administrar linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados a un sujeto sin la administración conjunta de una citocina natural o de versiones modificadas de la misma, como IL-2, IL-15, IL-12 e IL-21. En otro aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados se pueden administrar a un sujeto sin administrar simultáneamente la IL-2. En otro aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados se pueden administrar a un sujeto durante un procedimiento, como un trasplante de médula ósea sin la administración conjunta de IL-2.

[000165] Métodos de administración

[000166] A un sujeto se le pueden administrar una o varias poblaciones de linfocitos T γδ genomodificados, en cualquier orden o simultáneamente. Si se hace simultáneamente, los diversos linfocitos T γδ genomodificados se pueden administrar de una sola forma unificada, como una inyección intravenosa, o en múltiples formas como, por ejemplo, varias infusiones intravenosas, s.c., inyecciones o comprimidos orales. Los linfocitos T γδ genomodificados se pueden acondicionar juntos o por separado, en un solo recipiente o en varios recipientes. Uno o todos los linfocitos T γδ genomodificados se pueden administrar en varias dosis. Si no se hace simultáneamente, el intervalo entre las diversas dosis puede variar ampliamente, hasta en alrededor de una semana, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, o alrededor de un año. En otro aspecto, los linfocitos T γδ genomodificados se expanden dentro del cuerpo del sujeto, *in vivo*, tras su administración al sujeto. Los linfocitos T γδ se pueden congelar para disponer de linfocitos para varios tratamientos con la misma preparación de células. Los linfocitos T γδ genomodificados de la presente descripción, y las composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, se pueden acondicionar juntos en un kit. El kit puede incluir instrucciones (p. ej. instrucciones escritas) sobre el uso de los linfocitos T γδ genomodificados y las composiciones que comprenden los mismos.

[000167] En otro aspecto, un método para tratar un cáncer comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos T γδ genomodificados, en el que la administración trata el cáncer. En otras formas de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos T γδ genomodificados se puede administrar como mínimo durante aproximadamente 10 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o 1 año. En otro aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz de los linfocitos T γδ genomodificados se puede administrar como mínimo durante una semana. En otro aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz de linfocitos T γδ genomodificados se puede administrar como mínimo durante dos semanas.

[000168] Los linfocitos T γδ genomodificados descritos en la presente memoria se pueden administrar antes, durante o después de la aparición de una enfermedad o un trastorno, y

el calendario de administración de la composición farmacéutica que contenga los linfocitos T genomodificados puede variar. Por ejemplo, los linfocitos T γδ genomodificados se pueden usar con fines preventivos y se pueden administrar continuamente a sujetos que sean propensos a sufrir enfermedades o trastornos con el fin de reducir las posibilidades de aparición de la enfermedad o del trastorno. Los linfocitos T γδ genomodificados se pueden administrar a un sujeto durante o tan pronto como sea posible tras la aparición de los síntomas. La administración de linfocitos T γδ genomodificados se puede iniciar inmediatamente tras la aparición de los síntomas, en las 3 horas siguientes a la aparición de los síntomas, en las 6 horas siguientes a la aparición de los síntomas, en las 24 horas siguientes a la aparición de los síntomas, en las 48 horas siguientes a la aparición de los síntomas, o en cualquier otro período de tiempo desde la aparición de los síntomas. La administración inicial puede ser a través de cualquier vía práctica, como cualquiera de las vías descritas en la presente memoria con cualquiera de las formulaciones descritas en la presente memoria. En otro aspecto, la administración de linfocitos T γδ genomodificados de la presente descripción puede ser con una administración intravenosa. Se pueden administrar una o varias dosis de linfocitos T γδ genomodificados tan pronto como sea factible después de la aparición de un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inmunitaria, septicemia, o un trasplante de médula ósea, y durante el tiempo que sea necesario para el tratamiento de la enfermedad inmunitaria, como, por ejemplo, de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas, de aproximadamente 48 horas a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 1 mes, de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 3 meses. Para el tratamiento del cáncer, se pueden administrar una o varias dosis de linfocitos T γδ genomodificados años después del inicio del cáncer y antes o después de otros tratamientos. En otro aspecto, los linfocitos T γδ genomodificados se pueden administrar durante al menos aproximadamente 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 96 horas, al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al

menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años o al menos 5 años. La duración del tratamiento puede variar en cada sujeto.

[000169] Conservación

[000170] En un aspecto, los linfocitos T $\gamma\delta$ se pueden formular en medios de congelación y depositarse en unidades criogénicas como congeladores de nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) o ultracongeladores ($-65\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$) para la conservación a largo plazo durante al menos aproximadamente 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, o al menos 5 años. Los medios de congelación pueden contener sulfóxido de dimetilo (DMSO), y/o cloruro sódico (NaCl), y/o dextrosa, y/o sulfato de dextrano y/o almidón hidroxietilo (HES) junto con amortiguadores del pH fisiológicos para mantener el pH entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,0 o aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. Los linfocitos T $\gamma\delta$ criogenizados se pueden descongelar y procesar adicionalmente mediante su estimulación con anticuerpos, proteínas, péptidos y/o citocinas como se describe en la presente memoria. Los linfocitos T $\gamma\delta$ criogenizados se pueden descongelar y modificar genéticamente con vectores víricos (como vectores retrovíricos, lentivíricos o de virus adenoasociados [AAV]) o medios no víricos (como ARN, ADN, p. ej. transposones, y proteínas) tal y como se describen en la presente memoria. Además, los linfocitos T $\gamma\delta$ modificados se pueden criogenizar para generar bancos celulares en cantidades aproximadas de como mínimo 1, 5, 10, 100, 150, 200 o 500 viales, a razón de como mínimo unas 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o unas 10^{10} células por ml en medios de congelación. Los bancos de células criogenizadas pueden mantener su funcionalidad y se pueden descongelar y ser sometidos a estimulación y expansión. En otro aspecto, las células descongeladas se pueden estimular y expandir en recipientes cerrados adecuados, como bolsas de cultivo celular y/o biorreactores, para generar cantidades de células como producto celular alogénico. Los linfocitos T $\gamma\delta$ criogenizados pueden mantener sus funciones biológicas durante al menos aproximadamente 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 13 meses, 15 meses, 18

meses, 20 meses, 24 meses, 30 meses, 36 meses, 40 meses, 50 meses, o al menos aproximadamente 60 meses en condiciones de conservación criogénicas. En otro aspecto, pueden no usarse conservantes en la formulación. Los linfocitos T $\gamma\delta$ criogenizados se pueden descongelar e infundir a varios pacientes como un producto alogénico listo para usar.

[000171] En un aspecto, el linfocito T $\gamma\delta$ genomodificado descrito en la presente memoria puede estar presente en una composición en una cantidad aproximada de al menos 1×10^3 células/ml, al menos 2×10^3 células/ml, al menos 3×10^3 células/ml, al menos 4×10^3 células/ml, al menos 5×10^3 células/ml, al menos 6×10^3 células/ml, al menos 7×10^3 células/ml, al menos 8×10^3 células/ml, al menos 9×10^3 células/ml, al menos 1×10^4 células/ml, al menos 2×10^4 células/ml, al menos 3×10^4 células/ml, al menos 4×10^4 células/ml, al menos 5×10^4 células/ml, al menos 6×10^4 células/ml, al menos 7×10^4 células/ml, al menos 8×10^4 células/ml, al menos 9×10^4 células/ml, al menos 1×10^5 células/ml, al menos 2×10^5 células/ml, al menos 3×10^5 células/ml, al menos 4×10^5 células/ml, al menos 5×10^5 células/ml, al menos 6×10^5 células/ml, al menos 7×10^5 células/ml, al menos 8×10^5 células/ml, al menos 9×10^5 células/ml, al menos 1×10^6 células/ml, al menos 2×10^6 células/ml, al menos 3×10^6 células/ml, al menos 4×10^6 células/ml, al menos 5×10^6 células/ml, al menos 6×10^6 células/ml, al menos 7×10^6 células/ml, al menos 8×10^6 células/ml, al menos 9×10^6 células/ml, al menos 1×10^7 células/ml, al menos 2×10^7 células/ml, al menos 3×10^7 células/ml, al menos 4×10^7 células/ml, al menos 5×10^7 células/ml, al menos 6×10^7 células/ml, al menos 7×10^7 células/ml, al menos 8×10^7 células/ml, al menos 9×10^7 células/ml, al menos 1×10^8 células/ml, al menos 2×10^8 células/ml, al menos 3×10^8 células/ml, al menos 4×10^8 células/ml, al menos 5×10^8 células/ml, al menos 6×10^8 células/ml, al menos 7×10^8 células/ml, al menos 8×10^8 células/ml, al menos 9×10^8 células/ml, al menos 1×10^9 células/ml, o más, de aproximadamente 1×10^3 células/ml a aproximadamente al menos 1×10^8 células/ml, de aproximadamente 1×10^5 células/ml a aproximadamente al menos 1×10^8 células/ml, o de aproximadamente 1×10^6 células/ml a aproximadamente al menos 1×10^8 células/ml.

[000172] En un aspecto, los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para producir productos autólogos o alogénicos conforme a un aspecto de la descripción.

[000173] En un aspecto, los vectores, los constructos o las secuencias descritos en la presente memoria pueden comprender aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 99 % de cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a 97 y 265 a 266. Una secuencia “idéntica al menos en un 85 % a una secuencia de referencia” es una secuencia provista, en toda su longitud, de una identidad de secuencia del 85 %, o más, en particular del 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % con la longitud íntegra de la secuencia de referencia.

[000174] En el contexto de la presente solicitud, el “porcentaje de identidad” se calcula usando un alineamiento emparejado global (es decir, se comparan las dos secuencias en toda su longitud). Los métodos para comparar la identidad de dos o más secuencias son bien conocidos en la disciplina. Por ejemplo, se puede usar el programa «needle» (aguja), que usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) para hallar el alineamiento óptimo (incluidos huecos) de dos secuencias cuando se considera su longitud entera. El programa *needle* está disponible, por ejemplo, en la página web ebi.ac.uk y se describe más extensamente en la publicación siguiente: *EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite* (2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) págs. 276—277. El porcentaje de identidad entre dos polipéptidos, de acuerdo con la invención, se calcula usando el programa de alineamiento global EMBOSS: needle con un parámetro de “*gap open*” (hueco abierto) igual a 10,0, un parámetro “*gap extend*” (extensión del hueco) igual a 0,5, y una matriz Blosum62.

[000175] Las proteínas consistentes en una secuencia de aminoácidos idéntica “al menos en un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %” a una secuencia de referencia puede comprender mutaciones tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. En el caso de las sustituciones, la proteína consistente en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos

en un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a una secuencia de referencia puede corresponder a una secuencia homóloga derivada de otra especie distinta a la de la secuencia de referencia.

[000176] Las “sustituciones de aminoácido” pueden ser conservadoras o no conservadoras. Preferentemente, las sustituciones son sustituciones conservadoras, en las que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido con propiedades químicas y/o estructurales similares.

[000177] En una forma de realización, las sustituciones conservadoras pueden incluir aquellas que son descritas por Dayhoff en “The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5”, Natl. Biomedical Research, el contenido del cual se incorpora íntegramente como referencia. Por ejemplo, en un aspecto, los aminoácidos, que pertenecen a uno de los grupos siguientes, pueden cambiarse entre sí, lo cual constituye un intercambio conservador: Grupo 1: alanina (A), prolina (P), glicina (G), asparragina (N), serina (S), treonina (T); Grupo 2: cisteína (C), serina (S), tirosina (Y) y treonina (T); Grupo 3: valina (V), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), alanina (A) y fenilalanina (F); Grupo 4: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); Grupo 5: fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W) e histidina (H); y Grupo 6: ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E). En un aspecto, se puede seleccionar una sustitución conservadora de un aminoácido entre las siguientes: T→A, G→A, A→I, T→V, A→M, T→I, A→V, T→G y/o T→S.

[000178] En otra forma de realización, una sustitución conservadora de aminoácidos puede incluir la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido de la misma clase, por ejemplo: (1) no polar: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) polares sin carga: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; y (4) básicos: Lys, Arg, His. Otras sustituciones conservadoras de aminoácidos también se pueden hacer del modo siguiente: (1) aromáticos: Phe, Tyr, His; (2) donantes de protones: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; y (3) aceptores de protones: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 10.106.805, cuyo contenido se incorpora íntegramente a modo de referencia).

[000179] En otra forma de realización, las sustituciones conservadoras se pueden hacer de acuerdo con la Tabla 1. Y se pueden hallar métodos para predecir la tolerancia a la modificación de proteínas en, por ejemplo, Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA,

101(25):9205-9210 (2004), cuyo contenido se incorpora íntegramente a modo de referencia.

[000180] Tabla A: Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Sustituciones conservadoras de aminoácidos	
Aminoácido	Sustituciones (otras son conocidas en la técnica)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

[000181] En un aspecto, las secuencias descritas en la presente memoria pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 mutaciones, sustituciones o deleciones de nucleótidos o aminoácidos. En un aspecto, cualquiera de las SEQ ID N.º 1 a 97 y 265-266 pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 mutaciones, sustituciones o deleciones. En otro aspecto más, las mutaciones o sustituciones son sustituciones conservadoras de aminoácidos.

[000182] En otra forma de realización, las sustituciones conservadoras pueden ser aquellas mostradas en la Tabla B con el encabezado de “sustituciones conservadoras”. Si tales sustituciones derivan en un cambio de la actividad biológica, entonces, si es

necesario, se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados en la Tabla B “sustituciones de ejemplo”, y los productos se pueden cribar en busca de los deseados.

[000183] Tabla B: Sustitución de aminoácido

Sustitución de aminoácido		
Residuo original (aminoácido presente de forma natural)	Sustituciones conservadoras	Sustituciones de ejemplo
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Ile	Norleucina ; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

[000184] EJEMPLO 1

[000185] Tabla 2. Secuencias de ADN y proteínicas

SEQ ID N.º	Descripción	Secuencia
1	Promotor del MSCV	Tgaaagacccccacctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggc atggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggtaggaacagaga gacagcagaatatgggccaacaggatatctgtggaagcagttcctgccccggctc agggccaagaacagatggtccccagatgcggtcccgccctcagcagtttctagaga accatcagatgtttccaggggtccccaaggacctgaaaatgacctgtgccttattga actaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataa aagagcccacaacccctcact
2	Furina	RAKR
3	P2A	ATNFSLLKQAGDVEENPGP
4	T2A	EGRGSLLTCGDVEENPGP
5	E2A	QCTNYALLKLAGDVESNPGP
6	F2A	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP
7	Furina consenso	RXXR
8	Conector	SGSG

9	WPRE	cagtctgacgtacgcgtaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggt attcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctgcttaatgcctttgatcatgct attgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgataaatcctgggtgctgtctctttatgag gagttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgttgctgacgcaac ccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccc ctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgtgctggacagggg ctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccat ggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttc ggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttc cgctcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcc
10	Promotor de proteína X	Ggggaagctgacgtcctttcc
11	CD8 cadena α	MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELK CQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEG LDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFFCSALSNSIMYF SHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNR RRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV
12	CD8 cadena β	MRPRLWLLLAQTLVHGNVSLQQTPAYIKVQTNKMVMLSC EAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGE EVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTF GKGTQLSVVDLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLRPETQKGPL CSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRERRARLRFMKQPQ GEGISGTFVPQCLHGYYSNTTTSQKLLNPWILKT

13	R11KEA cadena α	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTN FTCSFPSSNFYALHWYRKETAKSPEALFVMTLNGDEKKKGRI SATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCALYNNNDMRFGAG TRLTVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIG FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
14	R11KE cadena β	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPISGHNSLFWYRETMMRGLELLIYFNNNPIDDSGMPEDR FSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSPGSTDTQYFGP GTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSALVLMAMVKRKDSRG
15	R20P1H7 cadena α	MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESSS LNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKEKER LKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCVQGENSGYSTLTFGK GTMLLVSPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSV IGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

16	R20P1H7 cadena β	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPE GYKVSrKEKRNfPLILESPSPNQTSlyFCASSLGPGLAAYNE QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVsATFWQNPRNHfRCQVQFYGLSENDEWT QDRAKpVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEIL LGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
17	R7P1D5 cadena α	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVI NCTYTDSSSTYLWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRL TVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEYSSASKIIFGSGTR LSIRPNIQNPDPaVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KDSdVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAvaWSNKSDfACANAFN NSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLsvIGFRI LLLKVAGFNLLMTLRLWSS
18	R7P1D5 cadena β	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPISGHdYLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPED RfSAKMPNASfSTLKIQPSEPRDSaVYFCASRANTGELFFGE GSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVsATFWQNPRNHfRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKp VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSALVLMAMVKRKDSRG

19	R10P2G12 cadena α	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDC VYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNSFDEQNEISGRYS WNFQKSTSSFNFTITASQVVD SAVYFCALSEGNSGNTPLVF GKGTRLSVIANIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLS VIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
20	R10P2G12 cadena β	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLEC VQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIP EG YSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSLSSGSHQETQY FGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGK ATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
21	R10P1A7 cadena α	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVI NCTYTDSSSTYLWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRL TVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAESKETRLMFGDGT QLVVKPNIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIG FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

22	R10P1A7 cadena β	MLLLLLLLGPGISLLLPGLAGSGLGAWSQHPSVWICKSGTS VKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYE QGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARAGGHE QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYDPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWT QDRAKPVVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEIL LGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
23	R4P1D10 cadena α	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLIRDSQPSSATYLCVNFHDKIIFGKGTR LHILPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNNSAVAWSNKSDFACANAFN NSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRI LLLKVAGFNLLMTLRLWSS
24	R4P1D10 cadena β	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERAKGNILERF SAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVASAYGYTFGS GTRLTVVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSALVLMAMVKRKDF

25	R4P3F9 cadena α	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFG KGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSV IGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
26	R4P3F9 cadena β	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERF SAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSVESSYGYTFGS GTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF FPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSALVLMAMVKRKDF
27	R4P3H3 cadena α	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVKAGNQFYFGTGT SLTVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAF NNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGF RILLKVAGFNLLMTLRLWSS

28	R4P3H3 cadena β	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVSQSPRYKVAKRGGQDVAL RCDPISGHVSLFWYQQALGQGPEFLTYFQNEAQLDKSGLPS DRFFAERPEGSVSTLKIQRRTQQEDSAVYLCASSLLTSGGDNE QFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWT QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEIL LGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
29	R36P3F9 cadena α	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENATM NCSYKTSINNQLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSRRLRV TLDTSKKSSSLLITASRAADTASYFCATVSNYQLIWGAGTKLII KPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNS IIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS
30	R36P3F9 cadena β	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPE GYKVSrKEKRNFPLILESPSPNQTSLYFCASSSTSGGLSGET QYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWT QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEIL LGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

31	R52P2G11 cadena α	MKKHLTTFLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQ CNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRYT ATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSAYGKLQFGAGTQ VVVTPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAF NNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGF RILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
32	R52P2G11 cadena β	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPISGHNSLFWYRQTM MRGLELLIYFN NNVPIDDSGMPED RFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSLGSPDGNQP QHFGDGTRLSILEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALND SRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQ DRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILL GKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDF
33	R53P2A9 cadena α	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTL SCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATEN RFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAYNSYAGGTSY GKLTFGQGTILTVHPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLN FQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

34	R53P2A9 cadena β	MGPGLLCWVLLCLLGAGPVDAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLR CSPISGHKSVSWYQQVLGQGPQFIFQYYEKEERGRGNFPD RFSARQFPNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSLDGTSEQYFG PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG FYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
35	R26P1A9 cadena α	METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENATM NCSYKTSINNLLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRV TLDTSKKSSSLITASRAADTASYFCLIGASGSRLTFGEGTQL TVNPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFN NSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRI LLLKVAGFNLLMTLRLWSS
36	R26P1A9 cadena β	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPISGHDYLFWYRQTM MRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPED RFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSYFGWNEKLFF GSGTQLSVLEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGK ATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

37	R26P2A6 cadena α	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGAIV SLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDG RFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAMSDVSGGYNKLI FGAGTRLAVHPYIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA ACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL LSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
38	R26P2A6 cadena β	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPE GYKVSKEKRNFPILILESPSPNQTSLYFCASTTPDGTDEQFF GPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTVIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSAVLMLMAMVKRKDSRG
39	R26P3H1 cadena α	MASAPISMLAMLFTLSGLRAQSVAQPEDQVNVAEGNPLTVK CTYSVSGNPYLFWYVQYPNRGLQFLLKYITGDNLVKGSYGF EAEFNKSQTSFHLKKPSALVSDSALYFCAVRDMNRDDKIIFG KGTRLHILPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

40	R26P3H1 cadena β	MSNQVLCCVVL CFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNV TLS CEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQIVNDFQKGDIAEG YSVSREKKESFPLTV TSAQKNPTAFYLCASSRAEGGEQYFG PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG FYDPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
41	R35P3A4 cadena α	MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKC TYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDIRSNVGEKKDQRIAVTL NKTAKHFS LHITETQPEDSAVYFCAASPTGGYNKLIFGAGTR LAVHPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAF NNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGF RILLK VAGFNLLMTLRLWSS
42	R35P3A4 cadena β	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQ CAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEV PN GYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSLGGASQE QY FGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFYDPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEWTQDR AKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGK ATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

43	R37P1C9 cadena α	MKLVTSITVLLSLGIMGDAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCNHS TISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNNRMASLAIED RKSSTLILHRATLRDAAVYYCILFNFNKFYFGSGTKLNVKPN QNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVY ITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIIPED TFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
44	R37P1C9 cadena β	MGPGLLHWMALC LLGTGHGDAMVIQNPRYQVTQFGKPVTL SCSQTLNHNVMYWYQQKSSQAPKLLFHYYDKDFNNEADTP DNFQSRRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYL CATSSGETNEKLF FGSGTQLSVLEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFFPDHVELS WWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDS RYCLSSRLRV SATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
45	R37P1H1 cadena α	MTRVSLLWAVVSTCLES GMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTL SCTYDTSES NYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATEN RFSVNFQKA AKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFGYSGGGADG LTFGKGTHLIIQPYIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS

46	R37P1H1 cadena β	MGPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLR CSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQRGNFPD RFSGHQFPNYSSELNVNALLLGDSALYLCASSNEGQQWEAE AFFGQGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWT QDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEIL LGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF
47	R42P3A9 cadena α	MKRILGALLGLLSAQVCCVRGIQVEQSPDLILQEGANSTLR CNFSDSVNNLQWFHQNPWGQLINLFYIPSGTKQNGRLSATT VATERYSLLYISSSQTTDSGVYFCAVHNFNKFYFGSGTKLNV KPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKD SDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNS IIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS
48	R42P3A9 cadena β	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRH LIK EKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEQMQ SDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSLL GQGYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

49	R43P3F2 cadena α	MLTASLLRAVIASICVVSSMAQKVTQAQTEISVVEKEDVTLDC VYETRDTTYLFWYKQPPSGELVFLIRRNSFDEQNEISGRYS WNFQKSTSSFNFTITASQVVD SAVYFCALSNNNAGNMLTFG GGTRL MVKPHIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLS VIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
50	R43P3F2 cadena β	MLSPDLPD SAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRH LIK EKRETATLKCYP IPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQ SDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSPT GTSGYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISH TQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNP RNHFRCQVQFYGL SENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVL SATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
51	R43P3G5 cadena α	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTN FTCSFPSSNFYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGDEKKKGR ISATLNTKEGY SYLYIKGSQPEDSATYLCALNRDDKIIFGKGT RLHILPNIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANAF NNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGF RILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

52	R43P3G5 cadena β	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLEC VQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIEG YSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASRLPSRTYEQYFG PGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG FYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATL YAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
53	R59P2E7 cadena α	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTPQIPAALSVPEGENLVLNC SFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNAS LDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCVNNDYKLSFGAGTTVT VRANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSK DSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNN SIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRIL LLKVAGFNLLMTLRLWSS
54	R59P2E7 cadena β	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRHLLIK EKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEQMQ SDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSL GLGTGDYGYTFGSGTRLTVVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQP LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYG LSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGV LSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

55	R11P3D3 cadena α	MEKNPLAAPLLILWFHLDVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTN FTCSFPSSNFYALHWYRWETAKSPEALFVMTLNGDEKKKGR ISATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCALYNNNDMRFGAG TRLTVKPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIG FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
56	R11P3D3 cadena β	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLR CKPISGHNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPED RFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSPGSTDTQYF GPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSAVLMLAMVVKRKDSRG
57	R16P1C10 cadena α	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSSQFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAAVISNFGNEKLTFG TGTRLTIIPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV SQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVI GFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

58	R16P1C10 cadena β	MGSRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRSVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKGNFPGRFSGRQFSNSRSEMNVSTLELGDSALYLCASSPWDSPNEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG
59	R16P1E8 cadena α	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGAIVSLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDGRFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAMSEAAGNKLTFGGGTRVLVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
60	R16P1E8 cadena β	MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSYTQGEAFFGQGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA VLVLSALVLMAMVKRKDF
61	R17P1A9 cadena α	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCVNLNQAQTALIFGKGTTLSVSSNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV SQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL SVI

		GFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
62	R17P1A9 cadena β	MGFRLLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITATGQRVTLRC SPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERAKGNILERF SAQQFPDLHSELNLSSLELGDSALYFCASSAETGPWLGNEQ FFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDS RYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
63	R17P1D7 cadena α	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTL SCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATEN RFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAYRWAQGGSEK LVFGKGTKLTVNPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD SQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAFAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQ NLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
64	R17P1D7 cadena β	MTIRLLCYMGFYFLGAGLMEADYQTPRYLVIGTGKKITLECS QTMGHDKMYWYQQDPGMELHLIHYSYGVNSTEKGDLSSSES TVSRIRTEHFPLTLESARPSHTSQYLCATELWSSGGTGELFF GEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
65	R17P1G3 cadena α	IMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYL CAVGPSGTYKYIFGTGTRLKVLANIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSN SAFAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK

		SFETDTNLFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
66	R17P1G3 cadena β	MGPQLLGYVVLCLLGAGPLEAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTC SQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPE GYKVS RKEKRNFP LILESPSPNQTSLYFCASSPGGSGNEQFF GPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPV TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
67	R17P2B6 cadena α	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYS DRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCVVSGGGADGLTF GKGTHLIQPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLS VIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
68	R17P2B6 cadena β	MLSPDLPDSAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRH LIK EKRETATLKCYP IPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFY EKM QSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSL GRGGQPQHFGDGTRL SILEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHT QKATLVCLATGFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDF
69	R11P3D3KE cadena α	MEKNPLAAPLLILWFHLD CVSSILNVEQSPQSLHVQEGDSTN FTCSFPSSNFYALHWYRKETAKSPEALFVMTLNGDEK KKGRI SATLNTKEGYSYLYIKGSQPEDSATYLCALYNNNDMRFGAG TRLTVKPNIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANA

		FNNIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIG FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
70	R11P3D3KE cadena β	NNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYF CASSPGSTDTQYFGPGTRTLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAE ISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQ PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVQTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMLMAMVKRKDSRG
71	R39P1C12 cadena α	TYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDK HLSLRIADTQTGDSAIYFCAEIDNQGGKLIFGQGTELSVKPNI QNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVY ITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNIIPED TFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
72	R39P1C12 cadena β	MGPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPTHLIKTRGQQVTLR CSPKSGHDTVSWYQQALGQGPQFIFQYEEEEERQRGNFPD RFSGHQFPNYSSELNVNALLGDSALYLCASSQLNTEAFFG QGTRTLVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFFPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVQTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSAVLMLMAMVKRKDF
73	R39P1F5 cadena α	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNNARLMFGDGT QLVVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA FNNIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIG

		FRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
74	R39P1F5 cadena β	MDTWLVCWAIFSLLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGGQEVILR CVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNNEISEKSEIFDDQF SVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSGQGANEQYFGP GTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSALVLMAMVKRKDSRG
75	R40P1C2 cadena α	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTL SCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATEN RFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAYLNYQLIWGAG TKLIKPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAF NNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGF RILLKVAGFNLLMTLRLWSS
76	R40P1C2 cadena β	MDTWLVCWAIFSLLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGGQEVILR CVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNNEISEKSEIFDDQF SVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSEM TAVGQYFGP GTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSALVLMAMVKRKDSRG
77	R41P3E6 cadena α	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSSQFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRF T AQLNKASQYVSLIIRDSQPSDSATYLCAAFSGYALNFGKGTS LLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS

		KDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFN NSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRI LLLKVAGFNLLMTLRLWSS
78	R41P3E6 cadena β	MDTWLVCWAIFSLLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVLIR CVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNSEISEKSEIFDDQF SVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSQYTGEFFGEGS RLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSS RLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV LVSALVLMAMVKRKDSRG
79	R43P3G4 cadena α	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIAS LNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRF TAQLNKASQYVSLLIRDSQPSSATYLCVAVNGGDMRFGAGT RLTVKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIG FRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
80	R43P3G4 cadena β	MDTWLVCWAIFSLLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVLIR CVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNSEISEKSEIFDDQF SVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASSGQGALEQYFGP GTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSALVLMAMVKRKDSRG
81	R44P3B3 cadena α	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQ EGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNE DGRFTVFLNKSARKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASGLYNQG

		GKLIFGQGTELSVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTD FDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNK SDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLN FQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
82	R44P3B3 cadena β	MGCRLLCCVVFCLLQAGPLDTAVSQTPKYLVTQMGNDSIK CEQNLGHDTMYWYKQDSKKFLKIMFSYNNKELIINETVPNRF SPKSPDKAHLNLHINSLELGDSAVYFCASSLGDRGYEQYFGP GTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSALVLMAMVKRKDSRG
83	R44P3E7 cadena α	MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVI NCTYTDSSSTYLWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRL TVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAEINNARLMFGDGT QLVVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVS QSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSA VAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIG FRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
84	R44P3E7 cadena β	MLSPDLPD SAWNTRLLCHVMLCLLGAVSVAAGVIQSPRH LIK EKRETATLKCYPPIRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEQMQ SDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSP PDQNTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQ KATLVCLATGFYPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKE QPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSA TILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG
85	R49P2B7	MLLLLVPVLEVIFTLGGTRAQSVTQLGSHVSVSEGA LVLLRC NYSSSVPPYLFWYVQYPNQGLQLLLKYTTGATLVKGINGFEA

	cadena α	EFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFC AVRIFGNEKLTFGTGT RLTIIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KSDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFN NSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRI LLLKVAGFNLLMTLRLWSS
86	R49P2B7 cadena β	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLEC VQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDPIEG YSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSLMGELTGELFF GEGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRY CLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTVQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
87	R55P1G7 cadena α	MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQDPGPLSVPEGAIV SLNCTYSNSAFQYFMWYRQYSRKGPPELLMYTYSSGNKEDG RFTAQVDKSSKYISLFIRDSQPSDSATYLCAMMGDTGTASKL TFGTGTRLQVTLDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKSDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDF ACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQN LSVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS
88	R55P1G7 cadena β	MGIRLLCRVAFCLAVGLVDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLEC VQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDPIEG YSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSFGGYEQYFGP GTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGF YPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCL SSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP VTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLV SALVLMAMVKRKDSRG

89	R59P2A7 cadena α	VKPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSK DSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNN SIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRIL LLKVAGFNLLMTLRLWSS
90	R59P2A7 cadena β	MLCSLLALLLGTFFGVRSQTIHQWPATLVQPVGSPLSLECTV EGTSNPPLYWYRQAAGRGLQLLFYSVGIGQISSEVPQNLSA SRPQDRQFILSSKLLLSDSGFYLCAWSGLVAEQFFGPGTRL TVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDH VELSWWWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL RVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQI VSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL VSALVLMAMVKRKDSRG
91	PTE WPRE	tgaaagacccacacgttaggttggaagctagcttaagtaacgccatttgcaaggc atggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggtaggaacagaga gacagcagaatatgggcaaacaggatatctgtggaagcagttcctgccccggctc agggccaagaacagatggtccccagatgcggtcccgccctcagcagtttctagaga accatcagatgttccagggtgccccaggacctgaaaatgaccctgtgccttattga actaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataa aagagcccacaacccctcactcagcggcgcccgggcgacgctaccacatgg actctggaccttctgctgcgtgagcctgtgcatcctggtggccaagcacacagacgc cggcgtagccagtcacctagggcagaggtgaccgagatggggcaggaggtgaca ctgcgctgtaagccaatctctggccacaacagcctgttttggtataggagaccatgat gcgcggcctggagctgctgatctactcaataacaatgtgcccacgacgattccggc atgcctgaggatcggtttctgccaagatgcccaatgccagcttctccacactgaagat ccagcctagcagccaagagactccgccgtgtattttgcgcctctagcccaggcag caccgatacacagtacttcggaccaggaaccaggctgacagtgtggaggacctg aagaacgtgttccccctgaggtggccgtgttgagccctctgaggccgagatcagcc acaccagaaggccaccctggtgtgcctggcaaccggcttctatctgatcacgtgg agctgtcctggtgggtgaacggcaaggaggtgcacagcggcggtgtccacagaccc

		acagcccctgaaggagcagccagccctgaatgatagccggtattgcctgtcctctcg gctgagagtggtccgccaccttttggcagaacccccggaatcacttcagatgtcagggtg cagttttacggcctgtccgagaacgatgagtggaaccaggaccgggccaagcctgt gacacagatcgtgtctgccgaggcatggggaagagcagactgtggcttcacctctga gagctaccagcagggcggtgctgagcgccaccatcctgtatgagatcctgtgggcaa ggccacactgtacgccgtcctggctcgcgtctgggtgctgatggcaatggtaaaaga aaagatagtcggggacgggccaagagatctggcagcggcgccaccaatttcagcc tgctgaaacaggccggcgacgtggaagagaaccctggccccatggagaagaatc ccctggctgccccctgtgatcctgtggtttcacctggactgcgtgtcctctatcctgaat gtggaacagagcccacagagcctgcacgtgcaggagggcgactccaccaacttca catgtctctttcctagctccaacttctacgccctgcactggtacagaaaggagaccgca aagtcaccagaggccctgttcgtgatgacactgaacggcgatgagaagaagaagg gccgcatcagcgccaccctgaatacaaaggagggtactcctatctgtacatcaagg gctcccagcctgaggactctgccacctatctgtgcgccctgtacaacaataacgatat gcggtttggcgccggcaccagactgacagtgaagccaaacatccagaatccagac cccgccgtgtatcagctgcgggacagcaagtctagcgataagagcgtgtgcctgttc accgactttgattctcagacaaacgtgagccagtccaaggacagcgacgtgtacatc accgacaagacagtgttgatagagaagcatggacttcaagttaacagcgccgt ggcctggtccaataagtctgatttcgcctgcgccaatgcctttaataactccatcatccc cgaggataccttcttctcctccagagtcctctgtgacgtgaagctggaggagaagtct ttcgagaccgatacaaacctgaatttcagaacctgagcgtgatcggttcaggatcct gctgctgaagggtggccggccttaatctgctgatgacctgaggctgtggagctcccg gccaagagatctggcagcggcgagggcagaggcagcctgtgacctgcggcgac gtggaggagaacccccggccccatgcgcccgagactgtggcttctgctcgccgcgca actgactgtcctgcacggaaacagcgtgctgcagcagacaccggcctacatcaaag tgcagaccaacaagatggtcatgtgtcctgcgaggccaagatttcctctccaacat gcggatctattggttgcggcagagacaggcgcttctcggactcccaccatgagttct tgccctgtgggactccgccaagggaaactattcacggcgaagaagtggaacagga gaagatcgccgtgttcgcgatgcctcccgtttatactgaatctgacctccgtgaagcc cgaagatagcgggatctactttgcatgattgtgggtcaccggaactgacctcgga
--	--	--

		agggcactcagctgagcgtggtggacttctccccactaccgccaacccactaaga agtcaaccctgaagaagcgggttgcagactcccacggccggaaacgcagaagg gtccgctgtgtccccgatcacctggggctcctgtggctggagtgctggctctctggt gtcccttggcgtcgccattcacctctgctgccggagaaggagggccagactgaggttc atgaagcagcctcagggagaggggatcagtggcactttcgtgccacaatgcctccat ggctactattccaacaccaccacctcgaaaagctgctgaaccctggatcctgaaa acccgggccaagagatctggcagcggccagtgaccaactacgccctgctgaagc tggccggcgacgtggagagcaaccccgccccatggcgcttcccgtagccgcactc ctgttggcccttgccctgctgttgacgcgcacgaccttccaattccgggtgtccctc tggatcgcacctggaacctcggggaaacgggtggagctcaagtgtcaagtcctcctgt cgaacccgaccagcggatgcagctggctgttccagccgagaggagctgccgcctc accaccttctcctgtacttgagccagaacaagccgaaggccgctgagggctgga caccagcgttctcgggcaaacggctgggagacactttgtgtgactctctccgact tccggcgggagaacgagggtactacttctgctctgcgtctccaattcaatcatgtact tctcacacttctgctgggtgttctgcctgccaagcccaccactactccggcaccag acctccaactcccgctcccaccatcgcgctccaaccccttctgctgcgccctgaagcg tgtcggcctgctgctggaggagccgtgcatacccgcggtctggacttcgctgcgaca tctacatttgggccccttggctggcacctgtggagtgtgctcctgtccctgtgacacc ctgtactgcaaccaccggaataggcggagagtctgcaagtgtccgcgccctgtcgtg aagtcaggagataagccgagcctgtccgcacgctacgtgtgaaccggtccgcagtct gacgtacgcgtaataacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattctta actatgttgctcctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgatcatgtattgctt cccgtatggctttcatttctcctcctgtataaatcctgggtgtgtctctttatgaggagttgt ggcccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttgctgacgcaacccccact ggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggacttctgcttccccctccctat tgccacggcggaactcatcgccgctgccttggccgctgctggacaggggctcggct gttgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgct cgctgtgttgccacctggattctgcgcggaagctccttctgctacgtcccttcggccctc aatccagcgaccttctcccgcgccctgctgccggctctgcggcctctccgcgtctt cgcttgcacctcagacgagtcggatctcccttgggcccgcctccccgcc
--	--	--

92	TPE WPRE	tgaaagacccacctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccatttgcaggc atggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggtaggaacagaga gacagcagaatatgggccaacaggatatctgtggaagcagttcctgccccggctc agggccaagaacagatggtccccagatgcggtcccgccctcagcagtttctagaga accatcagatgtttccagggtgccccaggacctgaaaatgacctgtgccttattga actaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataa aagagcccacaacccctcactcagcggccgccccgggtcgacgctaccacatgg actcttgaccttctgctgctgagcctgtgcatcctggtggccaagcacacagacgc cggcgtgatccagtcacctaggcacgaggtgaccgagatgggcccaggaggtgaca ctgcgctgtaagccaatctctggccacaacagcctgttttggtataggagaccatgat gcgcggcctggagctgctgatctactcaataacaatgtgccatcgacgattccggc atgcctgaggatcggttttctgccaagatgcccaatgccagcttccacactgaagat ccagcctagcgagccaagagactccgccgtgtattttgcgcctctagcccaggcag caccgatacacagtacttcggaccaggaaccaggctgacagtgctggaggacctg aagaacgtgttccccctgaggtggcgtgtttgagccctctgaggccgagatcagcc acaccagaaggccaccctggtgtgcctggcaaccggcttctatcctgatcacgtgg agctgtcctggtgggtgaacggcaaggaggtgcacagcggcgtgtccacagaccc acagcccctgaaggagcagccagccctgaatgatagccggtattgctgtcctctcg gctgagagtgtccgccaccttttggcagaacccccggaatcacttcagatgtcagggtg cagttttacggcctgtccgagaacgatgagtgaccaggaccgggccaagcctgt gacacagatcgtgtctgccgaggcatggggaagagcagactgtggcttcaccttga gagctaccagcagggcgctgctgagcgccaccatcctgtatgagatcctgctgggcaa ggccacactgtacgccgtcctggtctccgctctggtgctgatggcaatggtcaaaaga aaagatagtcggggacgggccaagagatctggcagcggcgagggcagaggcag cctgctgacctgcggcgacgtggaggagaacccccggcccatggagaagaatccc ctggctgccccctgctgatcctgtggtttcacctggactgcgtgtcctctatcctgaatgt ggaacagagcccacagagcctgcacgtgcaggagggcgactccaccaacttcac atgctcttttctagctccaacttctacgccctgcactggtacagaaaggagaccgcaa agtcccagaggccctgttcgtgatgacactgaacggcgatgagaagaagaagg ccgcatcagcgccaccctgaatacaaaggagggtactcctatctgtacatcaagg
----	----------	--

		ctcccagcctgaggactctgccacctatctgtgcccctgtacaacaataacgatatg cggtttggcgccggcaccagactgacagtgaagccaaacatccagaatccagacc ccgccgtgtatcagctgcgggacagcaagtctagcgataagagcgtgtgcctgttca ccgactttgattctcagacaaacgtgagccagtccaaggacagcgacgtgtacatca ccgacaagacagtgtctggatatgagaagcatggacttcaagtctaacagcgccgtg gcctggccaataagtctgatttcgcctgcgccaatgcctttaataactccatcatcccc gaggataccttcttctctccagagtcctctgtgacgtgaagctggtggagaagtcttt cgagaccgatacaaacctgaattttcagaacctgagcgtgatcggcttcaggatcctg ctgctgaaggtggccggctttaatctgctgatgacctgaggctgtggagctccggg ccaagagatctggcagcggcgccaccaatttcagcctgtgaaacaggccggcgga cgtggaagagaacctggcccatgcgcccagactgtggcttctgctcgccgcgc aactgactgtctgcacggaaacagcgtgtgcagcagacaccggcctacatcaaa gtgcagaccaacaagatggtcatgtgtcctgcgaggccaagattccctctccaaca tgcggatctattggttgcggcagagacaggcgcccttctcggactcccacatgagttc ttggccctgtgggactccgccaagggaactattcacggcgaagaagtggaacagga gaagatcgccgtgttctcgcatgcctcccgtttatactgaatctgacctccgtgaagcc cgaagatagcgggatctacttttgcattgtgtgggtcaccggaactgaccttcggga agggcactcagctgagcgtggtggacttctccccactaccgccaaccactaaga agtcaacctgaagaagcgggtttgcagactcccacggccggaaacgcagaagg gtccgtgtgtccccgatcacctggggctccttgtggctggagtgtgtccttctggt gtccttggcgtgccattcacctctgctgcgggagaaggagggccagactgaggttc atgaagcagcctcaggagaggggatcagtggcactttctgtccacaatgcctccat ggctactattccaacaccaccacctcgaaaagctgtgaaccttgatcctgaaa accggggccaagagatctggcagcggccagtgcaccaactacgccctgctgaagc tggccggcgacgtggagagcaacccggcccatggcgcttccgtgaccgcactc ctgttgccccttgccctgctgttgacgcgcacgaccttccaattccgggtgtcccctc tggatgcacctggaacctcggggaaacgggtggagctcaagtgtcaagtctcctgt cgaacctgaccagcggatgcagctggctgttccagccgagaggagctgccgcctc accaccttctcctgtacttgagccagaacaagccgaaggccgctgagggctgga caccagcgcttctcgggcaaacgggtgggagacactttgtgtgactctctccgact
--	--	---

		tccggcgggagaacgagggctactacttctgctctgcgctctccaattcaatcatgtact tctcacacttcgtgccggtgttcctgcctgccaagcccaccactactccggcaccag acctccaactcccgtcccaccatcgcgctccaaccccttctgctgcgacctgaagcg tgtcggcctgctgctggaggagccgtgcatacccgcggtctggacttcgctgcgaca tctacatttgggccccttggctggcacctgtggagtgtgctcctgtcccttgtatcacc ctgtactgaaccaccggaataggcggagagtctgcaagtgtccgcggcctgtcgtg aagtcaggagataagccgagcctgtccgcacgctacgtgtgaaccggtccgcagtct gacgtacgcgtaataacactctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattctta actatgtgtccttttacgctatgtggatacgctgcttaatgcctttgtatcatgctattgctt cccgtatggctttcattttctcctcctgtataaatcctgggtgctgtctcttatgaggagtgt ggcccgtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgactgtgttgcgacgcaacccccact ggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggacttgcgttccccctccctat tgccacggcggaactcatcgccgctgccttgcgcgtgctggacaggggctcggct gttgggactgacaattcgtgggtgtgtcggggaagctgacgtccttccatggctgct cgctgtgttgccacctggattctgcgcggaagctccttctgctacgtcccttcggccctc aatccagcggaccttccctcccgcggcctgtgcccgtctgcggccttcccgctctt cgcttccgcccagacgagtcggatctcccttgggcccgcctccccgcc
93	PTE fn WPRE	tgaagaccccacctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccattttgaaggc atggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaagggttaggaacagaga gacagcagaatatgggccaacaggatatctgtggaagcagttcctgccccggctc agggccaagaacagatggtccccagatgcggtcccgccctcagcagttctagaga accatcagatgtttccagggtgccccaggacctgaaaatgacctgtgccttattga actaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataa aagagcccacaacccctcactcagcggccgccccgggtcgacgtaccaccatgg actcttgaccttctgctgctgagcctgtgcatcctgggtggccaagcacacagacgc cggcgtgatccagtccttaggcacgaggtgaccgagatgggcccaggagggtgaca ctgcgtgtaagccaatcttgccacaacagcctgttttggtataggagaccatgat gcgcggcctggagctgctgatctactcaataacaaatgtgccatcgacgattccggc atgcctgaggatcggtttctgccaagatgccaatgccagcttccacactgaagat ccagcctagcagccaagagactccgcggtgtattttgcgcctctagcccaggcag

		caccgatacacagtacttcggaccaggaaccaggctgacagtgtggaggacctg aagaacgtgttccccctgaggtggcgtgttgagccctctgaggccgagatcagcc acaccagaaggccaccctggtgtgcctggcaaccggcttctatctgatcacgtgg agctgtcctggtgggtgaacggcaaggaggtgcacagcggcgtgtccacagaccc acagcccctgaaggagcagccagccctgaatgatagccggtattgcctgtcctctcg gctgagagtgtccgccaccttttggcagaacccccggaatcacttcagatgtcagggtg cagttttacggcctgtccgagaacgatgagtggaccaggaccggggccaagcctgt gacacagatcgtgtctgccgaggcatggggaagagcagactgtggcttcaccttga gagctaccagcagggcggtgtgagcgccaccatcctgtatgagatcctgtgggcaa ggccacactgtacgccgtcctggtctccgctctggtgtgatggcaatggtcaaaaga aaagatagtcggggatctggcagcggcgccaccaatttcagcctgtgaaacaggc cggcgacgtggaagagaaccctggccccatggagaagaatcccctggctgcccc ctgtgatcctgtggtttcacctggactgcgtgtcctctatcctgaatgtggaacagagcc cacagagcctgcacgtgcaggagggcgactccaccaacttcacatgctctttcctag ctccaacttctacgccctgcactggtacagaaaggagaccgcaaagtcccagagg ccctgttcgtgatgacactgaacggcgatgagaagaagaagggccgcacatcagcgc caccctgaatacaaaggagggctactcctatctgtacatcaagggtcccagcctga ggactctgccacctatctgtgcgccctgtacaacaataacgatatgcggtttggcgccg gcaccagactgacagtgaagccaaacatccagaatccagaccccgccgtgtatca gctgcgggacagcaagtctagcgataagagcgtgtgcctgttcaccgactttgatttc agacaaacgtgagccagtccaaggacagcgacgtgtacatcaccgacaagacag tgctggatatgagaagcatggacttcaagtctaacagcgccgtggcctggtccaataa gtctgatttcgcctgcgccaatgcctttaataactccatcatccccgaggataccttcttc cttctccagagtctctgtgtacgtgaagctggtggagaagtctttcgagaccgataca aacctgaattttcagaacctgagcgtgatcggttcaggatcctgtgtgaaggtggc cggctttaatctgtgatgacctgaggctgtggagctcccgggccaagagaggcag cggcgagggcagaggcagcctgtgacctgcggcgacgtggaggagaacccccg gccccatgcgcccagactgtggcttctgtctcgccgcgcaactgactgtcctgcacgg aaacagcgtgtgcagcagacaccggcctacatcaaagtgacagaccaacaagat ggtcatgtgtcctgcgaggccaagatttcctctccaacatgcggatctattggtgcg
--	--	---

		gcagagacaggcgcttctcggactcccaccatgagttcttggccctgtgggactcc gccaaggggaactattcacggcgaagaagtggaacaggagaagatcgccgtgtttc gcgatgcctcccgtttatactgaatctgacctccgtgaagcccgaagatagcgggat ctacttttgcattgtgtgggtcaccgaactgacctcgggaagggcactcagctga gctgtgtggacttctccccactaccgccaaccactaagaagtcaacctgaaga agcgggtttgcagactcccacggccggaacgcagaagggctcgctgtgttccccg atcacctggtgggtcctgtgtgtgagtgctggtccttctggtgtcccttggcgtcgcca ttcacctctgtgcggagaaggaggccagactgaggtcatgaagcagcctcag ggagaggggatcagtggtcactttcgtgccacaatgcctccatggctactattccaaca ccaccacctcgcaaaagctgtgaaccttgatcctgaaaacccgggccaagag atctggcagcggccagtgcaccaactacgccctgtgaagctggccggcgacgtgg agagcaacccccggccccatggcgcttcccgtagccgactcctgttggcccttgcct gctgttcacgcccgcagaccttcccaattccgggtgtccctctggatcgcacctgga acctcggggaaacggtggagctcaagtgtcaagtctcctgtcgaacctgaccagc ggatgcagctggctgttccagccgagaggagctgccgcctacccaccttctcctgt acttgagccagaacaagccgaaggccgctgagggcttggaacccagcgttctcg ggcaaacggctgggagacacttttgtgtgactctctccgacttccggcgggagaac gagggctactacttctgtctgcgcttccaattcaatcatgtacttctacacttctgtcc ggtgttctgcctgccaagcccaccactactccggcaccagacctccaactcccgct cccaccatcgcttccaaccccttctgctgcgacctgaagcgtgtggcctgtgtgtg gaggagccgtgcatacccggtctggacttgcgtgcgacatctacatttggggccc tttggctggcacctgtggagtgctgtcctgtcccttgtatcacctgtactgcaaccac cggaataggcggagagtctgcaagtgtccgcggcctgtcgtgaagtcaggagataa gccgagcctgtccgcacgctacgtgtgaaccggtccgcagctgtacgtacgcgtaat caacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgcctttt acgctatgttgatacgtgtttaatgccttgtatcatgtattgttcccgatggctttca tttctcctcctgtataaatcctggtgtgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcagg caacgtggcgtggtgtgactgtgttgtgtgacgcaacccccactggttggggcattgc caccacctgtcagctccttccgggacttctgcttccccctccctattgccacggcggaa ctcatcgccgcctgccttggcgctgtggacaggggctcggtgttgggcactgaca
--	--	--

		attccgtggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctgcctgtgttgcac ctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccctcaatccagcggacct tcctcccgcggcctgtgtccggctctgcggccttccgcgtcttcgccttcgccctcag acgagtcggatctcccttgggcccgcctccccgcc
94	PTE CD8 TCR WPRE	tgaaagaccccacctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccattttgaaggc atggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggtaggaacagaga gacagcagaatatgggccaacaggatatctgttggaagcagttcctgccccggctc agggccaagaacagatggtcccagatgcggtcccgccctcagcagtttctagaga accatcagatgttccagggtgccccaggacctgaaaatgacctgtgccttattga actaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgtccccgagctcaataa aagagcccacaacccctcactcagcggccgccccgggtcgacgctaccacatgc gcccgagactgtggcttctgtcgcgcgcaactgactgtcctgcacggaaacagcg tgctgcagcagacaccggcctacatcaaagtgcagaccaacaagatggtcatgctg tcctgcgaggccaagatttcctctccaacatgcggatctattggtgcggcagagaca ggcgcttctcggactcccacatgagttcttgccctgtgggactccgccaagggga actattcacggcgaagaagtggaaacaggagaagatcgccgtgttgcgatgcctcc cgctttatactgaatctgacctccgtgaagcccgaagatagcgggatctactttgcatg attgtgggctcaccggaactgacctcggaagggcactcagctgagcgtggtggac ttctccccactaccgccaaccactaagaagtcaaccctgaagaagcgggttgc agactcccacggccgaaacgcagaagggtcgctgtgttcccgatcacctggg gctccttggtgctggagtgtggtccttctggtgtcccttggcgtcgccattcacctctgt gccggagaaggagggccagactgaggtcatgaagcagcctcagggagagggg atcagtggcactttcgtgccacaatgcctccatggctactattccaacaccaccacctc gaaaagctgctgaaccctggatcctgaaaacccgggccaagagatctggcagc ggcgccaccaatttcagcctgctgaaacaggccggcgacgtggaagagaaccctg gccccatggcgcttcccgtagccgactcctgttggcccttgccctgctgttgacgccc cacgaccttcccaattccgggtgtcccctctggatcgcacctggaacctcggggaaac ggtggagctcaagtgtcaagtctcctgtcgaacccgaccagcggatgcagctggt gttcagccgagaggagctgccgctcaccaccttctcctgtactgagccagaac aagccgaaggccgctgagggctgtggacaccagcgcttctcgggcaaacggctgg

		gagacacttttgctgactctctccgacttccggcgggagaaacgagggctactacttct gctctgctgcttccaattcaatcatgtacttctcacacttctgcccgtgttctgcctgcc aagcccaccactactccggcaccagacctccaactcccgtctccaccatcgcgctcc caaccccttctgctgcccctgaagcgtgtcggcctgctgctggaggagccgtgcata cccgggtctggacttgcgtgacacatctacatttgggcccccttggctggcacctgtg gagtgtgctcctgtccctgtgatcacctgtactgcaaccaccggaataggcggag agtctgcaagtgtccgcccgtgtcgtgaagtcaggagataagccgagcctgtccgc acgctacgtgcgggccaagagatctggcagcggcgagggcagaggcagcctgtct gacctgcccgcagctggaggagaaccccgccccatggactcttggaccttctgctg cgtgagcctgtgcatcctggtggccaagcacacagacgccggcgtgatccagtccc ctaggcacgaggtgaccgagatgggcccaggaggtagactgcgctgtaagccaat ctctggccacaacagcctgttttggtagaggagaccatgatgcgcccgtggagctg ctgatctactcaataacaatgtgccatcgacgattccggcatgcctgaggatcggttt tctgccaagatgccaatgccagcttctccacactgaagatccagcctagcgagcca agagactccgccgtgtattttgcgcctctagcccaggcagcaccgatacacagtactt cggaccaggaaccaggctgacagtgtggaggacctgaagaacgtgttccccctg aggtggccgtgttgagccctctgaggccgagatcagccacaccagaaggccacc ctggtgtcctggcaaccggcttctatcctgatcacgtggagctgtcctggtgggtgaa cggcaaggaggtgcacagcggcgtgtccacagaccacagccccctgaaggagca gccagccccgaatgatagccggtattgcctgtcctctcggtgagagtgccgccacct tttggcagaacccccggaatcacttcagatgtcaggtgcagttttacggcctgtccgag aacgatgagtggaccaggaccgggccaagcctgtgacacagatcgtgtctgccg aggcatggggaagagcagactgtggcttcacctctgagagctaccagcagggcgtg ctgagcgcaccatcctgtatgagatcctgctgggcaaggccacactgtacgccgtc ctggtctccgctctggtgctgatggcaatggtcaaaagaaaagatagtcggggacgg gccaagagatctggcagcggccagtgcaccaactacgccctgctgaagctggccg gcgacgtggagagcaaccccgccccatggagaagaatccccctggctgccccct gctgatcctgtggtttcacctggactgcgtgtcctctatcctgaatgtggaacagagccc acagagcctgcacgtgcaggaggggcactccaccaacttcacatgctctttcctagc tccaacttctacgccctgcactggtacagaaaggagaccgcaaagtccccagaggc
--	--	---

		cctgttcgtgatgacactgaacggcgatgagaagaagaagggccgcatcagcgcc accctgaatacaaaggaggggtactcctatctgtacatcaagggctcccagcctgag gactctgccacctatctgtgcgccctgtacaacaataacgatatgcggtttggcgccgg caccagactgacagtgaagccaaacatccagaatccagaccccgccgtgtatcag ctgcgggacagcaagtctagcgataagagcgtgtgcctgttcaccgactttgatttca gacaaacgtgagccagtccaaggacagcgacgtgtacatcaccgacaagacagt gctggatatgagaagcatggacttcaagtctaacagcgccgtggcctggccaataa gtctgatttcgcctgcgccaatgccttaataactccatcatccccgaggataccttcttc cttctccagagtcctctgtgacgtgaagctggaggagaagctttcgagaccgataca aacctgaatttcagaacctgagcgtgatcggctcaggatcctgctgctgaagggtggc cggctttaatctgctgatgacctgaggctgtggagctcctgaaccgggtccgcagctcg acgtacgcgtaataacctctggattacaaaatttgtaaagattgactggtattcttaa ctatgttgctcctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgatcatgctattgctc ccgtatggctttcattttctcctctgtataaatcctgggtgctgtctctttatgaggagtgtg gcccgtgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgcactgtgttgctgacgcaacccccactg gttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctatt gccacggcggaactcatcgccgctgccttgcccgtgctggacaggggctcggctg ttgggcactgacaattccgtgggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctc gcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctca atccagcggaccttcttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctctccgcgtcttc gccttcgccctcagacgagtcggatctcccttgggcccgcctccccgcc
95	R11KE WPRE	tgaaagaccccacctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggc atggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaacagaga gacagcagaatatgggcaaacaggatatctgtggaagcagttcctgccccggctc agggccaagaacagatggtccccagatgcggtcccgccctcagcagtttctagaga accatcagatgtttccagggtgcccccaaggacctgaaaatgacctgtgccttattga actaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataa aagagcccacaacccctcactcagcggccgccccgggtcgacgctaccacatgg actcttgaccttctgctgctgagcctgtgcatcctgggtggccaagcacacagacgc cggcgtgatccagtcccctaggcacgaggtgaccgagatgggccaaggaggtgaca

	ctgcgctgtaagccaatctctggccacaacagcctgttttggtataggagaccatgat gcgcggcctggagctgctgatctacttcaataacaatgtgcccatcgacgattccggc atgcctgaggatcggtttctgccaagatgccaatgccagcttctccacactgaagat ccagcctagcgagccaagagactccgccgtgtattttgcgctctagcccaggcag caccgatacacagtacttcggaccaggaaccaggctgacagtgctggaggacctg aagaacgtgttccccctgaggtggccgtgtttgagccctctgaggccgagatcagcc acaccagaaggccaccctggtgtgcctggcaaccggcttctatcctgatcacgtgg agctgtcctggtgggtgaacggcaaggaggtgcacagcggcgtgtccacagaccc acagcccctgaaggagcagccagccctgaatgatagccggtattgctgtcctctcg gctgagagtgtccgccaccttttggcagaacccccggaatcacttcagatgtcagggtg cagttttacggcctgtccgagaacgatgagtggaaccaggaccgggccaagcctgt gacacagatcgtgtctgccgaggcatggggaagagcagactgtggcttcacctctga gagctaccagcagggcggtgctgagcgccaccatcctgtatgagatcctgctgggcaa ggccacactgtacgccgtcctggtctccgctctggtgctgatggcaatggtcaaaaga aaagatagtcggggacgggccaagagatctggcagcggcgccaccaatttcagcc tgctgaaacaggccggcgacgtggaagagaaccctggcccatggagaagaatc ccctggctgccccctgctgatcctgtggtttcacctggactgcgtgtcctctatcctgaat gtggaacagagcccacagagcctgcacgtgcaggagggcgactccaccaacttca catgctcttttctagctccaacttctacgccctgcactggtacagaaaggagaccgca aagtcccagaggccctgttcgtgatgacactgaacggcgatgagaagaagaagg gccgcatcagcgccaccctgaatacaaaggaggggtactcctatctgtacatcaagg gctcccagcctgaggactctgccacctatctgtgcgccctgtacaacaataacgatat gcggtttggcgccggcaccagactgacagtgaagccaaacatccagaatccagac cccgccgtgtatcagctgcgggacagcaagtctagcgataagagcgtgtgcctgttc accgactttgattctcagacaaacgtgagccagtccaaggacagcgacgtgtacatc accgacaagacagtgttgatatgagaagcatggacttcaagtctaacagcgccgt ggcctggtccaataagtctgatttcgctgcgccaatgcctttaataactccatcatccc cgaggataccttcttcttccagagtcctctgtgacgtgaagctgggtggagaagtct ttcgagaccgatacaaacctgaattttcagaacctgagcgtgatcggttcaggatcct gctgctgaagggtggccggcttaatctgctgatgaccctgaggctgtggagctcctgaa
--	---

		ccggtccgcagctctgacgtacgcgtaataacacctctggattacaaaatttgtaaagat tgactgggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgcctgcttaatgcctttgt atcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgataaatcctgggtgctgtctct ttatgaggagttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcggtgtgactgtgttgctga cgcaacccccactgggtggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggactttcg cttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgcctgcccgtgctgga caggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaagctgacgtc ctttccatggctgctcgcctgtgtgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgtac gtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgccgctgctgccggctctgcg gcctctccgcgtcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctcccttgggcccgcctcc ccgcc
96	CD8 WPRE	tgaaagacccacctgtaggttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggc atggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaaggttaggaacagaga gacagcagaatatgggccaacaggatatctgtggaagcagttcctgccccggctc agggccaagaacagatggtccccagatgcggtcccgccctcagcagttctagaga accatcagatgtttccagggtgccccaggacctgaaaatgacctgtgccttattga actaaccaatcagttcgcttctcgcttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctcaataa aagagcccacaacccctcactcagcggccgccccgggtcgacgtaccaccatgc gcccgagactgtggcttctgctcgcgcgcaactgactgtcctgcacggaaacagcg tgctgcagcagacaccggcctacatcaaagtgcagaccaacaagatggatcatgtg tctgagaggccaagattccctctccaacatgcggatctattggtgcggcagagaca ggcgcttctcggactcccaccatgagttcttgccctgtgggactccgccaaggga actattcacggcgaagaagtggaacaggagaagatcgccgtgttcgcgatgcctcc cgctttatactgaatctgacctccgtgaagcccgaagatagcgggatctactttgcatg attgtgggctcaccggaactgacctcggaagggaactcagctgagcgtggtggac ttcctccccactaccgccaacccactaagaagtcaacctgaagaagcgggttgc agactcccacggccggaacgcagaagggtccgctgtgttcccgatcacctggg gctcctgtggctggagtgctggtccttctggtgtcccttggcgctgccattcacctctgct gccggagaaggaggggccagactgaggttcatgaagcagcctcaggagagagggg atcagtggcactttcgtgccacaatgcctccatggctactattccaacaccaccacctc

		gcaaaagctgctgaaccctggatcctgaaaacccgggccaagagatctggcagc ggcgccaccaatttcagcctgctgaaacaggccggcgacgtggaagagaaccctg gccccatggcgcttcccgtgaccgcactcctgttggccctgcccctgctgttgacgccc cacgaccttcccaattccgggtgtcccctctggatcgcacctggaacctcggggaaac ggtggagctcaagtgtcaagtccctctgctgaacccgaccagcggatgcagctggct gttcagccgagaggagctgccgcctcaccaccttccctgtacttgagccagaac aagccgaaggccgctgagggctgtgacacccagcgcttctcgggcaaacggctgg gagacacttttgtgctgactctcctcgacttccggcgggagaacgagggctactacttct gctctgcgctctccaattcaatcatgtacttctcacacttcgtgccggtgttccctgcctgcc aagcccaccactactccggcaccagacctccaactcccgtcccaccatcgcgctcc caaccctttcgctgcgcctgaagcgtgtcggcctgctgctggaggagccgtgcata cccgcggtctggacttcgcgtgcgacatctacatttgggccccttggctggcacctgtg gagtgtgctcctgtccctgtgatcaccctgtactgcaaccaccggaataggcggag agtctgcaagtgtccgcggcctgtcgtgaagtcaggagataagccgagcctgtccgc acgctacgtgtgaaccggtccgcagctgacgtacgcgtaataacctctggattaca aaatttgtgaaagattgactggattcttaactatgttgctcctttacgctatgtggatacg ctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgatggctttcattttcctcctgtataa atcctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtgggt gcactgtgttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctc ctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgcc ttgccgctgctggacaggggctcggtgttgggactgacaattccgtgggtgtgtcg gggaagctgacgtcctttccatggctgtcgcctgtgttgccacctggattctgcgcggg acgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccctcccgcggcctg ctgccggctctgcggcctcttcgcgtcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctcc ctttgggcccgcctccccgcc
97	RD114TR	MKLPTGMVILCSLIIVRAGFDDPRKAIALVQKQHGPCECSG GQVSEAPPNSIQQVTCPGKTAYLMTNQKWKCRVTPKISPSG GELQNCPCNTFQDSMHSSCYTEYRQCRRINKTYTATLLKIR SGSLNEVQILQNPQNLLQSPCRGSINQPVCSATAPIHISDG GGPLDTRVWTVQKRLEQIHKAMTPELQYHPLALPKVRDDL

		SLDARTFDILNTTFRLLQMSNFSLAQDCWLCLKLGTPTPLAIP TPSLTYSLADSLANASCQIIPPLLVQPMQFSNSSCLSSPFIND TEQIDLGAVTFTNCTSVANVSSPLCALNGSVFLCGNNMAYTY LPQNWTRLCVQASLLPDIDINPGDEPVPIPAIDHYIHRPKRAV QFIPLLAGLGITAAFTTGATGLGVSVTQYTKLSHQLISDVQVL SGTIQDLQDQVDSLAEVVLQNRRGLDLLTAEQGGICLALQEK CCFYANKSGIVRNKIRTLQEELQKRRESLASNPLWTGLQGFL PYLLPLLGPLLTLILLITIGPCVFNRLVQFVKDRISVVQALVLTQ QYHQLKPL
265	WPREmut1	cagtctgacgtacgcgtaatacaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggt attcttaactatgttgctcctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgatcatgct attgcttcccgtatggcttcattttctcctccttgataaatcctggtgctgtctctttatgag gagttgtggcccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgttgctgacgcaac ccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctccttccgggactttcgcttcccc ctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgcctgcccgtgctggacagggg ctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgctcctttccttg gctgctgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcg gccctcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctctcc gcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcc
266	WPREmut2	gagcatcttaccgccatttatacccatatttgttctgttttcttgattgggtatacatttaaat gttaataaaacaaaatggtggggcaatcatttacatttttgggatatgaattactagttc aggtgtattgccacaagacaaaactgttaagaaactttcccgattttacgctctgttctg ttaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactgatattcttaacttgttgctc ctttacgctgtgtggatttgctgctttattgcctctgtatcttgctattgcttcccgtaaggcttt cgttttctcctccttgataaatcctggtgtgtctcttttgaggagttgtggcccggtgtcc gtcaacgtggcgtggtgtgctctgtgtttgtgacgcaacccccactggctggggcatt gccaccacctgtcaactccttctgggactttcgcttccccctcccgatgccacggca gaactcatcgccgcctgcctgcccgtgctggacaggggctaggtgtgctgggactg ataattccgtggtgtgtc

Tabla 3. Secuencias peptídicas de los AAT

SEQ ID N.º	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID N.º	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID N.º	Secuencia de aminoácidos
98	YLYDSETKNA	151	LLWGHPRVALA	204	SLLNQPKAV
99	HLMDQPLSV	152	VLDGKVAVV	205	KMSELQTYV
100	GLLKKINSV	153	GLLGKVTSV	206	ALLEQTGDMSL
101	FLVDGSSAL	154	KMISAIPTL	207	VIIKGLEEITV
102	FLFDGSANLV	155	GLLETTGLLAT	208	KQFEGTVEI
103	FLYKIIDEL	156	TLNTLDINL	209	KLQEEIPVL
104	FILDSAETTTL	157	VIIKGLEEI	210	GLAEFQENV
105	SVDVSPPKV	158	YLEDGFAYV	211	NVAEIVIH
106	VADKIHSV	159	KIWEELSVLEV	212	ALAGIVTNV
107	IVDDLTINL	160	LLIPFTIFM	213	NLLIDDKGTIKL
108	GLLEELVTV	161	ISLDEVAVSL	214	VLMQDSRLYL
109	TLDGA AVNQV	162	KISDFGLATV	215	KVLEHVVRV
110	SVLEKEIYSI	163	KLIGNIHGNEV	216	LLWGNLPEI
111	LLDPKTIFL	164	ILLSVLHQL	217	SLMEKNQSL
112	YTFSGDVQL	165	LDSEALLTL	218	KLLAVIHEL
113	YLMDDFSSL	166	VLQENSSDYQSNL	219	ALGDKFLLRV
114	KVWSDVTPL	167	HLLGEGAFAQV	220	FLMKNSDLYGA
115	LLWGHPRVALA	168	SLVENIHVL	221	KLIDHQGLYL
116	KIWEELSVLEV	169	YTFSGDVQL	222	GPGIFPPPPQP
117	LLIPFTIFM	170	SLSEKSPEV	223	ALNESLVEC

118	FLIENLLAA	171	AMFPDTIPRV	224	GLAALAVHL
119	LLWGHPRVALA	172	FLIENLLAA	225	LLLEAVWHL
120	FLLEREQLL	173	FTAEFLEKV	226	SIIEYLPTL
121	SLAETIFIV	174	ALYGNVQQV	227	TLHDQVHLL
122	TLLEGISRA	175	LFQSRIAGV	228	SLLMWITQC
123	KIQEILTQV	176	ILAEPIYIRV	229	FLLDKPQDLSI
124	VIFEGEPMYL	177	FLLEREQLL	230	YLLDMPLWYL
125	SLFESLEYL	178	LLPLELSLA	231	GLLDCPIFL
126	SLLNQPKAV	179	SLAETIFIV	232	VLIEYNFSI
127	GLAEFQENV	180	AILNVDEKNQV	233	TLYNPERTITV
128	KLLAVIHEL	181	RLFEEVLGV	234	AVPPPPSSV
129	TLHDQVHLL	182	YLDEVAFML	235	KLQEELNKV
130	TLYNPERTITV	183	KLIDEDEPLFL	236	KLMDPGSLPPL
131	KLQEKIQEL	184	KLFEKSTGL	237	ALIVSLPYL
132	SVLEKEIYSI	185	SLLEVNEASSV	238	FLLDGSANV
133	RVIDDSLVLGV	186	GVYDGREHTV	239	ALDPGSGNQLI
134	VLFGELPAL	187	GLYPVTLVGV	240	ILIKHLVKV
135	GLVDIMVHL	188	ALLSSVAEA	241	VLLDTILQL
136	FLNAIETAL	189	TLLEGISRA	242	HLIAEIHTA
137	ALLQALMEL	190	SLIEESEEL	243	SMNGGVFAV
138	ALSSSQAEV	191	ALYVQAPTV	244	MLAEKLLQA
139	SLITGQDLLSV	192	KLIYKDLVSV	245	YMLDIFHEV
140	QLIEKNWLL	193	ILQDQGFLV	246	ALWLPTDSATV

141	LLDPKTIFL	194	SLLDYEVSI	247	GLASRILDA
142	RLHDENILL	195	LLGDSSFFL	248	ALSVLRAL
143	YTFSGDVQL	196	VIFEGEPMYL	249	SYVKVLHHL
144	GLPSATTTV	197	ALSYILPYL	250	VYLPKIPSW
145	GLLPSAESIKL	198	FLFVDPELV	251	NYEDHFPLL
146	KTASINQNV	199	SEWGSPHAAVP	252	VYIAELEKI
147	SLLQHLIGL	200	ALSELERVL	253	VHFEDTGKTLF
148	YLMDDFSSL	201	SLFESLEYL	254	VLSPFILTL
149	LMYPYIYHV	202	KVLEYVIKV	255	HLLEGSGGV
150	KVWSDVTPL	203	VLLNEILEQV		

[000186] EJEMPLO 2

[000187] Fabricación de los linfocitos T $\gamma\delta$

[000188] Para aislar los linfocitos T $\gamma\delta$, en un aspecto los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden ser aislados de un sujeto o de una muestra compleja de un sujeto. En un aspecto, la muestra compleja puede ser una muestra de sangre periférica, una muestra de sangre del cordón umbilical, un tumor, una célula madre precursora, una biopsia tumoral, un tejido, un ganglio linfático, o sitios epiteliales de un sujeto que estén en contacto directo con el medio externo o bien derivados de células madre precursoras. Los linfocitos T $\gamma\delta$ pueden ser aislados directamente de una muestra compleja de un sujeto, por ejemplo, mediante la selección de linfocitos T $\gamma\delta$ que expresen uno o más marcadores en la superficie celular con técnicas de citometría de flujo. Los linfocitos T $\gamma\delta$ naturales (*wild-type*) pueden exhibir numerosas moléculas destinadas al reconocimiento de antígenos, a la presentación de antígenos, coestimuladoras o de adhesión que pueden estar vinculadas con los linfocitos T $\gamma\delta$. Para aislar linfocitos T $\gamma\delta$ naturales de una muestra compleja se pueden usar uno o varios marcadores de la superficie celular, como TCR $\gamma\delta$ específicos, moléculas de reconocimiento de antígenos, de presentación de antígenos, ligandos, moléculas de

adhesión o moléculas coestimuladoras. Para aislar linfocitos T $\gamma\delta$ de una muestra compleja, p. ej., para el aislamiento de una población mixta de linfocitos V δ 1+, V δ 2+, V δ 3+ o de cualquier combinación de los anteriores, se puede recurrir a diversas moléculas asociadas con los linfocitos T $\gamma\delta$ o que estos expresan.

[000189] Por ejemplo, los linfocitos monomorfonucleares de sangre periférica se pueden recoger de un sujeto, por ejemplo, con una máquina de aféresis, como el sistema Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare), u otro dispositivo o sistema adecuado. El o los linfocitos T $\gamma\delta$, o una subpoblación deseada de linfocitos T $\gamma\delta$, pueden ser purificados de la muestra recogida con, por ejemplo, técnicas de citometría de flujo. También se pueden obtener células sanguíneas del cordón umbilical durante el nacimiento de un sujeto.

[000190] Se puede usar la selección positiva y/o negativa de marcadores de la superficie celular expresados en los linfocitos T $\gamma\delta$ recolectados para aislar directamente linfocitos T $\gamma\delta$, o una población de linfocitos T $\gamma\delta$ que exprese marcadores similares en la superficie celular a partir de una muestra de sangre periférica, una muestra de sangre del cordón umbilical, de un tumor, una biopsia tumoral, un tejido, un ganglio linfático o de una muestra de epitelio de un sujeto. Por ejemplo, se pueden aislar linfocitos T $\gamma\delta$ de una muestra compleja en función de la expresión positiva o negativa de CD2, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD44, Kit, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ , NKG2D, CD70, CD27, CD30, CD16, CD337 (NKp30), CD336 (NKp46), OX40, CD46, CCR7 y otros marcadores de la superficie celular adecuados.

[000191] La Fig. 1 muestra la fabricación de linfocitos T $\gamma\delta$ de acuerdo con una forma de realización de la presente descripción. Este proceso puede incluir la recolección o la obtención de leucocitos o de PBMC a partir de los productos de la leucocitaféresis. La leucocitaféresis puede incluir la recolección de sangre entera de un donante y la separación de los componentes con una máquina de aféresis. La máquina de aféresis separa los componentes sanguíneos deseados y devuelve el resto a la circulación del donante. Por ejemplo, con el equipo de aféresis se pueden recolectar células sanguíneas, plasma y plaquetas, mientras que los hematíes y los neutrófilos se devuelven a la circulación del donante. En este proceso se pueden usar productos de leucocitaféresis

comerciales. Otro modo de obtener leucocitos consiste en obtenerlos de la capa leucocítica. Para aislar la capa leucocítica se obtiene sangre entera anticoagulada de un donante y se centrifuga. Con la centrifugación, la sangre queda separada en plasma, hematíes y capa leucocítica. La capa leucocítica es la capa situada entre el plasma y la capa de hematíes. La recolección mediante leucocitaféresis puede redundar en una mayor pureza y en un aumento considerable del contenido de células monomorfonucleares que el que se logra con la recogida de la capa leucocítica. La cantidad de células monomorfonucleares que se puede obtener con la leucocitaféresis normalmente es unas 20 veces mayor que la obtenida de la capa leucocítica. A fin de enriquecer el producto con células monomorfonucleares, puede ser necesario usar un gradiente de Ficoll para mejorar la separación.

[000192] Para eliminar los linfocitos T $\alpha\beta$ de las PBMC se pueden separar las células que expresen los TCR $\alpha\beta$ de las PBMC mediante separación magnética, p. ej., con perlas magnéticas CliniMACS[®] tapizadas con anticuerpos anti-TCR $\alpha\beta$, y posterior criopreservación de las PBMC desprovistas de los linfocitos T con TCR $\alpha\beta$. Para fabricar los productos de linfocitos T “listos para usar” se pueden descongelar las PBMC criogenizadas de las que se habían eliminado los linfocitos T con TCR $\alpha\beta$ y proceder a su activación a pequeña o mediana escala, p. ej., en placas de 24 a 4-6 pocillos o en frascos T75/T175, o a mayor escala, p. ej., en bolsas de 50 ml a 100 litros, añadiendo aminobisfosfonato, p. ej., zoledronato, y/o pirofosfato de isopentenilo (IPP) y/o citocinas, p. ej., interleucina 2 (IL-2), interleucina 15 (IL-15) y/o interleucina 18 (IL-18), y/u otros activadores, p. ej., el ligando del receptor de tipo Toll 2 (TLR2), durante 1 a 10 días, p. ej., durante 2 a 7 días.

[000193] La Fig. 1 muestra que los linfocitos T activados pueden ser genomodificados mediante la transducción de los linfocitos T $\gamma\delta$ aislados con un vector vírico, como un vector lentivírico, para que expresen genes exógenos de interés, como TCR $\alpha\beta$ dirigidos contra un antígeno tumoral específico y el CD8. La transducción se efectúa una o varias veces para lograr una expresión estable del transgén a pequeña escala, p. ej., en placas de 24 a 4 o 6 placas, o a escala mediana o grande durante ½ a 5 días, p. ej., 1 día.

[000194] La Fig. 1 muestra que la expansión de los linfocitos T $\gamma\delta$ genomodificados o transducidos se puede llevar a cabo con la presencia de citocinas, p. ej., IL-2, IL-15, IL-18, y otras, a escala pequeña o mediana, p. ej., en frascos/G-Rex, o a gran escala, p. ej., en bolsas de 50 ml a 100 litros, durante 7 a 35 días, p. ej., de 7 a 28. Los productos de linfocitos T transducidos o expandidos se pueden, pues, conservar criogenizados como productos de linfocitos T “listos para usar” destinados a la infusión de los pacientes.

[000195] EJEMPLO 3

[000196] Vectores lentivíricos

[000197] Los vectores lentivíricos referidos en la presente memoria contienen varios elementos de los que previamente se ha demostrado que mejoran el funcionamiento del vector, tales como un tracto central de polipurinas (cPPT) que mejora la importación al núcleo y la replicación, un promotor procedente del virus de células madre murinas (MSCV) (SE ID N.º 1), el cual ha demostrado reducir el silenciamiento del vector en ciertos tipos de células, un elemento de respuesta portranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) (SEQ ID N.º 9) para mejorar la terminación de la transcripción, y la estructura central corresponde a un diseño de vector autoinactivante (SIN) con la 3'-LTR suprimida, que puede brindar mejor seguridad, una expresión génica sostenida y propiedades anti-silenciamiento (Yang et al. *Gene Therapy* (2008) 15, 1411–1423, cuyo contenido se incorpora íntegramente como referencia).

[000198] En un aspecto, los vectores, los constructos o las secuencias descritos en la presente memoria comprenden formas mutadas del WPRE. En otro aspecto, las secuencias o los vectores descritos en la presente memoria comprenden mutaciones en el WPRE versión 1, p. ej., WPREmut1 (SEQ ID N.º 265), o el WPRE versión 2, p. ej., WPREmut2 (SEQ ID N.º 266). En un aspecto, los mutantes del WPRE comprenden a lo sumo una mutación, a lo sumo dos mutaciones, a lo sumo tres mutaciones, al menos cuatro mutaciones o a lo sumo cinco mutaciones. En un aspecto, los vectores, los constructos o las secuencias descritos en la presente memoria no comprenden el WPRE. En otro aspecto, la descripción proporciona una, dos, tres, cuatro, cinco, diez o 20 sustituciones en una de las SEQ ID N.º 91 a 96.

[000199] En otro aspecto, los vectores, los constructos o las secuencias descritas en la presente memoria no incluyen un promotor de la proteína X.

[000200] A fin de obtener niveles óptimos de coexpresión del TCR $\alpha\beta$ y del CD8 $\alpha\beta$ en los linfocitos T transducidos, se generaron vectores lentivíricos con diversos diseños. La Fig. 2 muestra que los linfocitos T pueden ser transducidos con dos vectores lentivíricos independientes (2-en-1) que hacen posible la expresión del TCR $\alpha\beta$ o del CD8 $\alpha\beta$, o con un solo vector lentivírico (4-en-1) que permite la coexpresión del TCR $\alpha\beta$ y del CD8 $\alpha\beta$. En el vector 4-en-1, los nucleótidos que codifican la cadena TCR α , la cadena TCR β , la cadena CD8 α y la cadena CD8 β pueden insertarse en diverso orden. De ese modo se generan así varios vectores 4-en-1, que se pueden usar para transducir linfocitos T $\gamma\delta$, tras lo cual se procede a medir los niveles de coexpresión del TCR y del CD8 en los linfocitos transducidos mediante técnicas conocidas en la disciplina, como p. ej., la citometría de flujo.

[000201] Para generar vectores lentivíricos que posibiliten la coexpresión de TCR $\alpha\beta$ y CD8 $\alpha\beta$ se puede insertar un polinucleótido que codifique la secuencia de furina-conector (GSG o SGSG [SEQ ID N.º 8])-péptido 2A entre la cadena TCR α y la cadena TCR β , entre la cadena CD8 α y la cadena CD8 β , y entre la cadena del TCR y la cadena del CD8 para posibilitar una expresión génica altamente eficiente. El péptido 2A puede seleccionarse entre P2A (SEQ ID N.º 3), T2A (SEQ ID N.º 4), E2A (SEQ ID N.º 5) o F2A (SEQ ID N.º 6).

[000202] Los vectores lentivíricos también pueden contener un elemento regulador postranscripcional (PRE), como un PRE del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) (SEQ ID N.º 9) para potenciar la expresión del transgén mediante el aumento de las concentraciones de ARNm en el núcleo y el citoplasma. Para aumentar la expresión del transgén también se pueden usar uno o más elementos reguladores como son el elemento transportador de ARN murino (RTE), el elemento transportador constitutivo (CRE) del retrovirus simio de tipo 1 (SRV-1), y la región 5' no traducida de la proteína de choque térmico humana 70 (5'UTR de la Hsp70) y/o en combinación con el WPRE.

[000203] Los vectores lentivíricos pueden ser seudotipados con la RD114TR (SEQ ID N.º 97), que es una glucoproteína quimérica que contiene el dominio extracelular y el dominio

transmembrana del virus endógeno felino (RD114) fusionados con la cola citoplasmática (TR) del virus de la leucemia murina. También se pueden usar otras proteínas de envolturas víricas, como las VSV-G env, MLV 4070A env, RD114 env, la proteína quimérica de envoltura RD114pro, la GP64 env baculovírica o la GALV env, o derivados de las mismas.

[000204] La Fig. 3 muestra cuatro vectores 4-en-1, a saber, PTE WPRE (SEQ ID N.º 91), TPE WPRE (SEQ ID N.º 92), PTE fn WPRE (SEQ ID N.º 93) y PTE CD8 TCR WPRE (SEQ ID N.º 94), que posibilitan la coexpresión de TCR $\alpha\beta$ (R11KEA) y CD8 $\alpha\beta$, y dos vectores 2-en-1, a saber, R11KE WPRE (SEQ ID N.º 95), que posibilita la expresión de TCR $\alpha\beta$ (R11KEA) y CD8, y el WPRE (SEQ ID N.º 96), que posibilita la expresión de CD8 $\alpha\beta$. El TCR $\alpha\beta$ (R11KEA) se une a PRAME-004 (SLLQHLIGL) (SEQ ID N.º 147) formando un complejo con una molécula del MHC.

[000205] EJEMPLO 4

[000206] Coexpresión de TCR y CD8

[000207] Los linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos del donante 1 y del donante 2 se fabricaron con el proceso mostrado en la Fig. 1. Al tercer o al sexto día de la activación con zoledronato, IL-2 e IL-15, los linfocitos T $\gamma\delta$ se transdujeron con lentivirus seudotipados con la RD114TR, p. ej., PTE WPRE (SEQ ID N.º 91), TPE WPRE (SEQ ID N.º 92), PTE fn WPRE (SEQ ID N.º 93) y PTE CD8 TCR WPRE (SEQ ID N.º 94), y después se midieron los niveles de coexpresión de R11KEA y de CD8 con citometría de flujo. La eficiencia de la transducción se evaluó con anticuerpos dirigidos específicamente contra el TCR (V β 8) y el CD8 (CD8 α) mediante citometría de flujo.

[000208] La Fig. 4 muestra que los niveles de coexpresión de R11KEA y de CD8 en los linfocitos T $\gamma\delta$ del donante 1 que son el resultado de la transducción con PTE CD8 TCR WPRE, a saber, un 40,5 % (Día 3) y 18,5 % (Día 6), son superiores a los resultantes de la transducción con PTE WPRE (29,6 % [Día 3], 16,2 % [Día 6]), con TPE WPRE (30,8 % [Día 3], 11,0 % [Día 6]), y con PTE fn WPRE (33,0 % [Día 3], 15,0 % [Día 6]). En los linfocitos T $\gamma\delta$ del donante 2, los niveles de co-expresión de R11KEA y CD8 el sexto día después de la activación resultantes de la transducción con PTE WPRE, de un 18,8 %,

son superiores a los logrados con la transducción con TPE WPRE (14,2 %), con PTE fn WPRE (14,7 %) y con PTE CD8 TCR WPRE (17,2 %). Como controles se adoptaron los niveles de fondo de R11KEA y CD8 detectados en linfocitos T $\gamma\delta$ que habían sido transducidos por separado con dos vectores 2-en-1, en concreto, TCR $\alpha\beta$ (R11KEA) y CD8 WPRE.

[000209] EJEMPLO 5

[000210] Efectos sobre la expresión y la funcionalidad de los transgenes incorporados en vectores víricos 4-en-1 (p. ej., vectores lentivíricos) derivados de las diferentes posiciones ocupadas por las secuencias codificantes de las cadenas CD8 $\alpha\beta$ y de las cadenas TCR $\alpha\beta$ dentro de los vectores.

[000211] WO 2019/204662 describe linfocitos CD4+ que expresan un correceptor exógeno CD8 $\alpha\beta$ y uno o más receptores de antígeno genomodificados exógenos, p. ej., TCR. La Tabla 4 muestra una comparación entre los constructos 4-en-1 descritos en WO 2019/204662 y los constructos acordes con aspectos de la presente descripción.

Tabla 4

	WO 2019/204662	Aspectos descritos en la presente memoria
Orientación del transgén (en dirección 5' a 3')	TCR β -TCR α -CD8 α -CD8 β	CD8 β -CD8 α -TCR β -TCR α
Fuentes de las secuencias de CD8 $\alpha\beta$	GenBank	Secuencia con codones optimizados (para potenciar la expresión)
Conectores 2A	2A	conector 2A + furina (para fomentar la escisión eficiente de las secuencias residuales 2A del gen de interés)
Tipo celular	linfocitos CD4+ y linfocitos	linfocitos T $\gamma\delta$ (baja expresión de

	CD8+	CD8, 0 a 20 %, y nula expresión de CD4)
Virus y pseudotipos	retrovirus y RD114	lentivirus y RD114TR y VSV-G

[000212] Los codones del marco abierto de lectura (ORF) de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente descripción pueden estar optimizados, al menos en parte. La optimización de los codones se basa en el descubrimiento de que la eficiencia de la traducción puede depender de la frecuencia con que aparecen los ARN de transferencia (ARNt) en las células. Así pues, los marcos abiertos de lectura de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente descripción pueden ser modificados con respecto a la pertinente región codificante natural (*wild-type*) de modo que al menos un codón de la secuencia natural que codifica un ARNt dado, que sea relativamente infrecuente en la célula, puede cambiarse por otro codón, que codifique ese ARNt, que comparativamente sea más frecuente en la célula y pueda transportar el mismo aminoácido que el ARNt relativamente infrecuente. Con esa modificación el marco abierto de lectura de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente descripción puede ser modificado de modo que esos codones que cuentan con ARNt abundantes pueden sustituir a los otros codones que corresponden a los ARNt infrecuentes. En otras palabras, de acuerdo con la presente descripción, con esa modificación todos los codones del marco de lectura abierto natural que codifican un ARNt infrecuentes pueden ser sustituidos por otros codones que codifican un ARNt que es más frecuente en la célula y que transporta el mismo aminoácido que el ARNt infrecuente. Las personas versadas en la disciplina sabe qué ARNt son relativamente abundantes en la célula y cuáles en cambio son relativamente escasos; véase p. ej., Akashi, Curr. Opin. Genet. Dev. 2001, 11(6): 660-666, cuyo contenido se incorpora íntegramente como referencia. En ciertas formas de realización, los codones de los marcos abiertos de lectura de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente descripción pueden estar optimizados, preferentemente en relación con el sistema en el que las moléculas de ácidos nucleicos de la presente descripción se van a expresar, más preferentemente en relación con el sistema con el que las moléculas de ácidos nucleicos de la presente descripción van a ser

traducidas. Preferentemente, el uso de los codones en los marcos abiertos de lectura de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente descripción puede ser optimizado conforme al uso propio de los mamíferos, más preferentemente, conforme al uso de los codones en el ser humano. Preferentemente el marco abierto de lectura puede tener los codones optimizados y ser modificado en su contenido de G/C.

[000213] Para determinar qué orientación del transgén ofrece una mejor expresión y funcionalidad del mismo, se transdujeron linfocitos T $\gamma\delta$ con tres vectores víricos 4-en-1 portadores de secuencias codificantes de las cadenas TCR $\alpha\beta$ situadas por delante de las secuencias codificantes de las cadenas CD8 $\alpha\beta$, p. ej., PTE.WPRE (SEQ ID N.º 91), TPE.WPRE (SEQ ID N.º 92) y PTE.fn.PRE (SEQ ID N.º 93), y un vector vírico 4-en-1 portador de secuencias codificantes de las cadenas CD8 $\alpha\beta$ situadas por delante de las secuencias codificantes de las cadenas TCR $\alpha\beta$, p. ej., PTE.CD8.TCR.WPRE (SEQ ID N.º 94), y a continuación se procedió a un análisis de selección celular con activación por fluorescencia (FACS) con anticuerpos anti-CD8 marcados por fluorescencia y anticuerpos anti-TCR V β 8 (Vb8) marcados por fluorescencia para detectar, respectivamente, la expresión del CD8 y del TCR en la superficie celular.

[000214] Las Figs. 10 y 11 muestran que en los linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos del donante 3 y del donante 4 la transducción con el vector vírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE da como resultado la expresión máxima de CD8 y TCR en la superficie celular en el día 14 de fabricación en comparación con los transducidos con los vectores víricos 4-en-1 portadores de PTE.WPRE, de TPE.WPRE o de PTE.fn.WPRE, según el porcentaje de linfocitos doblemente positivos para CD8+Vb8+ (Fig. 10) y según la MFI del CD8 o la MFI del Vb8 (Fig. 11).

[000215] La elevada expresión del CD8 y del TCR en la superficie celular de los linfocitos T $\gamma\delta$ transducidos con el vector vírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE aparece correlacionada con su actividad citolítica *in vitro*. Por ejemplo, la Fig. 12 muestra que los linfocitos T $\gamma\delta$ procedentes del donante 3 transducidos con un vector vírico 4-en-1 portador de PTE.PRE.TPE.WPRE presentan la mejor actividad citolítica antitumoral tanto contra la estirpe celular UACC257, que presenta con profusión el péptido diana (cuadro superior),

como contra la estirpe celular U2OS, que presenta poco el péptido diana (cuadro inferior), en comparación con los vectores víricos 4-en-1 portadores de PTE.PRE.TPE.WPRE o de PTE.fn.WPRE. Las figuras 13A-13C muestran la magnitud de la secreción de IFN- γ en los correspondientes linfocitos T $\gamma\delta$ transducidos con vectores víricos 4-en-1 portadores de PTE.CD8.TCR.WPRE, de PTE.WPRE, de TPE.WPRE o de PTE.fn.WPRE en presencia de células diana, p. ej., UACC257 (Fig. 13A), U2OS (Fig. 13B), y de la estirpe celular MCF-7, que no presenta la diana (Fig. 13C).W

[000216] La Fig. 14 muestra que los linfocitos T $\gamma\delta$ procedentes del donante 4 transducidos con el vector vírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE también muestra la mejor actividad citolítica tanto contra UACC257 (cuadro superior) como contra U2OS (cuadro inferior) en comparación con los transducidos con vectores víricos 4-en-1 portadores de PTE.WPRE, de TPE.WPRE o de PTE.fn.WPRE. Las figuras 15A-15C muestran la magnitud de la secreción de IFN- γ en los correspondientes linfocitos T $\gamma\delta$ transducidos con los vectores víricos 4-en-1 portadores de PTE.CD8.TCR.WPRE, de PTE.WPRE, de TPE.WPRE o de PTE.fn.WPRE en presencia de células diana, p. ej., UACC257 (Fig. 15A), U2OS (Fig. 15B) y MCF-7 (Fig. 15C).

[000217] La Fig. 16 muestra que los linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos del donante 3 y del donante 4 que han sido transducidos con el vector vírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE da como resultado menos de 0,6 copias del vector integradas por célula, un valor similar al de los transducidos con PTE.WPRE, TPE.WPRE y PTE.fn.WPRE. Esa pequeña cantidad de copias del vector integradas por célula queda dentro del margen de seguridad exigido, esto es, menos de 5 copias del vector integradas por célula.

[000218] Las figuras 17A y 17B muestran cómo los linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos respectivamente del donante 3 y del donante 4 que han sido transducidos con el vector vírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE logran en el día 14 de fabricación unos niveles de expansión celular que son comparables a los de los que han sido transducidos con los vectores víricos 4-en-1 portadores de PTE.WPRE, de TPE.WPRE o de PTE.fn.WPRE.

[000219] Para determinar los fenotipos de memoria de los linfocitos T $\gamma\delta$, los linfocitos se tiñeron con anticuerpos anti-CD45RA marcados con alofococianina (APC)-Cy7 y con anticuerpos anti-CCR7 marcados con BV421, y después se sometieron a un análisis FACS para determinar el porcentaje de Tcm, de linfocitos T vírgenes, TemRA, y Tefectores presente en los linfocitos T $\gamma\delta$ transducidos. La Fig. 18A muestra un ejemplo de tal análisis.

[000220] La Fig. 18B muestra cómo los linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos respectivamente del donante 3 y del donante 4 que han sido transducidos con el vector vírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE logran en el día 14 de fabricación unos niveles de fenotipos de memoria que son comparables a los de los que han sido transducidos con los vectores víricos 4-en-1 portadores de PTE.WPRE, de TPE.WPRE o de PTE.fn.WPRE.

[000221] EJEMPLO 6

[000222] Comparación de los efectos que tiene la transducción con un vector vírico 4-en-1 o con dos vectores víricos 2-en-1 en la expresión de los transgenes en los linfocitos

[000223] La Fig.19 muestra que la transducción con un vector lentivírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE (120 μ l) da como resultado más linfocitos T $\gamma\delta$ CD8+TCR+ (cuadro B, 20,9 %) que la transducción con una mezcla de un vector lentivírico 2-en-1 portador de CD8.WPRE (120 μ l) con otro vector lentivírico 2-en-1 portador de R11KE.WPRE (120 μ l) (cuadro D, 15,5 %). Por otra parte, con la transducción con una mezcla de un vector lentivírico 2-en-1 portador de CD8.WPRE (120 μ l) con otro vector lentivírico 2-en-1 portador de R11KE.WPRE (120 μ l) (cuadro D, 28,3 %) se obtienen más linfocitos T $\gamma\delta$ CD8+TCR+ que con el vector lentivírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE (cuadro B, 21,2 %). De forma similar, con la transducción con un vector lentivírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE (240 μ l) se obtienen más linfocitos T $\gamma\delta$ CD8+TCR+ (cuadro C, 27,7 %) que con la transducción con una mezcla de un vector lentivírico 2-en-1 portador de CD8.WPRE (240 μ l) con otro vector lentivírico 2-en-1 portador de R11KE.WPRE (240 μ l) (cuadro E, 21,1 %). Por otra parte, con la transducción con una mezcla de un vector lentivírico 2-en-1 portador de CD8.WPRE (240 μ l) con otro vector lentivírico 2-en-1 portador de R11KE.WPRE (240 μ l) (cuadro E, 40,2 %)

se obtienen más linfocitos T $\gamma\delta$ CD8+TCR- que con el vector lentivírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE (cuadro C, 24,4 %). Como control se emplearon linfocitos T $\gamma\delta$ no transducidos (NT) (cuadro A). La tinción con dos colores se llevó a cabo con anticuerpos anti-CD8 β marcados con APC y con tetrámeros del complejo de péptido diana/MHC marcado con ficoeritrina (PE). Estos resultados indican que la transducción con un vector lentivírico 4-en-1 portador de las secuencias codificantes de CD8 $\alpha\beta$ y de TCR $\alpha\beta$, p. ej., PTE.CD8.TCR.WPRE, se puede obtener una mayor cantidad de linfocitos T CD8+TCR+ que con la transducción con una mezcla de un vector lentivírico 2-en-1 portador de las secuencias codificantes de CD8 $\alpha\beta$, p. ej., CD8.WPRE, con otro vector lentivírico 2-en-1 portador de las secuencias codificantes de TCR $\alpha\beta$, p. ej., R11KE.WPRE. Por otra parte, la transducción con una mezcla de un vector lentivírico 2-en-1 portador de las secuencias codificantes de CD8 $\alpha\beta$, p. ej., CD8.WPRE, con otro vector lentivírico 2-en-1 portador de las secuencias codificantes de TCR $\alpha\beta$, p. ej., R11KE.WPRE, se puede obtener una mayor cantidad de linfocitos T CD8+TCR- que con la transducción con un vector lentivírico 4-en-1 portador de las secuencias codificantes de CD8 $\alpha\beta$ y de TCR $\alpha\beta$, p. ej., PTE.CD8.TCR.WPRE.

[000224] La Fig. 20 muestra que con cantidades crecientes del vector vírico 4-en-1 portador de PTE.CD8.TCR.WPRE, como p. ej., 30 μ l, 120 μ l y 240 μ l, mejora la eficiencia de la transducción, pues, por ejemplo, el porcentaje de linfocitos T $\gamma\delta$ CD8+TCR+ aumenta de p. ej., el 9,6 % con 30 μ l, al 20,9 % con 120 μ l y al 27,7 % con 240 μ l. Como control se usaron linfocitos T $\gamma\delta$ no transducidos. La tinción con dos colores se llevó a cabo con anticuerpos anti-CD8 β marcados con APC y con tetrámeros del complejo de péptido diana/MHC marcado con PE.

[000225] EJEMPLO 7

[000226] Expresión de constructos 4-en-1 en linfocitos T $\alpha\beta$

[000227] Se pueden fabricar linfocitos genomodificados, incluidos linfocitos T $\alpha\beta$ genomodificados, para que expresen proteínas recombinantes, como p. ej., CD8 $\alpha\beta$ y/o TCR $\alpha\beta$, con los métodos dados a conocer en US 2019/0247433, cuyo contenido se incorpora íntegramente a la presente memoria como referencia. Por ejemplo, la Fig. 37

muestra un proceso de fabricación de linfocitos (370), el cual puede incluir el aislamiento de PBMC (371), PBMC que pueden ser empleados de inmediato o conservarse congelados hasta su uso, o pueden ser productos de leucocitaféresis, p. ej., leukopak, o bien se pueden usar como materia prima para la fabricación de los linfocitos T y la selección de poblaciones linfocíticas (p. ej., linfocitos T TCR $\alpha\beta$ +, CD8+, CD4+ o ambos); descongelación y reposo de los linfocitos hasta el día siguiente, p. ej., unas 16 horas o de unas 4 a 6 horas, (372), para dejar que las células apoptóticas mueran y restituir la funcionalidad de los linfocitos T (este paso puede no ser necesario, si se utiliza material recién extraído del donante); activación de los linfocitos (373), en la que se pueden usar anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (solubles o fijados a la superficie celular, p. ej., microperlas magnéticas o biodegradables, anticuerpos inmovilizados en recipientes de cultivo); transducción con vectores víricos que contengan secuencias codificantes de proteínas recombinantes, p.ej., polipéptidos de CD8 $\alpha\beta$ y/o TCR $\alpha\beta$ (374), vectores víricos que pueden ser lentivíricos o retrovíricos, o la transfección se puede efectuar con otros métodos no víricos; y expansión de los linfocitos, recogida y crioconservación (375), que pueden llevarse a cabo en presencia de citocina(s), p. ej., IL-7 e IL-15, suero (SAB o SFB), y/o medios de crioconservación.

[000228] Expresión de CD8 exógenos

[000229] A fin de determinar la expresión de CD8 exógenos en los linfocitos T $\alpha\beta$ transducidos con vectores víricos que contenían constructos 4-en-1 portadores de secuencias codificantes de CD8 y TCR, se transdujeron linfocitos T obtenidos del donante 5 y del donante 6 con cantidades crecientes de LV- PTE.CD8.TCR.WPRE, seguida de FACS ajustada para seleccionar Linfocitos<singlets<células vivas<población CD3+ con el fin de determinar el porcentaje de células CD8 α + entre las células CD4+. La Fig. 21 muestra que el porcentaje de linfocitos CD8 α +CD4+ procedentes del donante 5 aumenta desde 2,87 % (sin transducir) a 14,7 % (2,5 μ l/1x10⁶ células), 19,5 % (5 μ l/1x10⁶ células), 21,7 % (7,5 μ l/1x10⁶ células) y 24,1 % (10 μ l/1x10⁶ células); y que el porcentaje de linfocitos CD8 α +CD4+ procedentes del donante 6 aumenta desde 1,93 % (sin transducir) a 12,5 % (2,5 μ l/1x10⁶ células), 17,2 % (5 μ l/1x10⁶ células), 19,6 % (7,5 μ l/1x10⁶ células) y 20,8 % (10 μ l/1x10⁶ células).

[000230] Expresión de TCR exógenos

[000231] A fin de determinar la expresión de TCR exógenos en los linfocitos T $\alpha\beta$ transducidos con vectores víricos que contenían constructos 4-en-1 portadores de las secuencias codificantes del CD8 y del TCR, se transdujeron linfocitos T obtenidos del donante 5 y del donante 6 con cantidades crecientes de LV-PTE.CD8.TCR.WPRE, seguida de FACS ajustada para seleccionar Linfocitos<singletes<células vivas<CD3+<población CD4+CD8+ con el fin de detectar el porcentaje de células con dextrámeros203+ del complejo formado por el péptido diana con MHC (es decir, TCR+) entre la población de linfocitos CD4+CD8+. La Fig. 22 muestra que el porcentaje de células con dextrámeros203+ procedente del donante 5 aumenta desde 0,2 % (sin transducir) a 41,9 % (2,5 μ l/1x10⁶ células), 48,3 % (5 μ l/1x10⁶ células), 54,5 % (7,5 μ l/1x10⁶ células) y 49,5 % (10 μ l/1x10⁶ células); y que el porcentaje de células con dextrámeros203+ procedentes del donante 6 aumenta desde 0,19 % (sin transducir) a 35,5 % (2,5 μ l/1x10⁶ células), 41,2 % (5 μ l/1x10⁶ células), 44,6 % (7,5 μ l/1x10⁶ células) y 44,0 % (10 μ l/1x10⁶ células).

[000232] Para detectar la expresión de los TCR en diversas poblaciones de linfocitos T $\alpha\beta$ se analizaron linfocitos T $\alpha\beta$ que habían sido transducidos con LV- PTE.CD8.TCR.WPRE mediante FACS ajustada para seleccionar Linfocitos<singletes<células vivas<CD3+<CD4+/-CD8+/- . La Fig. 23 muestra que los porcentajes de células con dextrámeros203 (Dex203)+ (es decir, TCR+) procedentes del donante 5 (cuadro superior) y del donante 6 (cuadro inferior) son en general superiores en la población de linfocitos CD4+CD8 α + que en la población de linfocitos CD4-CD8 α +. En cambio, el porcentaje de células Dex203+ (es decir, TCR+) es mínimo en la población de linfocitos CD4+CD8 α -. De forma similar, la Fig. 24 muestra que el porcentaje de MFI emitida por los dextrámeros203 (Dex203) en el donante 5 (cuadro superior) y en el donante 6 (cuadro inferior) son en general superiores en la población de linfocitos CD4+CD8 α + que en la población de linfocitos CD4-CD8 α +. En cambio, el porcentaje de MFI emitida por los Dex203+ es mínimo en la población de linfocitos CD4+CD8 α -. Estos resultados indican que los TCR y los CD8 exógenos codificados por LV- PTE.CD8.TCR.WPRE se pueden coexpresar tanto en los linfocitos T CD4+ como en los linfocitos T CD4-.

[000233] EJEMPLO 8

[000234] Análisis funcional de los linfocitos T $\alpha\beta$ que expresan el constructo 4-en-1 o el constructo portador únicamente del TCR

[000235] La Fig. 25 muestra un diseño experimental para analizar la funcionalidad de los linfocitos T $\alpha\beta$ transducidos con un vector lentivírico (LV) portador de un constructo 4-en-1, p. ej. PTE.CD8.TCR.WPRE (LV-CD8.TCR), o portador del constructo que solo contiene el TCR, p. ej., R11KE.WPRE (LV-TCR). En suma, en el día -1 se sembraron en placas de 96 pocillos las células diana, p. ej. pertenecientes a la estirpe celular UACC257+RFP, que expresa con profusión el antígeno (control positivo), así como a la estirpe celular MCF7+GFP, que no lo expresa (control negativo). Los productos celulares procedentes de los donantes, como p. ej. PBMC (obtenidos de los donantes 5, 6, 7 y 8) y transducidos con LV-CD8.TCR (5 μ l/1x10⁶ células) o con LV-TCR (2,5 μ l/1x10⁶ células) se descongelaron y se dejaron reposar hasta el día siguiente en un dispositivo de expansión rápida G-Rex[®] de 24 pocillos permeable a los gases. El día 0 los productos celulares de los donantes (células efectoras) se cultivaron juntamente con las células diana p. ej., UACC257+RFP y MCF7+GFP, con una proporción de células efectoras y células diana (E/D) de 2:1, p. ej., 200.000 células efectoras:100.000 células diana. Al cabo de 5 horas de incubación a 37 °C se añadieron a cada pocillo 0,5 μ l de un inhibidor del transporte de proteínas, p. ej., GolgiStop[™] (BD Biosciences), y después se prosiguió la incubación a 37 °C durante 4 horas más. A continuación, las células se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron con ELISA para detectar la expresión del IFN- γ , mientras que células cosechadas se tiñeron con una batería de tinción intracelular de citocinas (ICS), p. ej. CD3, CD4, CD8, IFN- γ , granzima B y colorante vital (*live/dead*).

[000236] Población de linfocitos T CD4-CD8+

[000237] La Fig. 26 muestra que el cultivo de los linfocitos T CD4-CD8 α + obtenidos de los donantes agrupados y transducidos con LV-TCR (TCR) o con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) junto con células UACC257 que expresan con profusión la diana da como resultado un mayor porcentaje de linfocitos secretores de IFN- γ (cuadro superior) y una MFI del IFN- γ mayor (cuadro inferior) que en el caso de los linfocitos no transducidos (NT). En cambio,

cuando los linfocitos T CD4-CD8 α + que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) se cultivaron junto con la estirpe celular MCF7, que no presenta el antígeno, no se apreciaron diferencias sustanciales en el porcentaje de linfocitos secretores de IFN- γ ni en la MFI del IFN- γ entre los linfocitos transducidos y los no transducidos. La FACS se ajustó para seleccionar los linfocitos T CD4-CD8 α +IFN- γ +. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT). (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=4). Estos resultados indican que los linfocitos T CD4-CD8 α + que han sido transducidos con LV-TCR o con LV-CD8.TCR son funcionalmente activos, p. ej. porque expresan el IFN- γ , cuando entran en contacto con células diana que expresan con profusión el antígeno, p. ej. células UACC257, y que los linfocitos transducidos apenas tienen efecto en las células sin antígeno, p. ej. las células MCF7.

[000238] La Fig. 27 muestra que el cultivo de los linfocitos T CD4-CD8 α + obtenidos de los donantes agrupados y transducidos con LV-TCR (TCR) o con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) junto con células UACC257 que expresan con profusión la diana da como resultado un porcentaje superior de linfocitos secretores de granzima B (cuadro superior) y una MFI de la granzima B mayor (cuadro inferior) que en el caso de los linfocitos no transducidos (NT). En cambio, cuando los linfocitos T CD4-CD8 α + que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) se cultivaron junto con la estirpe celular MCF7, que no presenta el antígeno, no se apreciaron diferencias sustanciales en el porcentaje de linfocitos secretores de granzima B ni en la MFI de la granzima B entre los linfocitos transducidos y los no transducidos. La FACS se ajustó para seleccionar los linfocitos T CD4-CD8 α +granzima B+. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT). (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=3). Estos resultados indican que los linfocitos T CD4-CD8 α + que han sido transducidos con LV-TCR o con LV-CD8.TCR son funcionalmente activos, p. ej. porque expresan la granzima B, cuando entran en contacto con células diana que expresan con profusión el antígeno, p. ej. células UACC257, y que los linfocitos transducidos apenas tienen efecto en las células sin antígeno, p. ej. las células MCF7.

[000239] Población de linfocitos T CD4+CD8+

[000240] La Fig. 28 muestra que el cultivo de los linfocitos T CD4+CD8 α + procedentes de los donantes agrupados que han sido transducidos con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) junto con células UACC257 que expresan con profusión la diana da como resultado un porcentaje superior de linfocitos secretores de IFN- γ (cuadro superior) y una MFI del IFN- γ mayor (cuadro inferior) que en el caso de los linfocitos no transducidos (NT). En cambio, cuando los linfocitos T CD4+CD8 α + que habían sido transducidos con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) se cultivaron conjuntamente con la estirpe celular MCF7, que no presenta el antígeno, no se apreciaron diferencias sustanciales en el porcentaje de linfocitos secretores de IFN- γ ni en la MFI del IFN- γ entre los linfocitos transducidos y los no transducidos. La FACS se ajustó para seleccionar los linfocitos CD4+CD8 α -IFN- γ + entre los linfocitos no transducidos y los CD4+CD8 α -IFN- γ + entre los linfocitos transducidos con LV-CD8.TCR-. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT). (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=4). Estos resultados indican que los linfocitos T CD4+CD8 α + que han sido transducidos con LV-CD8.TCR son funcionalmente activos, p. ej. porque expresan el IFN- γ , cuando entran en contacto con células diana que expresan con profusión el antígeno, p. ej. células UACC257, y que los linfocitos transducidos apenas tienen efecto en las células sin antígeno, p. ej. las células MCF7.

[000241] La Fig. 29 muestra que el cultivo de los linfocitos T CD4+CD8 α + obtenidos de los donantes agrupados y transducidos con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) junto con células UACC257, que expresan con profusión la diana, da como resultado un porcentaje superior de linfocitos secretores de granzima B (cuadro superior) y una MFI de la granzima B mayor (cuadro inferior) que en el caso los linfocitos no transducidos (NT). En cambio, cuando los linfocitos T CD4+CD8 α + que habían sido transducidos con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) se cultivaron junto con la estirpe celular MCF7, que no presenta el antígeno, no se apreciaron diferencias sustanciales en el porcentaje de linfocitos secretores de granzima B ni en la MFI de la granzima-B entre los linfocitos transducidos y los no transducidos. La FACS se ajustó para seleccionar los linfocitos CD4+CD8 α -granzima B+ entre los linfocitos no transducidos y los CD4+CD8 α -granzima B+ entre los linfocitos transducidos con LV-CD8.TCR-. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT). (Proporción de células

efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=3). Estos resultados indican que los linfocitos T CD4+CD8 α + que han sido transducidos con LV-CD8.TCR son funcionalmente activos, p. ej. porque expresan la granzima B, cuando entran en contacto con células diana que expresan con profusión el antígeno, p. ej. células UACC257, y que los linfocitos transducidos apenas tienen efecto en las células sin antígeno, p. ej. las células MCF7.

[000242] Linfocitos T CD3+

[000243] La Fig. 30 muestra que el cultivo de los linfocitos T CD3+ obtenidos de los donantes agrupados y transducidos con LV-TCR (TCR) o con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) junto con células UACC257, que expresan con profusión la diana, da como resultado un porcentaje superior de linfocitos secretores de IFN- γ (cuadro superior) y una MFI del IFN- γ mayor (cuadro inferior) que en el caso de los linfocitos no transducidos (NT). En cambio, cuando los linfocitos T CD4-CD8 α + que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o LV-CD8.TCR (TCR+CD8) se cultivaron junto con la estirpe celular MCF7, que no presenta el antígeno, no se apreciaron diferencias sustanciales en el porcentaje de linfocitos secretores de IFN- γ ni en la MFI del IFN- γ entre los linfocitos transducidos y los no transducidos. La FACS se ajustó para seleccionar los linfocitos T CD3+. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT). (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=4). Estos resultados indican que los linfocitos T CD3+ que han sido transducidos con LV-TCR o con LV-CD8.TCR son funcionalmente activos, p. ej. porque expresan el IFN- γ , cuando entran en contacto con células diana que expresan con profusión el antígeno, p. ej. células UACC257, y que los linfocitos transducidos apenas tienen efecto en las células sin antígeno, p. ej. las células MCF7.

[000244] La Fig. 31 muestra que el cultivo de los linfocitos T CD3+ obtenidos de los donantes agrupados y transducidos con LV-TCR (TCR) o con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) junto con células UACC257, que expresan con profusión la diana, da como resultado un porcentaje mayor de linfocitos secretores de la granzima B (cuadro superior) y una MFI de la granzima B mayor (cuadro inferior) que en el caso de los linfocitos no transducidos (NT). En cambio, cuando los linfocitos T CD3+ que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o LV-CD8.TCR (TCR+CD8) se cultivaron junto con la estirpe celular MCF7, que no

presenta el antígeno, no se apreciaron diferencias sustanciales en el porcentaje de linfocitos secretores de granzima B ni en la MFI de la granzima B entre los linfocitos transducidos y los no transducidos. La FACS se ajustó para seleccionar los linfocitos T CD3+. Como control se usaron linfocitos no transducidos (NT). (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=3). Estos resultados indican que los linfocitos T CD3+ que han sido transducidos con LV-TCR o con LV-CD8.TCR son funcionalmente activos, p. ej. porque expresan la granzima B, cuando entran en contacto con células diana que expresan con profusión el antígeno, p. ej. células UACC257, y que los linfocitos transducidos apenas tienen efecto en las células sin antígeno, p. ej. las células MCF7.

[000245] La Fig. 32 muestra que el cultivo de los linfocitos T CD3+ obtenidos de los donantes agrupados y transducidos con LV-TCR (TCR) o con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) junto con células UACC257, que expresan con profusión la diana, da como resultado mayores niveles de secreción de IFN- γ que cuando no existe transducción (NT), o cuando solo están presentes las células MCF o las células UACC257. En cambio, cuando los linfocitos T CD4-CD8 α + que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) se cultivaron junto con la estirpe celular MCF7, que no presenta el antígeno, no se apreciaron diferencias sustanciales en los niveles de secreción del IFN- γ entre los linfocitos transducidos y los no transducidos. (Proporción de células efectoras y diana = 2:1; donantes agrupados, n=4). Estos resultados indican que los linfocitos T CD3+ que han sido transducidos con LV-TCR o con LV-CD8.TCR son funcionalmente activos, p. ej. porque secretan el IFN- γ , cuando entran en contacto con células diana que expresan con profusión el antígeno, p. ej. células UACC257, y que los linfocitos transducidos apenas tienen efecto en las células sin antígeno, p. ej. las células MCF7.

[000246] La Fig. 33 muestra que el cultivo de los linfocitos T CD3+ obtenidos de los donantes 5, 6, 7 y 8 que han sido transducidos con LV-TCR (TCR) o con LV-CD8.TCR (TCR+CD8) junto con células UACC257, que expresan con profusión la diana, da como resultado mayores niveles de secreción de IFN- γ que cuando no existe transducción (NT), o cuando solo están presentes las células MCF o las células UACC257. En cambio, cuando los linfocitos T CD4-CD8 α + que habían sido transducidos con LV-TCR (TCR) o LV-

CD8.TCR (TCR+CD8) se cultivaron junto con la estirpe celular MCF7, que no presenta el antígeno, no se apreciaron diferencias sustanciales en los niveles de secreción del IFN- γ entre los linfocitos transducidos y los no transducidos. (Proporción de células efectoras y diana = 2:1). Estos resultados indican que los linfocitos T CD3+ obtenidos de cada donante que han sido transducidos con LV-TCR o con LV-CD8.TCR son funcionalmente activos, p. ej. porque secretan el IFN- γ , cuando entran en contacto con células diana que expresan con profusión el antígeno, p. ej. células UACC257, y que los linfocitos transducidos apenas tienen efecto en las células sin antígeno, p. ej. las células MCF7.

[000247] EJEMPLO 9

[000248] Efectos de las estatinas sobre la expresión de los marcadores de la activación de los linfocitos T

[000249] Con el fin de determinar el efecto de las estatinas sobre la expresión de los marcadores de la activación de los linfocitos T se trató a linfocitos T con estatinas, p. ej., atorvastatina, pravastatina o rosuvastatina, y a continuación se analizó con FACS la expresión de los marcadores de la activación de los linfocitos T, como p. ej. CD25, CD69 y hLDLR.

[000250] Población de linfocitos T CD4+

[000251] La Fig. 34 muestra los porcentajes de linfocitos CD25+ (cuadro superior), de linfocitos CD69+ (cuadro intermedio) y de linfocitos hLDLR+ (cuadro inferior) entre linfocitos T CD3+CD4+ tratados con atorvastatina, pravastatina o rosuvastatina. Como controles se emplearon linfocitos preactivados, linfocitos activados sin estatina o DMSO (control) y DMSO. Estos resultados muestran que, si bien la atorvastatina, la pravastatina y la rosuvastatina apenas tienen efecto en los porcentajes de linfocitos CD4+CD25+ y de linfocitos CD4+CD69+, las estatinas, como p. ej. la atorvastatina, pueden aumentar el porcentaje de linfocitos CD4+hLDLR+. La FACS se ajustó para seleccionar Linfocitos>Singletes>viva/muerta>CD3+>CD4+.

[000252] Población de linfocitos T CD8+

[000253] La Fig. 35 muestra los porcentajes de linfocitos CD25+ (cuadro superior), de linfocitos CD69+ (cuadro intermedio) y de linfocitos hLDLR+ (cuadro inferior) entre linfocitos T CD3+CD8+ tratados con atorvastatina, pravastatina o rosuvastatina. Como controles se emplearon linfocitos preactivados, linfocitos activados sin estatina o DMSO (control) y DMSO. Estos resultados muestran que, si bien la atorvastatina, la pravastatina y la rosuvastatina apenas tienen efecto en los porcentajes de linfocitos CD8+CD25+ y de linfocitos CD8+CD69+, las estatinas, como p. ej. la atorvastatina, pueden aumentar el porcentaje de linfocitos CD8+hLDLR+. La FACS se ajustó para seleccionar Linfocitos>Singletes>viva/muerta>CD3+>CD8+.

[000254] EJEMPLO 10

[000255] Efecto del WPRE sobre los títulos de lentivirus

[000256] Con el fin de determinar el efecto del WPRE sobre los títulos de lentivirus se crearon vectores lentivíricos (LV) que contenían el WPRE natural (*wt*) (SEQ ID N.º 9) (LV-A), el WPREmut1 (SEQ ID N.º 265) (LV-C), el WPREmut2 (SEQ ID N.º 266) (LV-D) o que bien no contenían el WPRE (LV-B). A continuación se transfectaron células HEK293T con LV-A, LV-B, LV-C, o LV-D y después se determinaron los títulos con métodos conocidos en la disciplina. La Fig. 36 muestra que los títulos de esos vectores lentivíricos presentan el orden siguiente: LV-C > LV-D ≥ LV-A > LV-B. Estos resultados indican que el WPREmut1 y el WPREmut2 pueden servir para mejorar la producción de los vectores lentivíricos.

[000257] Entre las ventajas de la presente descripción se puede incluir la creación de vectores víricos que permitan coexpresar múltiples transgenes, p. ej, 4 polipéptidos, en un mismo vector, y la creación de linfocitos T γδ que coexpresen TCRαβ y CD8αβ como productos de linfocitos T seguros y de acción específica “listos para usar”, destinados a terapias celulares adoptivas.

[000258] Todas las referencias bibliográficas citadas en la presente especificación se incorporan a la presente memoria como referencia puesto que cada referencia se indica de forma específica e individual para ser incorporada como referencia. La cita de cualquier referencia responde a que se dio a conocer antes de la fecha de la solicitud y no debe

interpretarse como una admisión de que la presente descripción no tiene derecho de prioridad sobre tal referencia en virtud de una invención anterior.