

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 535**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/46** (2006.01)  
**A61K 31/366** (2006.01)  
**A61K 31/397** (2006.01)  
**A61K 31/135** (2006.01)  
**A61P 3/06** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**A61K 31/194** (2006.01)  
**C12N 9/20** (2006.01)  
**A61K 38/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2011 PCT/US2011/033699**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11133960**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2011 E 11772834 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2561069**

54 Título: **Enzima de la enfermedad de almacenamiento lisosomal**

30 Prioridad:

**13.01.2011 US 432372 P**  
**29.10.2010 US 456014 P**  
**09.09.2010 US 403011 P**  
**26.05.2010 US 396376 P**  
**23.04.2010 US 343177 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.07.2017**

73 Titular/es:

**ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**100 College Street**  
**New Haven, CT 06510, US**

72 Inventor/es:

**QUINN, ANTHONY y**  
**HARVEY, ALEX J.**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 627 535 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Enzima de la enfermedad de almacenamiento lisosomal

## 5 SOLICITUDES RELACIONADAS

10 [0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional No. 61/343.177 de los Estados Unidos, presentada el 23 de abril de 2010, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/396.376, presentada el 26 de mayo de 2010, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/403.011, presentada el 9 de setiembre del 2010, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/456.014, presentada el 29 de octubre de 2010, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/432.372, presentada el 13 de enero de 2011.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] La deficiencia de la lipasa ácida lisosomal (LAL) es una enfermedad de almacenamiento lisosomal (LSD) muy rara caracterizada por no conseguir la degradación de ésteres de colesterilo (CE) y triglicéridos (TAG) en lisosomas debido a una deficiencia de la enzima. La deficiencia de LAL se asemeja a otros trastornos de almacenamiento lisosomal con la acumulación de sustrato en un número de tejidos y tipos de células. En la deficiencia de LAL la acumulación de sustrato es más marcada en las células del sistema reticuloendotelial incluyendo las células de Kupffer en el hígado, histiocitos en el bazo y en la lámina propia del intestino delgado. Las células reticuloendoteliales expresan el receptor de manosa/N-acetilglucosamina de macrófagos (también conocido como 20 receptor de manosa de macrófagos o MMR, CD206), que media la unión, captación celular y la internalización lisosómica de proteínas con N-glicanos terminados en GlcNAc o manosa, y proporciona una vía para la potencial de corrección de la deficiencia de la enzima en estos tipos de células clave.

25 [0003] La deficiencia de LAL es una enfermedad multi-sistema que más comúnmente se manifiesta con complicaciones gastrointestinales, del hígado y complicaciones cardiovasculares y se asocia con una morbilidad y mortalidad significativas. Los efectos clínicos de la deficiencia de LAL se deben a una acumulación masiva de material lipídico en los lisosomas en un número de tejidos y una profunda perturbación de los mecanismos homeostáticos de colesterol y lípidos, incluyendo aumentos sustanciales en la síntesis de colesterol hepático. La deficiencia de LAL deficiencia presenta al menos dos fenotipos, Enfermedad de Wolman (WD) y enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo (CESD).

35 [0004] La enfermedad de Wolman es la forma más agresiva de la deficiencia de LAL. Este fenotipo se caracteriza por manifestaciones gastrointestinales y hepáticas, incluyendo la falta de crecimiento, mala absorción, esteatorrea, pérdida de peso profunda y hepatomegalia. La enfermedad de Wolman es rápidamente progresiva y fatal por lo general dentro del primer año de vida. Una revisión de casos indica que la supervivencia más allá de 12 meses de vida es muy rara para los pacientes que presentan falta de crecimiento debido a la deficiencia de LAL en el primer año de vida. En esta forma más agresiva, la falta de crecimiento es el rasgo clínico predominante y es un elemento clave para la mortalidad temprana. La afectación hepática como se evidencia por el agrandamiento del hígado y la elevación de las transaminasas es también común en los bebés. Los hallazgos físicos incluyen distensión abdominal con hepatomegalia y esplenomegalia, y el examen radiográfico revela a menudo una calcificación de las glándulas suprarrenales. Las evaluaciones de laboratorio típicamente revelan niveles elevados de las transaminasas séricas y una actividad enzimática de LAL ausente o marcadamente reducida. También se observan en los pacientes niveles elevados de colesterol y triglicéridos en sangre.

50 [0005] Las opciones actuales de tratamiento para la enfermedad de Wolman son extremadamente limitadas. Los antibióticos se administran a los niños con fiebre y/o evidencia de infección. Puede recetarse una terapia de reemplazo de esteroides para la insuficiencia suprarrenal y el soporte nutricional especializado y, aunque no hay evidencia de que estas intervenciones prevengan la muerte, no está claro en la actualidad si tienen un impacto en la supervivencia a corto plazo. En una serie de cuatro pacientes con deficiencia de LAL tratados con trasplante de médula ósea, los cuatro pacientes fallecieron debido a complicaciones del procedimiento en cuestión de meses desde el trasplante.

55 [0006] Los pacientes con deficiencia de LAL también puede presentar más tarde en la vida un hígado predominante e implicación cardiovascular y esto a menudo se llama enfermedad por almacenamiento de ésteres de colesterilo (CESD). En CESD, el hígado se ve muy afectado con hepatomegalia marcada, necrosis de los hepatocitos, la elevación de las transaminasas, la cirrosis y fibrosis. Debido a los mayores niveles de CE y TG, la hiperlipidemia y la aterosclerosis acelerada también se observan en la deficiencia de LAL. En particular, se describe una acumulación de depósitos grasos en las paredes arteriales de forma precoz en la vida. Los depósitos estrechan el lumen arterial y puede conducir a la oclusión del vaso aumentando el riesgo de eventos cardiovasculares importantes, incluyendo infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares. La presentación del CESD es muy variable con algunos pacientes sin diagnosticar hasta que complicaciones que se manifiestan en la edad adulta tardía, mientras que otros pueden tener una disfunción hepática que se presenta en la infancia. La CESD se asocia con una menor esperanza de vida y una mala salud significativa; la esperanza de vida de las personas con CESD depende de la gravedad de las complicaciones asociadas.

5 [0007] Las opciones actuales de tratamiento para el fenotipo de CESD se centran en el control de la acumulación de lípidos a través de dieta que excluye los alimentos ricos en colesterol y triglicéridos y la supresión de la síntesis de colesterol y la producción de apolipoproteína B a través de la administración de fármacos reductores del colesterol. Si bien puede observarse una cierta mejora clínica, las manifestaciones subyacentes de la enfermedad persisten y la progresión de la enfermedad persiste.

10 [0008] Las composiciones que contienen LAL recombinante humana derivada de diferentes fuentes se describen, por ejemplo, en la publicación PCT WO 2012/112681 A1 (purificada a partir de células humanas cultivadas); en la publicación de patente de Estados Unidos 2009/0297496 A1 (producida en *Pichia pastoris*); en la publicación PCT WO 01/56596 A1 (producida en *E. coli*); y en Ikeda et al., J. Biosci. Bioeng., 2004, 98 (5): 366-373 (producida en *S. pombe*). Ninguno de estos documentos da a conocer una composición que contiene LAL recombinante humana que tiene un pH dentro del intervalo reivindicado en el presente documento.

15 [0009] La producción de proteínas glicosiladas en aves transgénicas se da a conocer, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos 2010/0062982 A1 y en la publicación de patente de Estados Unidos 2009/0178147 A1. Ninguno de estos documentos da a conocer una formulación farmacéutica de una LAL recombinante humana tal como se reivindica en el presente documento.

20 [0010] En la mayoría de los casos, el tratamiento de las deficiencias de LAL requiere un tratamiento de por vida. Además, debido al alto coste de las terapias con proteínas, es deseable administrar una cantidad mínima efectiva de agente terapéutico para tratar la deficiencia de LAL. Sin embargo, hasta la fecha, no existe una terapia efectiva para el tratamiento de la deficiencia de LAL, particularmente para los pacientes que sufren de la enfermedad de Wolman y CESD. Por lo tanto, existe una fuerte necesidad de una terapia eficaz con una frecuencia minimizada de la administración con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes. También hay una necesidad de una plataforma de producción de proteína robusta y de elevada expresión que pueda producir proteínas LAL que sean estables y estén eficientemente dirigidas al compartimento lisosomal en las células de los tejidos afectados en pacientes.

#### 30 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

35 [0011] Se dan a conocer en el presente documento composiciones de LAL que son particularmente adecuadas para uso en terapia, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades asociadas con la deficiencia de LAL. Las moléculas de LAL descritas en este documento contienen estructuras de glicano particulares que proporcionan la captación eficiente y rápida en lisosomas de las células cuando se administra a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano.

40 [0012] La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas, tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

45 [0013] En una realización, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL humana en la que un porcentaje sustancial de la LAL humana contiene al menos un resto glicano de manosa-6-fosfato, que puede servir como un ligando para la internalización por el receptor de manosa-6-fosfato en la superficie de células que se encuentran, por ejemplo, en los hepatocitos. En una realización, el 30% o más, por ejemplo, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, o al menos el 99%, de la LAL contenida en la composición contiene al menos un resto de manosa-6-fosfato. El resto de manosa-6-fosfato se puede encontrar, en una estructura de N-glicano situada en uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en Asn<sup>15</sup>, Asn<sup>51</sup>, Asn<sup>80</sup>, Asn<sup>140</sup>, Asn<sup>252</sup> y Asn<sup>300</sup> de la SEQ ID NO: 2.

50 [0014] En otra realización, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL humana en las que un porcentaje sustancial de la LAL humana no contiene un resto de ácido siálico en cualquiera de sus estructuras de N-glicano, que a veces pueden interferir con la internalización de la enzima en las células. En una realización, el 15% o menos, por ejemplo, el 10% o menos, el 5% o menos, el 2%, o menos, el 1% o menos, o esencialmente ninguna, de la LAL contenida en la composición contiene un resto de ácido siálico en cualquiera de sus estructuras de N-glicano.

55 [0015] En otra realización, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL humana, en las que un porcentaje sustancial de la LAL humana no contiene un resto de fucosa en cualquiera de sus estructuras de N-glicano. En una realización, el 50% o menos, por ejemplo, el 50% o menos, el 40% o menos, el 30% o menos, el 20% o menos, el 10% o menos, el 5% o menos, el 2% o menos, el 1% o menos, o esencialmente ninguna, de la LAL contenida en la composición contiene un resto de fucosa en cualquiera de sus estructuras de N-glicano.

60 [0016] Los vectores, células huésped, sistemas de expresión y procedimientos asociados adecuados para producir las composiciones que contienen LAL se describen en este documento.

**[0017]** La LAL de la presente descripción es LAL humana. En una realización, la composición que comprende LAL incluye la LAL madura que tiene la secuencia de aminoácidos de:

SGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFPPSEEYLVETEDGYILCLNRI PHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGL  
 5 LADSSNWVTNLANS SLGFILADAGFDVWMGNSRGNTWSRKHKTL SVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPAS  
 INFILNKTGQEQVYYVGH SQGTTIGFIAFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFACTSPMAKLGRLPDH  
 LKDLFGDKEFLPQSAFLKWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTTTHSPAGTS  
 10 VQNM LHSQAVKFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSY PPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDWLADVYDVNILL  
 LTQITNLV FHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ (SEQ ID NO:2).

**[0018]** También se describe la LAL madura que tiene la secuencia de aminoácidos de:

GKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFPPSEEYLVETEDGYILCLNRI PHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGLLA  
 15 DSSNWVTNLANS SLGFILADAGFDVWMGNSRGNTWSRKHKTL SVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASIN  
 FILNKTGQEQVYYVGH SQGTTIGFIAFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFACTSPMAKLGRLPDHLI  
 20 KDLFGDKEFLPQSAFLKWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTTTHSPAGTSVQ  
 NMLHWSQAVKFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSY PPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDWLADVYDVNILLT  
 25 QITNLV FHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ (SEQ ID NO:3).

**[0019]** También se describe la LAL madura que tiene la secuencia de aminoácidos de:

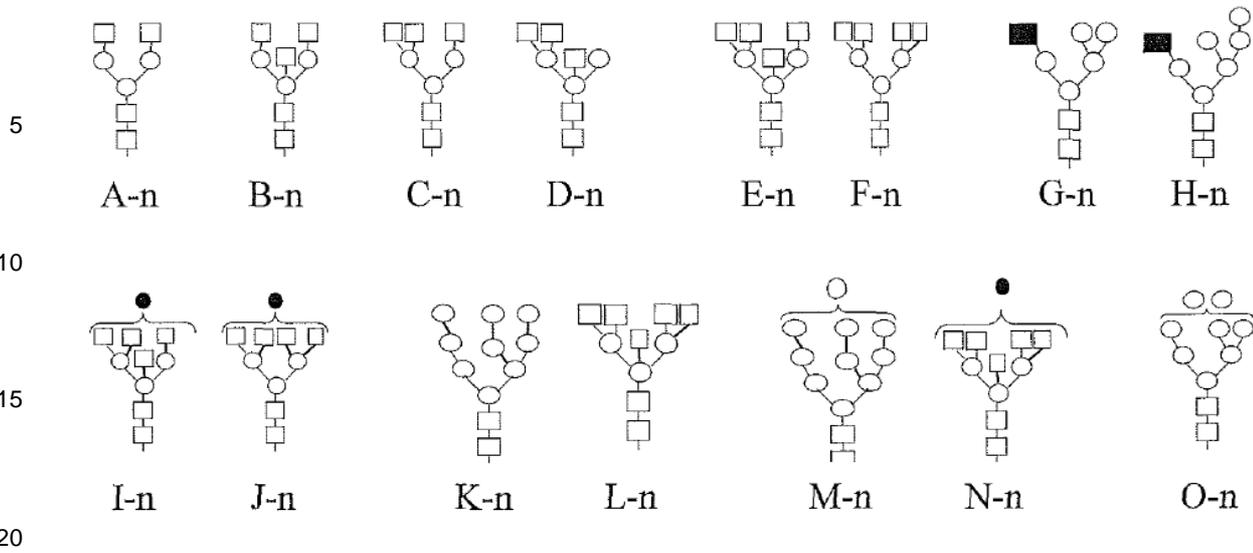
TAVDPETNMNVSEIISYWGFPPSEEYLVETEDGYILCLNRI PHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGLLADSS  
 30 NWVTNLANS SLGFILADAGFDVWMGNSRGNTWSRKHKTL SVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASIN FIL  
 NKTGQEQVYYVGH SQGTTIGFIAFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFACTSPMAKLGRLPDHLIKDL  
 FGDKEFLPQSAFLKWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTTTHSPAGTSVQNM L  
 35 HWSQAVKFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSY PPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDWLADVYDVNILLTQIT  
 NLV FHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ (SEQ ID NO:4).

**[0020]** También se describe la LAL madura que tiene la secuencia de aminoácidos de:

AVDPETNMNVSEIISYWGFPPSEEYLVETEDGYILCLNRI PHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGLLADSSN  
 40 WVTNLANS SLGFILADAGFDVWMGNSRGNTWSRKHKTL SVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASIN FILN  
 45 KTGQEQVYYVGH SQGTTIGFIAFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFACTSPMAKLGRLPDHLIKDLF  
 GDKEFLPQSAFLKWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTTTHSPAGTSVQNM L  
 50 HWSQAVKFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSY PPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDWLADVYDVNILLTQITN  
 LVF FHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ (SEQ ID NO:19).

**[0021]** En otra realización, la LAL madura es una mezcla de al menos dos polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 19.

**[0022]** La descripción también proporciona composiciones que contienen las mezclas aislados de un tipo individual de la molécula de proteína útil, tales como aquellas proteínas descritas en este documento, donde uno o más de las moléculas de proteína contenidas en la mezcla tienen una estructura de oligosacáridos específica unida, en particular una estructura de oligosacárido descrita en la presente documento. Por ejemplo, la descripción proporciona mezclas aisladas de moléculas de LAL, por ejemplo, moléculas de LAL humanas que contienen una molécula de LAL glicosilada con uno o más de las siguientes estructuras A-n a O-n:



cuadrado: N-acetil glucosamina  
 cuadrado relleno: manosa 6-fosfato  
 círculo: manosa  
 círculo relleno: galactosa  
 triángulo relleno: fucosa

**[0023]** Según un aspecto de la presente descripción, una composición comprende cualquier individuo aislado o combinación de los polipéptidos descritos anteriormente. En un caso, la composición puede ser una composición farmacéutica, por ejemplo, de una formulación que comprende además portadores farmacéuticamente aceptables, de manera que la composición es, por ejemplo, adecuada para la administración en un sujeto (por ejemplo, un ser humano, particularmente un paciente que sufre de o está diagnosticado con una enfermedad). La composición se puede administrar mediante cualquier número de vías, incluyendo por administración intravenosa. En otro ejemplo, la composición puede comprender además un segundo agente. Dicho agente puede ser un medicamento, o un agente que puede influir o modificar un proceso biológico cuando se administra en un sujeto. Por ejemplo, el segundo agente puede ser un agente inmunomodulador. Dichos agentes inmunomoduladores pueden incluir cualquier agente que, cuando se administra junto (es decir, se administra al mismo tiempo que, o poco antes o después) con cualquiera de las composiciones LAL descritas en este documento, pueden tener el efecto de reducir la inmunogenicidad de la composición de LAL en el sujeto (por ejemplo, Rituximab, o cualquier otro anticuerpo que agota las células B).

**[0024]** Los procedimientos y composiciones para el tratamiento de los síntomas asociados con la deficiencia de LAL se describen también en el presente documento.

**[0025]** Los objetos y aspectos adicionales de la presente invención serán más evidentes tras la revisión de la descripción detallada expuesta a continuación cuando se toma conjuntamente con las figuras y secuencias que se acompañan.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0026]**  
 La figura 1 representa las secuencias de aminoácidos de LAL humana. La secuencia de aminoácidos de la hLAL recombinante muestra el 100% de homología con la LAL humana natural. La forma madura de hLAL está subrayada.  
 La figura 2 representa la secuencia de nucleótidos de hLAL recombinante, el transgén rHLAL de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA.  
 La figura 3A y 3B representan diagramas de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA y su región proviral. La figura 3A representa un diagrama del vector de expresión del retrovirus de LAL humana usado en la producción de partículas de transducción (la secuencia de ADN del plásmido se encuentra en el Apéndice A). La figura 3A representa región proviral pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA que se ha integrado en el genoma. SIN LTR, repetición terminal larga autoinactivante; Potenciador DHSIII de OV, sitio III hipersensible de DNasa del gen de la ovoalbúmina; intrón de OV; región no traducida 5' y el intrón 1 de ovoalbúmina; hLAL, ADNc de LAL humana; Intrón de OV; región no traducida 3' y el intrón 1 de ovoalbúmina; gag parcial, gen de gag parcial; LTR, repetición terminal larga.  
 La figura 4 representa una secuencia de nucleótidos de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA.  
 La figura 5 representa una secuencia de nucleótidos de la región proviral de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA que se ha integrado en el genoma.

La figura 6 representa una secuencia de nucleótidos del vector pALVIN-1.1-OV-I.

La figura 7 representa una secuencia de nucleótidos del adaptador de rhLAL.

La figura 8 representa una secuencia de nucleótidos de rhLAL incluyendo el promotor de ovoalbúmina parcial.

La figura 9 representa una secuencia de nucleótidos de promotor de OVR1.

5 La figura 10 representa diagramas esquemáticos de las etapas utilizadas para construir el vector de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA.

La figura 11 representa un análisis de PCR en tiempo real de muestras de ADN de sangre de una descendencia transgénica G1 hemicigota de XLL109. Las señales procedentes de muestras de ADN duplicadas de la progenie G1 hemicigota, 1LL7466, están indicadas por las curvas que inician un aumento en Delta Rn antes del ciclo 22. Se muestran las curvas para dos progenies no transgénica; estas curvas se quedan en o cerca de la línea de base durante por lo menos 34 ciclos.

10 Las figuras 12A-D ilustran el análisis Southern de los pollos G1 que llevan el transgén ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA. La figura 12A ilustra el esquema del transgén integrado y se muestran regiones genómicas flanqueantes con la posición conocida del sitio BlnI del transgén y la posición predicha de los sitios BlnI genómicos flanqueantes. La posición de la sonda del promotor de OV y la sonda de la secuencia codificante de hLAL (sonda hLAL) se indican mediante barras negras. Se muestran las posiciones de las bandas de 4,3 kb y 10,6 kb detectadas en el análisis de Southern, así como los tamaños predichos de las porciones genómicas y de transgenes de las bandas de 4,3 kb y 10,6 kb. La figura 12B ilustra una transferencia Southern de ADN genómico digerido con BlnI y sondada con la sonda de OV. WT CTRL es ADN genómico aislado de un pollo no transgénico. Los números de ID de los transgénicos G1 se indican por encima de los carriles. La posición y el tamaño (kb) de los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la transferencia. La posición y el tamaño del fragmento de transgén detectado (4,3 kb) y gen de la ovoalbúmina endógeno (4,1 kb) se muestran a la derecha de la transferencia. La figura 12C representa una transferencia Southern que se sondó con la sonda de hLAL. La posición y el tamaño del fragmento de transgén detectado (10,6 kb) se muestran a la derecha de la transferencia. La figura 12D representa una sección de la imagen que se muestra en la figura 12B a una escala mayor para demostrar la presencia de las bandas de 4,1 y 4,3 kb.

15 La figura 13A representa un esquema del transgén ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA. También se muestra el tamaño de las bandas ApaLI previstas para ser detectadas por la sonda de OV y la sonda de hLAL. La figura 13B representa el esquema de un análisis de transferencia Southern del transgén ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA para la confirmación del tamaño del transgén. La transferencia Southern de ADN genómico se digirió con ApaLI y se sondó con la sonda de OV (panel izquierdo) o la sonda de hLAL (panel derecho). WT CTRL es ADN genómico aislado de un pollo no transgénico. El número de ID de los G1s se indica por encima de cada carril. La posición y el tamaño (kb) de los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de las transferencias. La posición y el tamaño de los fragmentos del transgén detectados (sonda de promotor de OV, 3,6 kb; sonda de hLAL, 3,8 kb) y el gen de la ovoalbúmina endógena (7,7 kb) se muestran a la derecha de las transferencias.

20 La figura 14 representa un linaje de pollos transgénicos. Se muestran para cada pollo el número de generación (G0, G1 o G2), número de identificación, sexo y fecha de puesta. Otros pollos G1 son las de otros linajes.

La figura 15 representa las etapas de purificación de hLAL de la clara de huevo.

25 La figura 16 representa N-glicanos que se encuentran como una estructura de glicosilación unida a N en LAL producida de acuerdo con la presente descripción. Cuadrado, N-acetil glucosamina; Cuadrado relleno, manosa-6-fosfato; círculo, manosa; círculo relleno, galactosa; y triángulo relleno, fucosa.

30 La figura 17 representa la posición relativa de sitios de N-glicano predichos indicados en el polipéptido LAL (flecha) expuestos en la SEQ ID NO: 1. Se muestran N-glicanos que son estructuralmente representativos de los detectados en cada sitio. Cuadrado, N-acetil glucosamina; cuadrado relleno, manosa-6-fosfato; círculo, manosa; círculo relleno, galactosa; y triángulo relleno, fucosa.

35 La figura 18 representa N-glicanos fosforilados liberados por PNGasa y analizados por MALDI-TOF. Se muestran las estructuras.

40 La figura 19 representa el efecto de la desfosforilación de LAL sobre el tiempo de retención mediante HPAEC-PAD de los N-glicanos. La LAL producida de acuerdo con la presente descripción se desfosforiló con fosfatasa alcalina bacteriana (cuadro superior) o sin tratar (panel inferior). Los N-glicanos liberados se analizaron mediante HPAEC-PAD.

45 La figura 20 representa la colocalización de LAL recombinante humana (SBC-102) y el marcador lisosomal en los lisosomas de estas células examinadas por microscopía de fluorescencia confocal utilizando un modo de rastreo secuencial.

50 La figura 21 representa la especificidad de unión de LAL recombinante humana (SBC-102) al receptor de GlcNAc/manosa evaluada mediante ensayos de unión competitiva utilizando la línea celular de macrófagos, NR8383.

La figura 22 representa la actividad de LAL recombinante humana en células normales y células deficientes de LAL *in vitro*.

55 La figura 23 representa el efecto del tratamiento con LAL recombinante humana (SBC-102) sobre la masa de órganos internos de ratas con deficiencia de LAL. El tamaño del órgano se representa como el porcentaje de peso corporal determinado a las 8 semanas de vida, en ratas LAL<sup>-b</sup> y ratas LAL<sup>+a</sup> después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 ea 5 mg/kg durante 4 semanas.

60 La figura 24 representa el peso corporal en ratas de tipo natural y ratas deficientes en LAL después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 en 5 mg/kg durante 4 semanas. La administración de la dosis se destaca en el eje X mediante diamantes a partir de 4 semanas.

La figura 25 muestra los niveles de colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos en hígado determinado a las 8 semanas de vida en ratas WT y de ratas con deficiencia de LAL después de la administración semanal de vehículo o LAL recombinante humana (SBC-102) a 5 mg/kg durante 4 semanas.

5 La figura 26 representa el aumento del porcentaje en el peso corporal en ratas deficientes de LAL después de la administración durante 4 semanas de LAL recombinante humana (SBC-102) en los niveles y programación indicados, determinado a las 8 semanas de vida.

La figura 27 muestra el peso del hígado, como el porcentaje del peso corporal, en ratas deficientes en LAL después de la administración durante 4 semanas de SBC-102 en los niveles y programación indicados, determinado a las 8 semanas de vida.

10 La figura 28 muestra los niveles de ésteres de colesterol de tejidos en ratas deficientes de LAL después de la administración durante 4 semanas de SBC-102 en los niveles y programación indicados, determinado a las 8 semanas de vida.

La figura 29 muestra el progreso diario en el aumento de peso de las ratas a las que se les administró 1 mg/kg de LAL por semana o 5 mg/kg de LAL por semana o 5 mg/kg de LAL por dos semanas.

15 La figura 30 representa el examen patológico macroscópico de los animales tratados que muestra una normalización sustancial en el tamaño y el color del hígado, tal como puede observarse en la disección en los paneles superiores, y la histopatología del tejido hepático de LAL de las ratas tratadas que muestra una histología hepática normal en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con placebo en los paneles inferiores.

20 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

25 **[0027]** Ciertas definiciones se exponen en el presente documento para ilustrar y definir el significado y alcance de los diversos términos utilizados para describir la presente invención.

30 **[0028]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aceptable" con respecto a una formulación, composición o ingrediente, tal como se usa en el presente documento, significa que no tiene efecto perjudicial persistente sobre la salud general del sujeto que está siendo tratado.

35 **[0029]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administración" o "administrar" se refiere a proporcionar una lipasa ácida lisosomal recombinante humana de la invención a un sujeto en necesidad de tratamiento.

40 **[0030]** Una "secuencia de ácido nucleico o de polinucleótido" incluye, pero no se limita a, secuencias de ARNm, ADNc, ADN genómico, y ADN y ARN sintéticos de eucariota, que comprende las bases de nucleósidos naturales adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. El término también abarca secuencias que tienen una o más bases modificadas.

45 **[0031]** El término "aviar", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier especie, subespecie o raza de organismo de la clase taxonómica ave, tales como, pero no limitado a pollo (gallina), pavo, ganso, codorniz, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y aves corredoras, incluyendo avestruz, emú y el casuario. El término incluye varias cepas conocidas de la especie Gallus gallus, o pollos, (por ejemplo, White Leghorn, Brown Leghorn, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Menorca, Amrox, California Gray), así como las cepas de pavos, faisanes, codornices, patos, avestruces y otras aves de corral criados habitualmente en cantidades comerciales. También incluye un organismo aviar individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo etapas embrionarias y fetales.

50 **[0032]** "Proteínas terapéuticas" o "proteínas farmacéuticas" incluyen una secuencia de aminoácidos que, en su totalidad o en parte, que forman un fármaco.

55 **[0033]** Una "secuencia codificante" o "marco de lectura abierto" se refiere a un polinucleótido o secuencia de ácido nucleico que puede ser transcrita y traducida (en el caso de ADN) o traducida (en el caso de ARNm) en un polipéptido in vitro o in vivo cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codon de inicio de traducción en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia de terminación de la transcripción normalmente se encuentra 3' con respecto a la secuencia codificante. Una secuencia codificante puede estar flanqueada en el extremo 5' y/o 3' por las regiones no traducidas.

60 **[0034]** "Exón" se refiere a esa parte de un gen que, cuando se transcribe en una transcripción nuclear, se "expresa" en el ARNm citoplásmico después de la eliminación de los intrones o secuencias intermedias mediante corte y empalme nuclear.

65 **[0035]** "Secuencias de control" nucleicos o "secuencias reguladoras" de ácido nucleico se refieren a secuencias promotoras, codones inicio y parada de la traducción, sitios de unión del ribosoma, señales de poliadenilación,

secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en dirección 5', potenciadores, y similares, según sea necesario y suficiente para la transcripción y traducción de una secuencia codificante determinada en una célula huésped definida. Los ejemplos de secuencias de control adecuadas para las células eucariotas son promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores. Todas estas secuencias de control no necesitan estar presentes en un vector recombinante, siempre que estén presentes las necesarias y suficientes para la transcripción y traducción del gen deseado.

**[0036]** "Unido operativamente" se refiere a la configuración de las secuencias codificantes y de control de modo que realicen la función deseada. De este modo, las secuencias de control unidas operativamente a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Una secuencia codificante está unida operativamente a, o bajo el control de, regiones reguladoras de la transcripción en una célula cuando la ADN polimerasa se une a la secuencia del promotor y transcribe la secuencia codificante en ARNm que puede traducirse en la proteína codificada. Las secuencias de control no necesitan ser contiguas con la secuencia codificante, siempre que funcionen para dirigir la expresión de la misma. De este modo, por ejemplo, las secuencias intermedias no traducidas pero transcritas pueden estar presentes entre una secuencia de promotor y la secuencia codificante y la secuencia de promotor todavía puede considerarse "unida operativamente" a la secuencia codificante.

**[0037]** Los términos "heteróloga" y "exógena" que se refieren a secuencias de ácido nucleico, tales como secuencias codificantes y secuencias de control, designan secuencias que normalmente no están asociadas con una región de una construcción recombinante o con un locus cromosómico particular y/o no están normalmente asociadas con una célula particular. Por lo tanto, una región "exógena" de una construcción de ácido nucleico es un segmento identificable de ácido nucleico dentro de o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región exógena de una construcción podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias que no se encuentran en asociación con la secuencia codificante en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificante exógena es una construcción donde la secuencia codificante en sí no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). Del mismo modo, una célula huésped transformada con una construcción o ácido nucleico que no está normalmente presente en la célula huésped sería considerada exógena para los propósitos de esta invención.

**[0038]** Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "N-glicano", "oligosacárido", "estructura de oligosacárido", "patrón de glicosilación", "perfil de glicosilación" y "estructura de glicosilación" tienen esencialmente el mismo significado y se refieren cada uno a una o más estructuras que se forman a partir de residuos de azúcar y están unidos a proteínas glicosiladas.

**[0039]** "Proteína exógena" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína no presente de forma natural en un tejido o célula particular, una proteína que es el producto de expresión de una construcción de expresión o transgén exógeno, o una proteína no presente de forma natural en una cantidad determinada en un tejido o célula particular. Una proteína que es exógena a un huevo es una proteína que normalmente no se encuentra en el huevo. Por ejemplo, una proteína exógena a un huevo puede ser una proteína que está presente en el huevo como un resultado de la expresión de una secuencia codificante presente en un transgén del animal que pone el huevo.

**[0040]** "Gen endógeno" se refiere a un gen de origen natural o fragmento del mismo que normalmente está asociado con una célula particular.

**[0041]** "LAL" significa "lipasa ácida lisosomal humana", "SBC-102" o "molécula de lipasa ácida lisosomal humana" y estos términos se utilizan indistintamente en toda la memoria.

**[0042]** Los productos de expresión descritos en este documento pueden consistir en material proteico que tiene una estructura química definida. Sin embargo, la estructura precisa depende de una serie de factores, en particular modificaciones químicas comunes a las proteínas. Por ejemplo, dado que todas las proteínas contienen grupos amino y carboxilo ionizables, la proteína se puede obtener en forma de sal ácida o básica, o en forma neutra. La secuencia de aminoácidos primaria puede derivarse usando moléculas de azúcar (glicosilación) o mediante otras derivatizaciones químicas que implican la unión covalente o iónico con, por ejemplo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares, que se producen a menudo a través de la asociación con los sacáridos. Estas modificaciones pueden producirse in vitro o in vivo, siendo este último realizado por una célula huésped a través de sistemas de procesamiento postraduccionales. Tales modificaciones pueden aumentar o disminuir la actividad biológica de la molécula, y tales moléculas modificadas químicamente también pretenden estar dentro del alcance de la invención.

**[0043]** Procedimientos alternativos de clonación, amplificación, expresión y purificación serán evidentes para el experto en la materia. Procedimientos representativos se describen en Sambrook, Fritsch, y Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

**[0044]** "Vector" significa un polinucleótido compuesto por una sola hebra, de doble hebra, circular, o ADN superenrollado o ARN. Un vector típico puede estar compuesto por los siguientes elementos unidos operativamente

a distancias apropiadas para permitir la expresión de genes funcionales: origen de replicación, promotor, potenciador, secuencia líder ARNm 5', sitio de unión ribosomal, casete de ácido nucleico, sitios de terminación y poliadenilación y secuencias de marcadores seleccionables. Uno o más de estos elementos pueden omitirse en aplicaciones específicas. El casete de ácido nucleico puede incluir un sitio de restricción para la inserción de la secuencia de ácido nucleico a expresar. En un vector funcional el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de ácido nucleico a expresar incluyendo los sitios de iniciación y terminación de la traducción. Un intrón puede estar opcionalmente incluido en la construcción, por ejemplo, 5' con respecto a la secuencia codificante. Un vector se construye de modo que la secuencia codificante particular se encuentra en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, siendo el posicionamiento y la orientación de la secuencia codificante con respecto a las secuencias de control tal que la secuencia codificante se transcribe bajo el "control" de las secuencias de control o secuencias reguladoras. La modificación de las secuencias que codifican la proteína particular de interés puede ser deseable para lograr este fin. Por ejemplo, en algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de modo que se puede unir a las secuencias control con la orientación apropiada; o mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden ligarse a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector. Alternativamente, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias control y un sitio de restricción apropiado que está en marco de lectura con y bajo el control regulador de las secuencias de control.

**[0045]** Un "promotor" es un sitio en el ADN al que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. En algunas realizaciones, el promotor puede modificarse por la adición o delección de secuencias, o reemplazarse con secuencias alternativas, incluyendo secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Muchos promotores eucariotas contienen dos tipos de secuencias de reconocimiento: la caja TATA y los elementos promotores en dirección 5'. El primero, situado en dirección 5' del sitio de iniciación de la transcripción, está implicado en dirigir la ARN polimerasa para iniciar la transcripción en el sitio correcto, mientras que el segundo aparece para determinar la velocidad de la transcripción y se encuentra en dirección 5' de la caja TATA. Los elementos potenciadores también pueden estimular la transcripción a partir de promotores unidos, pero muchos funcionan exclusivamente en un tipo de célula particular. Muchos elementos potenciador/promotor derivados de virus, por ejemplo, el promotor SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor de virus sarcoma de Rous (RSV), y el promotor de virus de la leucemia murina (MLV) son todos activos en una amplia gama de tipos de células, y se denominan "ubíquos". Alternativamente, los promotores no constitutivos, tales como el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) también se pueden usar en la presente invención. La secuencia de ácido nucleico insertada en el sitio de clonación puede tener cualquier marco de lectura abierto que codifique un polipéptido de interés, con la condición de que, cuando la secuencia codificante codifique un polipéptido de interés, debe carecer de los sitios de empalme críptico que pueden bloquear la producción de moléculas de ARNm adecuadas y/o producir moléculas de ARNm empalmadas o anormales de forma aberrante.

**[0046]** Tal como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto descrito en el presente documento con otros componentes químicos, tales como portadores, estabilizantes, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, y/o excipientes.

**[0047]** El término "derivado de aves de corral" o "derivado aviar" se refiere a una composición o sustancia producida por u obtenida de aves de corral. "Aves de corral" se refiere a aves que se pueden mantener como ganado, incluyendo, pero no limitado a, pollos (gallinas), patos, pavos, codornices y aves corredoras. Por ejemplo, "derivado de aves de corral" puede referirse a derivado de pollo (gallina), derivado de pavo y/o derivado de codorniz.

**[0048]** Una "partícula retroviral" o "partícula de transducción" se refiere a un virus de replicación defectuosa, o de replicación competente capaz de transducir el ADN o ARN no viral en una célula. En una realización particularmente útil, las partículas retrovirales utilizadas para producir aves transgénicas de acuerdo con la invención se preparan tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.524.626, concedida el 28 de abril de 2009.

**[0049]** Los términos "transformación", "transducción" y "transfección" indican todos la introducción de un polinucleótido en una célula blastodérmica aviar. "Magnum" es la parte del oviducto entre el infundíbulo y el istmo que contiene células de glándulas tubulares que sintetizan y secretan las proteínas de la clara de huevo.

**[0050]** El término "transgén" se refiere a la secuencia de nucleótidos heteróloga insertada en un genoma aviar de acuerdo con la invención. "Transgen" puede referirse específicamente a una secuencia codificante exógena, una secuencia codificante exógena ligada a un promotor exógeno u otra secuencia reguladora, toda secuencia de nucleótidos entre dos LTRs retrovirales y/o LTRs retrovirales y secuencia de nucleótidos entre las LTR, en las que las LTRs son de un retrovirus utilizado para introducir el transgén.

**[0051]** El término "optimizado" se utiliza en el contexto de "secuencia codificante optimizada", en la que los codones utilizados con más frecuencia para cada aminoácido particular que se encuentran en las proteínas de la clara de huevo ovalbúmina, lisozima, ovomucoide, y ovotransferrina se utilizan en el diseño de la secuencia de polinucleótidos de interferón- $\alpha$  2b (IFN- $\alpha$  2b) humano que se inserta en vectores de la presente invención. Más específicamente, la secuencia de ADN para IFN- $\alpha$  2b optimizado humano se basa en el uso de codones optimizados

de oviducto de gallina y se crea utilizando el programa BACKTRANSLATE del Paquete Wisconsin, Versión 9.1 (Genetics Computer Group Inc., Madison, Wis.) con una tabla de uso de codones compilada a partir de las proteínas ovalbúmina, lisozima, ovomucoide, y ovotransferrina de pollo (*Gallus gallus*). Por ejemplo, el porcentaje de uso para los cuatro codones del aminoácido alanina en las cuatro proteínas de la clara de huevo es del 34% para GCU, 31% para GCC, 26% para GCA, y 8% para GCG. Por lo tanto, se utiliza GCU como el codón para la mayoría de alaninas en una secuencia codificante optimizada. Los vectores que contienen el gen para la proteína humana optimizada se utilizan para producir aves transgénicas que expresan la proteína derivada de aves de corral transgénica en sus tejidos y huevos.

5  
10 **[0052]** Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" abarca mamíferos y no mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, chimpancés, monos simios, ganado, caballos, ovejas, cabras, cerdos; conejos, perros, gatos, ratas, ratones, cobayas, y similares.

15 **[0053]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a cualquier cantidad de un compuesto que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado un tratamiento mejorado, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal.

20 **[0054]** El término "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refiere a procedimientos para aliviar, disminuir o mejorar una enfermedad o síntomas de la afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas subyacentes de síntomas, inhibir la enfermedad o afección, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, provocar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una condición causada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección, ya sea profiláctica y/o terapéuticamente.

25 **COMPOSICIONES DE LAL**

30 **[0055]** La descripción generalmente se dirige a composiciones que comprenden enzimas útiles para la terapia, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal. En un caso, la descripción se dirige a enzimas de enfermedades de almacenamiento lisosomal, tal como LAL con un patrón de glicosilación que hace que la molécula sea susceptible de internalización por ciertos tipos de células. También se incluyen en la descripción proteínas humanas recombinantes, incluyendo LAL, en forma aislada o purificada. El aislamiento de las enzimas de la enfermedad de almacenamiento lisosomal (tal como LAL) se puede lograr mediante metodologías fácilmente evidentes para un experto en la técnica de purificación de proteínas.

35 **[0056]** En una realización, la descripción se refiere a enzimas de la enfermedad de almacenamiento lisosomal, incluyendo, pero no limitado a, LAL, que tiene un patrón de glicosilación unido a N descrita en el presente documento.

40 **[0057]** En una realización, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL humana, en las que un porcentaje sustancial de la LAL humana contienen un resto de glicano manosa-6-fosfato, que puede servir como un ligando para la internalización por el receptor de manosa-6-fosfato en la superficie de células que se encuentran, por ejemplo, en los hepatocitos. En una realización, el 30% o más, por ejemplo, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95 %, al menos 97%, o al menos 99%, de la LAL contenida en la composición contiene al menos un resto de manosa-6-fosfato. El resto de manosa-6-fosfato se puede encontrar en una estructura de N-glicano situada en uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en Asn<sup>15</sup>, Asn<sup>51</sup>, Asn<sup>80</sup>, Asn<sup>140</sup>, Asn<sup>252</sup> y Asn<sup>300</sup> de la SEQ ID NO: 2. Las estructuras de glicano que contienen restos de manosa-6-fosfato incluyen, por ejemplo, G-n y H-n que se muestran en la figura 16.

50 **[0058]** La LAL recombinante humana de acuerdo con la presente invención contiene múltiples cadenas de carbohidratos unidas a N (por ejemplo, 5 o 6 cadenas de carbohidratos). Las estructuras de glicosilación unidas a N en cada uno de los cinco o seis sitios pueden seleccionarse entre una de A-n, B-n, C-n, D-n, E-n, F-n, G-n, H-n, I-n, J-n, K-n, L-n, M-n, N-n y O-n, tal como se muestra en la figura 16.

55 **[0059]** También se describe en el presente documento una mezcla de moléculas de LAL (por ejemplo, más de una molécula LAL puede estar presente en una mezcla, tal como las moléculas de LAL establecidas en las SEQ ID NOs: 2, 3, 4 y 19) en la que algunas o todas las moléculas de LAL tienen una o más estructuras de glicosilación seleccionadas entre Estructura A-n, Estructura B-n, Estructura C-n, Estructura D-n, Estructura E-n, Estructura F-n, Estructura G-n, Estructura H-n, Estructura I-n, Estructura J-n, Estructura K-n, Estructura L-n, Estructura de M-n, Estructura de N-n y estructura O-n (Figura 16). En una realización, la mezcla de moléculas de lipasa ácida lisosomal está aislada de un huevo o está purificada o aislada de clara de huevo producida en un ave transgénica.

65 **[0060]** La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura A-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura B-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura C-n. La descripción también incluye

una molécula de LAL individual que comprende una estructura D-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura E-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura F-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura G-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura H-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura I-a. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura J-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura K-n. La descripción también incluye una molécula de lipasa ácida lisosomal individual que comprende una estructura M-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura N-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura O-n.

**[0061]** Los oligosacáridos unidos a N unidos a LAL humana de acuerdo con la presente descripción tienen una escasez de residuos de ácido siálico y galactosa terminales. Es decir, sólo cantidades menores de las estructuras de oligosacáridos unidos a N están terminalmente sialilados y pocos residuos de galactosa están presentes. Además, N-acetil glucosamina (GlcNAc) terminal está presente en gran medida en las estructuras de oligosacáridos unidos a N de la LAL descrita en el presente documento. Por tanto, la LAL producida de acuerdo con la descripción puede dirigirse a células tales como los macrófagos monocitos y células de Kupffer.

**[0062]** Una realización de la invención proporciona composiciones de LAL que esencialmente no contiene ácido siálico. En otra realización, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL recombinante humana, en las que un porcentaje sustancial de la LAL humana no contiene un resto de ácido siálico en cualquiera de sus estructuras de N-glicano, que pueden interferir con la internalización de la enzima en las células. En una realización, el 15% o menos, por ejemplo, 10% o menos, 5% o menos, 2% o menos, 1% o menos, o esencialmente ninguna, de la LAL contenida en la composición contiene un resto de ácido siálico en cualquiera de sus estructuras de N-glicano.

**[0063]** En un caso, aproximadamente el 95% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción no contienen ácido siálico. En otro caso, aproximadamente el 90% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción no contienen ácido siálico. En otro caso, aproximadamente el 80% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción no contienen ácido siálico. En otro caso, más de aproximadamente el 70% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción no contienen ácido siálico.

**[0064]** En otra realización, esencialmente ninguno de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen ácido siálico. En otra realización, aproximadamente 90% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N que se encuentran asociados con las moléculas de LAL no contienen ácido siálico. Por ejemplo, si hay 20 tipos de estructuras de oligosacárido, entonces 18 o más de los tipos de estructuras no contienen ácido siálico. En otra realización, aproximadamente el 80% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N que se encuentran asociados con las moléculas de LAL no contienen ácido siálico. En otra realización, aproximadamente el 70% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N que se encuentran asociados con las moléculas de LAL no contienen ácido siálico. En otra realización, aproximadamente el 60% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N que se encuentran asociados con las moléculas de LAL no contienen ácido siálico. En otra realización, aproximadamente el 50% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N que se encuentran asociados con las moléculas de LAL no contienen ácido siálico.

**[0065]** De acuerdo con una realización de la invención, la LAL, tal como se describe en el presente documento, contiene altos niveles de N-acetil glucosamina terminal. En un caso, aproximadamente el 95% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro caso, aproximadamente el 90% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro caso, aproximadamente el 80% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro caso, aproximadamente el 70% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro caso, aproximadamente el 60% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro caso, aproximadamente el 50% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción contienen una N-acetil glucosamina terminal.

**[0066]** En una realización, todos los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otra realización, aproximadamente el 90% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal. Por ejemplo, si hay 20 tipos de estructuras de oligosacáridos, entonces 18 o más de los tipos de estructuras no contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otra realización, aproximadamente el 80% o más de

los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otra realización, aproximadamente el 70% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otra realización, aproximadamente el 60% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otra realización, aproximadamente el 50% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal.

**[0067]** En otra realización de la invención, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL humana en la que un porcentaje sustancial de la LAL humana no contiene un resto de fucosa en cualquiera de sus estructuras de N-glicano. En una realización, el 50% o menos, por ejemplo, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos, 5% o menos, 2% o menos, el 1% o menos, o esencialmente ninguna, de la LAL contenida en la composición contiene un resto de fucosa en cualquiera de sus estructuras de N-glicano.

**[0068]** En un caso, la fucosa no está esencialmente presente en las estructuras de oligosacáridos unidos a N de la LAL producida de acuerdo de la descripción. En otro caso, aproximadamente el 95% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 90% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 85% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 80% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 70% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 60% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual de la descripción no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 50% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la LAL de la descripción no contienen fucosa.

**[0069]** En una realización, esencialmente ninguno de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen fucosa. En otra realización, aproximadamente el 95% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL no contienen fucosa. Por ejemplo, si hay 20 tipos de estructuras de oligosacárido, entonces 19 o más de los tipos de estructuras no contienen fucosa. En otra realización, aproximadamente el 90% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL no contienen fucosa. En otra realización, aproximadamente el 85% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL no contienen fucosa. En otra realización, aproximadamente el 80% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL no contienen fucosa. En otra realización, aproximadamente el 70% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en moléculas de LAL no contienen fucosa.

**[0070]** Como se discutió anteriormente, ciertos monosacáridos están abundantemente presentes en moléculas de LAL producidas de acuerdo con la presente descripción. Las especies totales de monosacáridos analizados incluyen fucosa, N-acetil galactosamina, N-acetil glucosamina, galactosa, glucosa, manosa, manosa-6-fosfato, ácido N-acetil neuramínico y ácido N-glicolil neuramínico. La fucosa puede estar presente entre aproximadamente el 0% y aproximadamente el 1% de la composición total de monosacáridos. La N-acetil galactosamina puede estar presente entre aproximadamente el 0% y aproximadamente el 1% de la composición total de monosacáridos. La N-acetil glucosamina puede estar presente entre aproximadamente el 35% y aproximadamente el 50% de la composición total de monosacáridos. La galactosa puede estar presente entre aproximadamente el 1 y el 10% de la composición total de monosacáridos. La glucosa puede estar presente en el 0% de la composición total de monosacáridos. La manosa está presente entre aproximadamente el 32% y aproximadamente el 50% de la composición total de monosacáridos. La manosa-6-fosfato está presente entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 11% de la composición total de monosacáridos.

**[0071]** En una realización, la LAL producida de acuerdo con la presente descripción no contiene ninguna xilosa. Además, debido a que esencialmente no hay N-acetilgalactosamina (GalNAc) en la LAL producida de acuerdo con la descripción, una realización de la invención incluye una composición de LAL que no tiene glicosilación con unión a O.

**[0072]** La LAL tiene 6 sitios potenciales en su secuencia de aminoácidos para la glicosilación unida a N, por ejemplo, Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>72</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup>, y Asn<sup>321</sup> como en la SEQ ID NO: 1. Cinco de ellos, Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup> están glicosilados mientras que Asn<sup>72</sup> puede estar no glicosilado o sustancialmente no glicosilado (sustancialmente no glicosilado significa en una mezcla de moléculas de LAL, menos Asn<sup>72</sup> están glicosilados que cualquiera de Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup>) (véase la Figura 17). Por consiguiente, un aspecto de la descripción es una composición de LAL que no está glicosilada y/o sustancialmente glicosilada en Asn<sup>72</sup>. La LAL que tiene una Asn<sup>72</sup> glicosilada está dentro del alcance de la descripción. Las posiciones de Asn descritas en este documento están basadas en la secuencia de aminoácidos de LAL expuesta en la SEQ ID NO: 1. Será evidente para los expertos en la técnica que la numeración de Asn (es decir, la posición de la asparagina) puede variar dependiendo de la molécula de LAL individual y puede determinarse fácilmente en otras moléculas de LAL, tales

como aquellas cuyas secuencias de aminoácidos se exponen en las SEQ ID NOs: 2, 3, 4 y 19.

**[0073]** Las moléculas de LAL producidas de acuerdo con la presente descripción contienen estructuras de N-glicano que comprenden una mezcla de estructuras bi-, tri- y tetraantenarias con N-acetilglucosamina, manosa y manosa-6-fosfato (M6P) como los principales azúcares (Figuras 16 y 17). Según un aspecto de la descripción, los N-glicanos modificados con M6P residen al menos en Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>273</sup>. De este modo, un ejemplo de la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene N-glicanos modificados con M6P que residen en cualquiera de Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup> o Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene N-glicanos modificados con M6P que residen en Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tienen N-glicanos monofosforilados (M6P) que residen en cualquiera de Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup> o Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene N-glicanos monofosforilados que residen en Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene N-glicanos monofosforilados que residen en Asn<sup>101</sup> y Asn<sup>273</sup>. En un caso específico, una LAL producida de acuerdo con la presente descripción pueden contener manosa bifosforilado (bis-M6P) en Asn<sup>101</sup>.

**[0074]** Las moléculas de LAL producidas de acuerdo con la presente descripción contienen niveles reducidos de galactosa (por ejemplo, "Gal"). Un aspecto de la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene galactosa terminal en cualquiera de Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>161</sup> o Asn<sup>321</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene galactosa terminal en Asn<sup>36</sup> y Asn<sup>161</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene galactosa terminal en Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>321</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene galactosa terminal en Asn<sup>36</sup> y Asn<sup>321</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene galactosa terminal en Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>321</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que no tiene galactosa terminal.

**[0075]** Se encontraron varios tipos de N-glicanos en LAL en diferentes sitios de glicosilación unidos a N. Las estructuras de N-glicano incluyen una mezcla de estructuras bi-, tri- y tetraantenarias con N-acetilglucosamina, manosa y manosa-6-fosfato (M6P) como los principales azúcares. Específicamente, en una realización de la presente invención, LAL contiene una estructura de N-glicano seleccionada de GlcNAc4Man3GlcNAc2 o Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2 en el primer sitio de glicosilación unido a N (Asn<sup>15</sup> como en la SEQ ID NO: 2). En otra realización, LAL no contiene ninguna glicosilación o no está sustancialmente glicosilada en el segundo sitio de glicosilación unido a N (Asn<sup>51</sup> como en la SEQ ID NO: 2). En aún otra realización, la LAL contiene Phos2Man7GlcNAc2 en su tercer sitio de glicosilación unido a N (Asn<sup>80</sup> como en la SEQ ID NO: 2). En aún otra realización, la LAL contiene una estructura de N-glicano seleccionado de Phos1Man6GlcNAc2, GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2, Man3GlcNAc2, GlcNAc2Man3GlcNAc2, GlcNAc3Man3GlcNAc2, GlcNAc4Man3GlcNAc2, o Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2 en su cuarto sitio de glicosilación unido a N (Asn<sup>140</sup> como en SEQ ID NO: 2). En aún otra realización, la LAL contiene una estructura de N-glicano seleccionado de Man7GlcNAc2, Man8GlcNAc2, Man9GlcNAc2, Phos1Man8GlcNAc2, o Phos1Man9GlcNAc2 en su quinto sitio de glicosilación unido a N (Asn<sup>252</sup> como en SEQ ID NO: 2). En aun otra realización, la LAL contiene un estructura de N-glicano seleccionado de GlcNAc2Man3GlcNAc2, GlcNAc3Man3GlcNAc2, GlcNAc4Man3GlcNAc2, Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2, GlcNAc5Man3GlcNAc2, Gal1GlcNAc5Man3GlcNAc2, GlcNAc6Man3GlcNAc2, o Gal1GlcNAc6Man3GlcNAc2 en su sexto sitio de glicosilación unido a N (Asn<sup>300</sup> como en SEQ ID NO: 2).

**[0076]** De acuerdo con ciertos aspectos de la descripción, las composiciones de LAL incluyen LAL glicosilada en Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>72</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup> de la SEQ ID NO : 1 (o los correspondientes residuos de asparagina dentro de las SEQ ID NOs: 2, 3, 4, y 19) con un N-glicano en la posición de Asn designada como se muestra a continuación:

a) en Asn<sup>36</sup>, GlcNAc4Man3GlcNAc2, o

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2;

b) en Asn<sup>72</sup>, sin glicosilación;

c) en Asn<sup>101</sup>, Phos2Man7GlcNAc2;

d) en Asn<sup>161</sup>, phos1Man6GlcNAc2,

GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2;

Man3GlcNAc2;

GlcNAc2Man3GlcNAc2;

GlcNAc3Man3GlcNAc2;

GlcNAc4Man3GlcNAc2, o

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2;

e) en Asn<sup>273</sup>, Man7GlcNAc2,

Man8GlcNAc2,

Man9GlcNAc2,

Phos1Man8GlcNAc2, o

Phos1Man9GlcNAc2; y

f) en Asn<sup>321</sup>, GlcNAc2Man3GlcNAc2,

GlcNAc3Man3GlcNAc2,

GlcNAc4Man3GlcNAc2,

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2,

GlcNAc5Man3GlcNAc2,  
Gal1GlcNAc5Man3GlcNAc2,  
GlcNAc6Man3GlcNAc2, o  
Gal1GlcNAc6Man3GlcNAc2,

5

donde Man = manosa,  
GlcNAc = N-acetil glucosamina,  
Phos = fosfato y  
Gal = galactosa.

10

**[0077]** En un caso, Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2 se puede encontrar como un componente glicano en cualquiera de Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>161</sup> o Asn<sup>321</sup> en LAL producido de acuerdo con la descripción. En un caso específico, Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2 se puede encontrar como un componente glicano de Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>321</sup>.

15

**[0078]** En la LAL de la presente descripción, Asn<sup>101</sup> y Asn<sup>273</sup> típicamente muestran del tipo manosa de contenido elevado que tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 moléculas de manosa (MAN6-MAN10 como se describe en el presente documento) como principal componente. Por consiguiente, un aspecto de la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene una estructura con alto contenido de manosa en Asn<sup>101</sup> o Asn<sup>273</sup>. En otro caso, una composición de LAL de la descripción puede comprender una estructura de N-glicano que tiene al menos 6 manosas en Asn<sup>101</sup> o Asn<sup>273</sup>. En otro caso, una composición de LAL contiene un N-glicano que tiene 7, 8 o 9 manosas en Asn<sup>101</sup> y Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene 7, 8 o 9 manosas en Asn<sup>101</sup> y/o Asn<sup>273</sup> y al menos una de las manosas está fosforilada.

20

25

**[0079]** Se ha de entender que los sitios de glicosilación y los números asociados con Asn descritos anteriormente se basan en la secuencia de aminoácidos de LAL expuesta en la SEQ ID NO: 1 y que los perfiles de glicosilación descritos anteriormente en el contexto de la SEQ ID NO: 1 se aplican también a las moléculas de LAL establecidas en las SEQ ID NOs: 2, 3, 4 y 19, aunque la numeración de las correspondientes Asn puede variar por molécula LAL. Por ejemplo, Asn<sup>36</sup> en la SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>15</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>13</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>10</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>9</sup> en la SEQ ID NO: 19. Asn<sup>72</sup> en la SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>51</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>49</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>46</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>45</sup> en SEQ ID NO: 19. Asn<sup>101</sup> en la SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>80</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>78</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>75</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>74</sup> en SEQ ID NO: 19. Asn<sup>161</sup> en la SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>140</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>138</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>135</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>134</sup> en SEQ ID NO: 19. Asn<sup>273</sup> de SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>252</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>250</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>247</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>246</sup> en SEQ ID NO: 19. Asn<sup>321</sup> de la SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>300</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>298</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>295</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>294</sup> en SEQ ID NO: 19.

30

35

40

**[0080]** En la presente invención, la LAL está glicosilada unida a N en Asn<sup>15</sup>, Asn<sup>80</sup>, Asn<sup>140</sup>, Asn<sup>252</sup> y Asn<sup>300</sup> de la SEQ ID NO: 2. En una realización, las estructuras de N-glicano de LAL de la SEQ ID NO: 2 no tienen xilosa, mientras que menos del 15%, 10%, 5%, o 1% de las estructuras de N-glicano contiene ácido siálico; menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% de las estructuras de N-glicano contienen fucosa; y al menos el 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 95% de las estructuras de N-glicano contiene manosa fosforilada (M6P).

45

50

**[0081]** En un caso, la LAL está glicosilada unida a N al menos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en Asn<sup>13</sup>, Asn<sup>49</sup>, Asn<sup>78</sup>, Asn<sup>138</sup>, Asn<sup>250</sup> y Asn<sup>298</sup> de la SEQ ID NO: 3. En otro caso, la LAL está glicosilada unida a N en Asn<sup>13</sup>, Asn<sup>78</sup>, Asn<sup>138</sup>, Asn<sup>250</sup> y Asn<sup>298</sup> de la SEQ ID NO: 3. En otro caso, las estructuras de N-glicano de LAL de la SEQ ID NO: 3 no tienen xilosa mientras que menos del 15%, 10%, 5%, o 1% de las estructuras de N-glicano contienen ácido siálico; menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% de las estructuras de N-glicano contienen fucosa; y al menos el 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 95% de las estructuras de N-glicano contienen manosa fosforilada (M6P).

55

60

**[0082]** En un caso, la LAL está glicosilada unida a N al menos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en Asn<sup>10</sup>, Asn<sup>46</sup>, Asn<sup>75</sup>, Asn<sup>135</sup>, Asn<sup>247</sup> y Asn<sup>295</sup> de la SEQ ID NO: 4. En otro caso, la LAL está glicosilada unida a N en Asn<sup>10</sup>, Asn<sup>75</sup>, Asn<sup>135</sup>, Asn<sup>247</sup> y Asn<sup>295</sup> de la SEQ ID NO: 4. En otro caso, las estructuras de N-glicano de LAL de la SEQ ID NO: 4 no tienen xilosa mientras que menos del 15%, 10%, 5%, o 1% de las estructuras de N-glicano contienen ácido siálico; menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% de las estructuras de N-glicano contienen fucosa; y al menos el 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 95% de las estructuras de N-glicano contienen manosa fosforilada (M6P).

60

65

**[0083]** En un caso, la LAL está glicosilada unida a N al menos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en Asn<sup>9</sup>, Asn<sup>45</sup>, Asn<sup>74</sup>, Asn<sup>134</sup>, Asn<sup>246</sup> y Asn<sup>294</sup> de la SEQ ID NO: 19. En otro caso, la LAL está glicosilada unida a N en Asn<sup>9</sup>, Asn<sup>74</sup>, Asn<sup>134</sup>, Asn<sup>246</sup> y Asn<sup>294</sup> de la SEQ ID NO: 19. En otro caso, las estructuras de N-glicano de LAL de la SEQ ID NO: 4 no tienen xilosa mientras que menos del 15%, 10%, 5%, o 1% de las estructuras de N-glicano contienen ácido siálico; menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% de las estructuras de N-glicano contienen fucosa; y al menos el 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 95% de las estructuras de N-glicano contienen

manosa fosforilada (M6P).

**[0084]** La composición de acuerdo con la presente invención se puede producir de un número de maneras, incluyendo mediante el uso de aves transgénicas, peces transgénicos, mamíferos transgénicos, por ejemplo, cabras transgénicas o en plantas transgénicas, tales como el tabaco y la lenteja de agua (*Lemna minor*) y ciertos tipos de cultivo celular.

**[0085]** La presente invención también contempla composiciones que comprenden LAL PEGilada. La enzima LAL como se describe en el presente documento puede estar PEGilada tal como se describe, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070092486, publicada el 26 de abril de 2007.

**[0086]** En una realización, el patrón de glicosilación derivado se obtiene a través de expresión de sistemas de expresión especializados, por ejemplo, a partir de células de oviducto aviar, por ejemplo, células de glándulas tubulares. Por ejemplo, los patrones de glicosilación descritos en este documento se ha demostrado que están presentes en las enzimas de enfermedad de almacenamiento lisosomal producidas en células de oviducto de un ave, tal como un pollo de acuerdo con la presente descripción.

**[0087]** Las proteínas producidas de acuerdo con la descripción pueden purificarse a partir de clara de huevo mediante cualquier procedimiento útil, tales como los evidentes para un experto en la técnica de purificación de proteínas. Por ejemplo, la LAL humana (hLAL) producida en aves transgénicas de acuerdo con la descripción puede purificarse a partir de clara de huevo por procedimientos evidentes para los expertos en la técnica de purificación de proteínas. Un ejemplo de un protocolo de purificación para LAL presente en la clara de huevo se describe en los Ejemplos.

**[0088]** La descripción incluye los huevos y la clara de huevo y las aves (por ejemplo, pavo, pollo (gallina) y codorniz) que ponen los huevos y producen la clara de huevo que contiene moléculas de lipasa ácida lisosomal que comprenden una o más de las estructuras de glicosilación descritas en este documento.

#### EXPRESIÓN DE LAL EN AVES

**[0089]** Se da a conocer en el presente documento vectores y procedimientos para la introducción estable de secuencias de ácido nucleico exógeno en el genoma de aves para expresar proteínas deseadas, tales como las que se benefician (por ejemplo, alcanzan una mayor eficacia) de la adición de manosa-6-fosfato, tales como enzimas lisosomales, incluyendo, sin limitación, la lipasa ácida lisosomal (LAL) y otras proteínas tales como las descritas específicamente en este documento. En particular, se producen aves transgénicas que expresan secuencias exógenas en sus oviductos y que depositan proteínas exógenas, tales como proteínas farmacéuticas, en sus huevos. Los huevos de aves que contienen tales proteínas exógenas también se describen en este documento. También se describen en este documento nuevas formas de LAL que se expresan de manera eficiente en el oviducto de aves transgénicas y se depositan en los huevos de aves.

**[0090]** Un aspecto de la descripción se refiere a composiciones que contienen LAL, es decir, moléculas LAL producidas de acuerdo con la descripción. En un ejemplo particularmente útil, la LAL está purificada o aislada. Por ejemplo, la LAL se ha extraído del contenido de un huevo con cáscara dura puesto por un ave transgénica. En un caso particularmente útil, la LAL es LAL humana. En una realización, la LAL tiene un patrón de glicosilación resultante de la producción de LAL en una célula de oviducto de un ave. Por ejemplo, las composiciones pueden contener una mezcla de moléculas de LAL producidas en aves, por ejemplo, pollos, de acuerdo con la descripción y aislados de clara de huevo. De acuerdo con la invención, las composiciones que contienen LAL son formulaciones farmacéuticas.

**[0091]** En una realización, la invención se dirige a composiciones que contienen moléculas de LAL aisladas, tal como se reivindica en el presente documento, en las que la LAL se produce en un ave que contiene un transgén que codifica la LAL. En una realización, la LAL se produce en una célula de oviducto (por ejemplo, una célula de glándula tubular) de un ave transgénica (por ejemplo, pollo transgénico) y la LAL se aísla de clara de huevo del ave transgénica. En una realización, la LAL está glicosilada en la célula del oviducto (por ejemplo, célula de la glándula tubular) del ave, por ejemplo, un pollo.

**[0092]** Se proporcionan procedimientos para producir proteínas exógenas, tales como enzimas de la enfermedad de almacenamiento lisosomal, por ejemplo, LAL, en tejidos específicos de aves. Tales proteínas exógenas se pueden expresar en el oviducto, la sangre y/o otras células y tejidos del ave. En un caso, los transgenes se introducen en células blastodérmicas embrionarias, por ejemplo, cerca de la etapa X, para producir un ave transgénica, de manera que la proteína de interés se expresa en las células de glándulas tubulares del magnum del oviducto, se secreta en el lumen y se deposita en la clara de huevo de un huevo con cáscara dura. Un ave transgénica así producida puede llevar el transgén en su línea germinal proporcionando la transmisión de un transgén exógeno a la descendencia del ave de manera estable de una manera mendeliana.

**[0093]** La presente descripción abarca procedimientos de producción de proteína exógena, tal como LAL, en un

oviducto aviar. Los procedimientos pueden incluir una primera etapa de proporcionar un vector que contiene una secuencia codificante y un promotor unido operativamente a la secuencia codificante, de modo que el promotor puede efectuar la expresión del ácido nucleico en el oviducto aviar. Se pueden producir células y/o tejidos transgénicos, en los que el vector se introduce en células blastodérmicas embrionarias aviares, ya sean recién aisladas, en cultivo, o en un embrión, de modo que la secuencia del vector se inserta en el genoma aviar. Un ave transgénico maduro que expresa la proteína exógena, tal como LAL, en su oviducto puede derivar de las células y/o tejidos transgénicos.

[0094] En un aspecto de la descripción, la producción de un ave transgénica se logra mediante la transducción de células blastodérmicas embrionarias con partículas retrovirales de replicación defectuosa o competente que portan el transgén entre las LTR 5' y 3' del vector retroviral. Por ejemplo, se pueden usar un vector retroviral del virus de la leucosis aviar (ALV) o un vector retroviral del virus de la leucemia murina (MLV), que comprende un plásmido pNLB modificado que contiene un gen exógeno que se inserta en dirección 3' de un segmento de una región del promotor. Se puede utilizar una copia de ARN del vector retroviral modificado, empaquetado en partículas virales, para infectar blastodermos embrionarios que se desarrollan en aves transgénicas.

[0095] Otro aspecto de la descripción proporciona un vector que incluye una secuencia codificante y un promotor en relación operativa y de posición de tal manera que la secuencia codificante se expresa en un oviducto aviar. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, un vector retroviral del virus de la leucosis aviar (ALV), un vector retroviral del virus de la leucemia murina (MLV) y un vector de lentivirus. Adicionalmente, el vector puede ser una secuencia de ácido nucleico que incluye una LTR de un vector retroviral del virus de la leucosis aviar (ALV), un vector retroviral del virus de la leucemia murina (MLV) o un vector de lentivirus. El promotor es suficiente para efectuar la expresión de la secuencia codificante en el oviducto aviar. La secuencia codificante codifica una proteína exógena que se deposita en la clara del huevo de un huevo con cáscara dura. Por tanto, la secuencia codificante codifica proteínas exógenas, tales como proteínas derivadas de ave de corral transgénica, tales como lipasa ácida lisosomal derivada de aves de corral transgénicas (TPD LAL).

[0096] En un caso, los vectores utilizados en los procedimientos de la invención contienen un promotor que es particularmente adecuado para la expresión de proteínas exógenas en las aves y sus huevos. Por tanto, la expresión de la secuencia codificante exógena se puede producir en el oviducto y la sangre del ave transgénica y en la clara de huevo de su huevo aviar. Los promotores incluyen, pero no se limitan a, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), un promotor de  $\beta$ -actina (por ejemplo, un promotor de  $\beta$ -actina de pollo), un promotor del virus de la leucemia murina (MLV), un promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), un promotor de la ovoalbúmina, un promotor de la lisozima, un promotor de conalbúmina, un promotor de ovomucoide, un promotor de ovomucina y un promotor de la ovotransferrina. Opcionalmente, el promotor puede ser un segmento de al menos una región de promotor, tal como un segmento de la región del promotor de ovoalbúmina, lisozima, conalbúmina, ovomucoide, ovomucina, y ovotransferrina. En un caso, el promotor es una combinación o una fusión de uno o más promotores o una fusión de una porción de uno o más promotores, tales como promotores de ovoalbúmina, lisozima, conalbúmina, ovomucoide, ovomucina, y ovotransferrina.

[0097] En un caso, el vector incluye una secuencia codificante de péptido señal que está operativamente ligada a la secuencia codificante, de modo que después de la traducción en una célula, el péptido señal dirige la secreción de la proteína exógena expresada por el vector, tal como un LAL humana, en la clara de huevo de un huevo con cáscara dura.

[0098] Un aspecto de la descripción proporciona secuencias codificantes para proteínas exógenas producidas, tal como se describe en el presente documento, en las que la secuencia codificante tiene codones optimizados para la expresión en un ave, por ejemplo, en un pollo. La optimización de codones puede determinarse a partir del uso de codones de al menos una, y preferiblemente más de una, proteína expresada en una célula aviar (por ejemplo, una célula de pollo). Por ejemplo, el uso del codón se puede determinar a partir de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas ovoalbúmina, lisozima, ovomucina y ovotransferrina del pollo. Por ejemplo, la secuencia de ADN que codifica la proteína exógena puede tener codones optimizados usando el programa BACKTRANSLATE® Wisconsin Package, versión 9.1 (Genetics Computer Group, Inc., Madison, WI) con una tabla de uso de codones compilada a partir de las proteínas de ovalbúmina, lisozima, ovomucoide, y ovotransferrina proteínas del pollo (*Gallus gallus*).

[0099] Un aspecto importante de la presente descripción se refiere a los huevos de cáscara dura de ave (por ejemplo, huevos de cáscara dura de pollo) que contienen un péptido o proteína exógenos, incluyendo, pero no limitado a, una LAL humana. El péptido o proteína exógenos, tal como LAL humana, pueden ser codificados por un transgén de un ave transgénica. A menudo, el péptido o proteína exógenos (por ejemplo, LAL) están glicosilados. La proteína puede estar presente en cualquier cantidad útil. En un caso, la proteína está presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 0,01  $\mu$ g por huevo con cáscara dura y aproximadamente 1 gramo por huevo con cáscara dura. En otro caso, la proteína está presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1  $\mu$ g por huevo con cáscara dura y aproximadamente 1 gramo por huevo con cáscara dura. Por ejemplo, la proteína puede estar presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 10  $\mu$ g por huevo con cáscara dura

y aproximadamente 1 gramo por huevo con cáscara dura (por ejemplo, un intervalo de entre aproximadamente 10 µg por huevo con cáscara dura y aproximadamente 400 miligramos por huevo con cáscara dura).

**[0100]** En un caso, la proteína exógena de la invención está presente en la clara del huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1 ng por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 0,2 gramo por mililitro de clara de huevo. Por ejemplo, la proteína puede estar presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 0,1 µg por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 0,2 gramo por mililitro de clara de huevo (por ejemplo, la proteína puede estar presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1 µg por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 100 miligramos por mililitro de clara de huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1 µg por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 50 miligramos por mililitro de clara de huevo. Por ejemplo, la proteína puede estar presente en una cantidad en un intervalo de aproximadamente 1 µg por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 10 miligramos por mililitro de clara de huevo (por ejemplo, la proteína puede estar presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1 µg por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 1 miligramo por mililitro de clara de huevo). En un caso, la proteína está presente en una cantidad de más de 0,1 µg por mililitro de clara de huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad de más de 0,5 µg por mililitro de clara de huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad de más de 1 µg por mililitro de clara de huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad de más de 1,5 µg por mililitro de clara de huevo.

**[0101]** Las aves que producen proteínas exógenas descritas en este documento (por ejemplo, LAL) que se desarrollan a partir de células blastodérmicas en las que el vector ha sido introducido son la generación G0 y se puede denominar como "progenitores". Las aves progenitoras son típicamente quiméricas para cada transgén insertado. Es decir, sólo algunas de las células del ave transgénica G0 contienen el transgén o transgenes. La generación G0 típicamente también es hemicigota para el transgén o transgenes. La generación G0 puede reproducirse con animales no transgénicos para dar lugar a la descendencia transgénica G1 que también es hemicigota para el transgén y contiene el transgén o transgenes en esencialmente todas las células del ave. La descendencia hemicigota G1 puede reproducirse con animales no transgénicos que dan lugar a la descendencia hemicigota G2 o pueden reproducirse juntos para dar lugar a la descendencia homocigota G2 para el transgén. Sustancialmente todas las células de aves que son positivas para el transgén que derivan de la descendencia G1 contienen el transgén o transgenes. En un caso, la descendencia hemicigota G2 de la misma línea puede reproducirse para producir descendencia homocigota G3 para el transgén. En un caso, los animales hemicigotos G0 o G1, por ejemplo, se reproducen juntos para dar lugar a la descendencia homocigota G1 que contiene dos copias del transgén o transgenes en cada célula del animal. Estos son meramente ejemplos de ciertos procedimientos de reproducción útiles y la presente descripción contempla el empleo de cualquier procedimiento de reproducción útil, tales como los conocidos por las personas de experiencia ordinaria en la técnica.

**[0102]** En un caso, la descripción proporciona el aislamiento de LAL. Es decir, la LAL contenida en la composición puede ser una LAL aislada. Por ejemplo, la LAL se puede aislar de la clara de huevo. La LAL aislada pueden ser moléculas de LAL que tienen una variedad de estructuras de glicosilación entre las moléculas de LAL.

**[0103]** Mediante los procedimientos de la presente descripción, los transgenes se pueden introducir en células blastodérmicas embrionarias aviares para producir un pollo transgénico, pavo transgénico, codorniz transgénica y otras especies aviares, que llevan el transgén en el material genético de su tejido de línea germinal con el fin de producir proteínas de la invención. Las células blastodérmicas son típicamente células en la etapa VII-XII, o equivalentes de las mismas, y en una realización están cerca de la etapa X.

**[0104]** Algunos vectores útiles en la realización de los procedimientos de la presente descripción se describen en este documento. En un caso, la secuencia codificante y el promotor del vector están ambos situados entre las LTR 5' y 3' antes de la introducción en células blastodérmicas. En un caso, el vector es retroviral y la secuencia codificante y el promotor están ambos situados entre las LTR 5' y 3' del vector retroviral. En un caso útil, las LTR o vector retroviral derivan del virus de la leucosis aviar (ALV), virus de la leucemia murina (MLV), o lentivirus.

**[0105]** En un ejemplo, los vectores que se utilizan para transfectar células blastodérmicas y generar la integración estable en el genoma aviar contienen una secuencia codificante y un promotor en relación operativa y posicional para expresar la secuencia codificante en la célula de la glándula tubular del magnum del oviducto aviar, en la que la proteína exógena, tal como una enzima lisosomal (por ejemplo, LAL), se deposita en la clara de huevo de un huevo con cáscara dura.

**[0106]** El promotor puede ser opcionalmente un segmento de la región del promotor de ovoalbúmina que es suficientemente grande para dirigir la expresión de la secuencia codificante en las células de glándulas tubulares. El truncamiento del promotor de ovoalbúmina y/o la condensación de los elementos reguladores críticos del promotor de ovoalbúmina, de manera que se retienen las secuencias requeridas para la expresión en las células de glándulas tubulares del magnum del oviducto, a la vez que es lo suficientemente pequeño que puede incorporarse fácilmente en vectores, se incluye dentro del alcance de la invención. En un caso, se puede usar un segmento de la región del

promotor de ovoalbúmina. Este segmento comprende la región flanqueante 5' del gen de ovoalbúmina.

5 **[0107]** El promotor también puede ser un promotor que es en gran medida, pero no completamente, específico para el magnum, tal como el promotor de lisozima. El promotor también puede ser un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV). Alternativamente, el promotor puede ser un promotor constitutivo (por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), un promotor de virus de leucemia murina (MLV), etc.). En una realización, el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de MDOT, un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), un promotor de virus de la leucemia murina (MLV), un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), un promotor de ovoalbúmina, un promotor de la lisozima, un promotor de conalbúmina, un promotor de ovomucoide, un promotor de ovomucina y/o un promotor de ovotransferrina. Opcionalmente, el promotor puede ser al menos un segmento de una región del promotor, tal como un segmento de la región del promotor de ovoalbúmina, lisozima, conalbúmina, ovomucoide, ovomucina y ovotransferrina.

15 **[0108]** En un procedimiento de transfección de células blastodérmicas, se usa un vector basado en retrovirus empaquetados para liberar el vector en células blastodérmicas embrionarias de modo que el vector se integra en el genoma aviar.

20 **[0109]** El retrovirus útil para introducir al azar un transgén en el genoma aviar es el virus de la leucosis aviar (ALV) de replicación deficiente, el virus de la leucemia murina de replicación deficiente (MLV) o el lentivirus. En un caso, se modifica un vector pNLB mediante la inserción de una región del promotor de ovoalbúmina y uno o más genes exógenos entre las repeticiones terminales largas (LTR) 5' y 3' del genoma del retrovirus. La presente divulgación contempla que cualquier secuencia codificante colocada en dirección 3' de un promotor que es activo en células de glándulas tubulares se puede expresar en las células de glándulas tubulares. Por ejemplo, el promotor de ovoalbúmina se puede expresar en las células de glándulas tubulares del magnum del oviducto porque el promotor de ovoalbúmina impulsa la expresión de la proteína ovoalbúmina y es activo en las células de glándulas tubulares del oviducto.

30 **[0110]** Cualquiera de los vectores descritos en el presente documento también puede incluir opcionalmente una secuencia codificante que codifica un péptido señal que dirige la secreción de la proteína expresada por la secuencia codificante del vector de las células de glándulas tubulares del oviducto. Este aspecto amplía eficazmente el espectro de proteínas exógenas que pueden depositarse en huevos aviares usando los procedimientos descritos en el presente documento. Cuando de ningún modo se secreta una proteína exógena, el vector que contiene la secuencia codificante se modifica para comprender una secuencia de ADN que comprende aproximadamente 60 pb que codifica un péptido señal del gen de la lisozima. La secuencia de ADN que codifica el péptido señal se inserta en el vector de tal manera que se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína codificada por el ADN.

40 **[0111]** Otro aspecto de la descripción implica el uso de elementos de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en cualquiera de los vectores de la presente invención para permitir la traducción de dos o más proteínas a partir de un ARNm dicistrónico o policistrónico. Las unidades de IRES se fusionan a los extremos 5' de una o más secuencias codificantes adicionales que a continuación se insertan en los vectores al final de la secuencia codificante original, de modo que las secuencias codificantes están separadas entre sí por un IRES.

45 **[0112]** En un caso cuando se usa un IRES, la modificación post-traduccional del producto se facilita porque una secuencia codificante puede codificar una enzima capaz de modificar el otro producto de la secuencia codificante. Por ejemplo, la primera secuencia codificante puede codificar colágeno que se hidroxilaría y se activaría por la enzima codificada por la segunda secuencia codificante en la que se emplea un IRES, tal como se entiende en la técnica.

50 **[0113]** En otro aspecto, las secuencias codificantes de los vectores utilizados en cualquiera de los procedimientos de la presente descripción están provistos de una región no traducida 3' (3' UTR) para conferir estabilidad al ARN producido. Cuando se añade 3' UTR a un vector retroviral, la orientación del promotor, gen X y la 3' UTR deben invertirse en el constructo, de modo que la adición de la 3' UTR no interfiere con la transcripción del ARN genómico de longitud completa. En una realización, la 3' UTR puede ser la de los genes de ovoalbúmina o lisozima, o cualquier 3' UTR que sea funcional en una célula de magnum, es decir, la región tardía de SV40.

60 **[0114]** En un caso, se usa un promotor constitutivo para expresar la secuencia codificante de un transgén en el ave. En este caso, la expresión no se limita al magnum; la expresión también se produce en otros tejidos dentro del ave (por ejemplo, sangre). El uso de dicho transgén, que incluye un promotor constitutivo y una secuencia codificante, es particularmente adecuado para efectuar o impulsar la expresión de una proteína en el oviducto y la posterior secreción de la proteína en el huevo.

65 **[0115]** Se producen partículas de transducción para el vector y se titulan para determinar la concentración apropiada que puede utilizarse para inyectar embriones. Los huevos de aves se enmarcan de acuerdo con el procedimiento Speksnijder (patente de Estados Unidos No. 5.897.998), y los huevos se inyectan con partículas de transducción. Los huevos eclosionan aproximadamente 21 días después de la inyección y se seleccionan las aves

macho para la reproducción. Con el fin de cribar para los gallos G0 que contienen el transgén en su esperma, el ADN se extrae de muestras de esperma de gallo. Los gallos G0 con los niveles más altos del transgén en sus muestras de esperma se emparejan con pollos no transgénicos mediante inseminación artificial. Las muestras de ADN de la sangre se criban para detectar la presencia del transgén. El suero de los gallos transgénicos se prueba para la presencia de proteína exógena. Si se confirma la proteína exógena, el esperma de los gallos transgénicos se utiliza para la inseminación artificial de los pollos no transgénicos. Un cierto porcentaje de la descendencia contiene por tanto el transgén (por ejemplo, más del 50%). Cuando la proteína exógena está presente en los huevos producidos de acuerdo con la presente descripción, la proteína puede aislarse. La proteína también puede probarse para la actividad biológica.

**[0116]** Los procedimientos de la descripción que proporcionan la producción de proteína exógena en el oviducto aviar y la producción de huevos que contienen proteína exógena implican una etapa adicional posterior para proporcionar un vector adecuado e introducir el vector en células blastodérmicas embrionarias de modo que el vector se integra en el genoma aviar. La etapa posterior implica derivar un ave transgénica madura a partir de las células blastodérmicas transgénicas producidas en las etapas anteriores. Las aves transgénicas maduras se pueden obtener a partir de las células de un embrión blastodérmico que ha sido transfectado o transducido con el vector directamente dentro del embrión. Se deja que el embrión resultante se desarrolle y que el polluelo madure.

**[0117]** El ave transgénica producida a partir de células blastodérmicas se conoce como un progenitor. Algunos progenitores llevarán el transgén en las células de glándulas tubulares en el magnum de sus oviductos. Estas aves expresarán la proteína exógena codificada por el transgén en sus oviductos. La proteína exógena también puede expresarse en otros tejidos (por ejemplo, sangre), además del oviducto. Si la proteína exógena contiene la secuencia o secuencias señal apropiadas, se secreta en el lumen del oviducto y en la clara del huevo.

**[0118]** Algunos progenitores son progenitores de la línea germinal. Un progenitor de la línea germinal es un progenitor que porta el transgén en el material genético de su tejido de línea germinal, y también puede llevar el transgén en células de las glándulas tubulares del magnum del oviducto que expresan la proteína exógena. Por lo tanto, de acuerdo con la descripción, el ave transgénica puede tener células de glándulas tubulares que expresan la proteína exógena, y la descendencia del ave transgénica también puede tener células de las glándulas tubulares del magnum del oviducto que expresan la proteína exógena. Alternativamente, la descendencia expresa un fenotipo determinado por la expresión del gen exógeno en el tejido o tejidos específicos del ave. En una realización, el ave transgénica es un pollo o un pavo.

#### COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y PROCEDIMIENTOS TERAPÉUTICOS

**[0119]** Aunque es posible que, para uso en terapia, las proteínas terapéuticas producidas, tal como se describe en el presente documento, se pueden administrar en forma sin purificar, es preferible administrar las proteínas terapéuticas como parte de una formulación farmacéutica. Por lo tanto, se proporcionan adicionalmente formulaciones farmacéuticas que comprenden proteínas terapéuticas glicosiladas derivadas de aves de corral, tales como LAL o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables de los mismos y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos y procedimientos de administración de dichas formulaciones farmacéuticas. El portador o portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos. Los procedimientos de tratamiento de un paciente (por ejemplo, cantidad de proteína farmacéutica administrada, la frecuencia de administración y la duración del período de tratamiento) utilizando composiciones farmacéuticas de la invención se pueden determinar usando metodologías estándar conocidas por los médicos expertos en la técnica.

**[0120]** Las composiciones que comprenden portadores, incluyendo moléculas de compuestos, se formulan por procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, 14a Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa.). El portador puede comprender un diluyente. En un caso, el portador farmacéutico puede ser un líquido y la LAL recombinante humana puede estar en forma de una solución. El portador farmacéutico puede ser cera, grasa o alcohol. En un caso, el portador a base de cera o grasa no contiene éster. En otro caso, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido en forma de un polvo, un polvo liofilizado, o un comprimido. En un caso, el portador puede comprender un liposoma o una microcápsula.

**[0121]** Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para la administración por inyección que incluye administración intramuscular, subcutánea e intravenosa. Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral. Las formulaciones farmacéuticas también incluyen aquellas para la administración por inhalación o insuflación. Las formulaciones, cuando sea apropiado, pueden presentarse convenientemente en unidades de dosificación discretas y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. Los procedimientos de producción de las formulaciones farmacéuticas incluyen típicamente la etapa de poner la proteína terapéutica en asociación con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y después, si es necesario, dar forma al producto en la formulación deseada.

5 [0122] Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden presentarse convenientemente como unidades discretas, tales como cápsulas, píldoras o comprimidos, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una solución; como una suspensión; o como una emulsión. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes o agentes humectantes. Los comprimidos se pueden recubrir según procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes.

15 [0123] La LAL también se puede formular para la administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo, inyección de bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes para múltiples dosis con un conservante añadido. Las proteínas terapéuticas se pueden inyectar, por ejemplo, mediante inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares, e infusiones o inyecciones intravenosas.

20 [0124] La LAL pueden tomar formas, tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación, tales como de agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. También se contempla que la proteína terapéutica puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de sólido estéril o por liofilización de la solución, para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos, antes del uso.

25 [0125] Para las infusiones o inyecciones intravenosas, la LAL producida de acuerdo de la descripción se puede formular como una suspensión o solución acuosa. Los excipientes adecuados para la formulación para infusión o inyección intravenosa pueden incluir uno de los siguientes: citrato trisódico dihidrato, ácido cítrico y albúmina de suero humano. La formulación farmacéutica también puede incluir otros excipientes adecuados bien conocidos en la técnica utilizados para otros productos para los trastornos de almacenamiento lisosomal. El pH de la LAL producida de acuerdo con la descripción se mantiene entre aproximadamente 5,6 y aproximadamente 6,2. Preferiblemente, el pH de la formulación de LAL se mantiene a  $5,9 \pm 0,2$ .

35 [0126] Para la administración tópica a la epidermis, las proteínas terapéuticas producidas de acuerdo con la descripción pueden formularse como pomadas, cremas o lociones, o como un parche transdérmico. Las pomadas y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o agentes gelificantes adecuados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y también pueden contener uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes.

40 [0127] Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas de chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un portador líquido adecuado.

45 [0128] Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal en las que el portador es un sólido se representan más preferiblemente como supositorios de dosis unitaria. Los portadores adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales usados comúnmente en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente mediante la mezcla del compuesto activo con el portador o portadores ablandados o fundidos, seguido de enfriamiento y conformación en moldes.

50 [0129] Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizadores que contienen además del principio activo, portadores, tales como los conocidos en la técnica como apropiados.

55 [0130] Para la administración intranasal las proteínas terapéuticas de la descripción pueden usarse como una pulverización líquida o polvo dispersable o en forma de gotas. Las gotas pueden formularse con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Los pulverizadores líquidos se suministran convenientemente desde envases presurizados.

60 [0131] Para la administración por inhalación, las proteínas terapéuticas de acuerdo con la descripción pueden suministrarse convenientemente desde un insuflador, nebulizador o un envase presurizado u otro medio conveniente de suministro de una pulverización de aerosol. Los envases presurizados pueden comprender un propulsor adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida.

65

**[0132]** Para la administración por inhalación o insuflación, las proteínas terapéuticas según la descripción pueden tomar la forma de una composición de polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosis unitaria en, por ejemplo, cápsulas o cartuchos o, por ejemplo, gelatina o envases tipo blister a partir de los cuales el polvo puede administrarse con la ayuda de un inhalador o insuflador.

**[0133]** Cuando se desea, se pueden emplear las formulaciones descritas anteriormente adaptadas para proporcionar el suministro sostenido del principio activo.

**[0134]** Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento también pueden contener otros principios activos, tales como agentes antimicrobianos, o conservantes.

**[0135]** Además, se contempla que las proteínas terapéuticas descritas en este documento pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, la descripción contempla procedimientos para el pretratamiento con una dosis farmacéuticamente eficaz de un antihistamínico para minimizar o evitar posibles reacciones anafilácticas relacionadas con la infusión. Por ejemplo, el antihistamínico puede ser cualquier antihistamínico farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, difenhidramina), tal como se describe en este documento y tal como se conoce en la técnica. En un caso, el antihistamínico se administra en una dosis entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal. Por ejemplo, el antihistamínico puede administrarse en una dosis de aproximadamente 5 mg por kilogramo. En un caso, se administra el antihistamínico entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 90 minutos, por ejemplo, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, antes de la administración de la lipasa ácida lisosomal utilizando un sistema ambulatorio conectado al puerto de acceso vascular. En un caso, la dosis de difenhidramina contrarresta eficazmente las posibles reacciones anafilácticas por la infusión.

**[0136]** Los inmunosupresores, tales como antihistamínicos, corticosteroides, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, metotrexato, anticuerpos dirigidos contra el receptor IL-2, anticuerpos dirigidos contra el receptor de células T, anticuerpos dirigidos contra TNF- $\alpha$  o proteínas de fusión (infiximab, etanercept o adalimumab), CTLA4-Ig (por ejemplo, abatacept), anticuerpos anti-OX-40, también se puede administrar antes, durante o después de la administración de LAL si el paciente experimenta una reacción anafiláctica o respuesta inmune adversa.

**[0137]** La descripción también contempla terapia que implica la administración de composiciones que contienen LAL en combinación con uno o más agentes reductores del colesterol (por ejemplo, inhibidores de HMG-CoA reductasa). Los ejemplos no limitantes de tales agentes incluyen: atorvastatina (Lipitor® y Torvast®), fluvastatina (Lescol®), lovastatina (Mevacor®, Altacor®, Altoprev®), pitavastatina (Livalo®, Pitava®, pravastatina (Pravachol®, Selektine®, Lipostat®), rosuvastatina (Crestor®) y simvastatina (Zocor®, Lipex®).

**[0138]** Las composiciones o proteínas descritas en este documento pueden usarse para tratar una variedad de enfermedades. Por ejemplo, hay enfermedades para las que se conocen terapias de tratamiento por los profesionales expertos en la técnica. La presente descripción contempla que las proteínas terapéuticas (por ejemplo, LAL) producidas en un sistema aviar que contiene un patrón de glicosilación derivado de aves de corral se pueden emplear para el tratamiento de dichas enfermedades. Es decir, también se contempla el tratamiento de enfermedades conocidas por ser tratables por proteínas terapéuticas producidas convencionalmente mediante el uso de proteínas terapéuticas producidas, tal como se describe en este documento. Por ejemplo, la LAL producida, tal como se describe en el presente documento, se puede usar para tratar enfermedades resultantes de o asociadas con la deficiencia o insuficiencia de LAL (colectivamente, "deficiencia de LAL"), tales como enfermedad de Wolman enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol (CESD). Tal como se describe en el presente documento, la deficiencia de LAL también contempla enfermedades en las que la expresión de LAL se reduce debido a una condición (por ejemplo, una mutación genética), factores fisiológicos o ambientales que conducen a una reducción o deficiencia de LAL producida en el cuerpo. La LAL producida, tal como se describe en el presente documento, también se puede utilizar para tratar otras enfermedades, tales como la aterosclerosis, la enfermedad del hígado graso, la enfermedad de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y la cirrosis. La LAL producida, tal como se describe en el presente documento, también se puede utilizar para tratar otras enfermedades, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 6.849.257, concedida el 1 de febrero de 2005, publicación de Estados Unidos N° 2009/0297496, publicada el 3 de diciembre de 2009; publicación de Estados Unidos N° 2004/0223960, publicada el 11 de noviembre de 2004; y la publicación de Estados Unidos N° 2007/0264249, publicada el 15 de noviembre de 2009.

**[0139]** También se contempla que la LAL producida, tal como se describe en el presente documento, puede usarse para tratar ciertas enfermedades específicas, incluyendo pancreatitis, por ejemplo, pancreatitis crónica y/o pancreatitis aguda, así como la lesión pancreática inducida por el alcohol, tal como pancreatitis inducida por alcohol.

**[0140]** La LAL producida por cualquier procedimiento útil, tales como los descritos en este documento, se contempla para su uso para tratar enfermedades debidas a la lesión celular inducida por alcohol, incluyendo, pero no limitado a, aquellas lesiones celulares inducidas por alcohol que dan lugar a la acumulación de ésteres de lípidos en tejido corporal, tales como, pero no limitado a, hígado, bazo, intestino y el tejido cardiovascular. La descripción también

contempla el tratamiento de la mala absorción mediante la administración de LAL.

**[0141]** Un aspecto de la descripción está dirigido a procedimientos de tratamiento de un paciente que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende LAL recombinante humana, tal como se describe en este documento. El paciente puede estar sufriendo o ser diagnosticado con cualquier cantidad de enfermedades, incluyendo las asociadas con la deficiencia de LAL. En un caso, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que aumenta el recuento de glóbulos rojos en un paciente en una cantidad deseada. Se contempla que la LAL producida de acuerdo con la descripción se puede utilizar para tratar la enfermedad renal crónica, por ejemplo, donde los tejidos no consiguen mantener la producción de la lipasa ácida lisosomal.

**[0142]** También se contempla que la LAL producida mediante cualquier procedimiento útil puede ser útil para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Tangier y hipoalfalipoproteinemia familiar. La enfermedad de Tangier/hipoalfalipoproteinemia familiar se asocia con la acumulación de ésteres de colesterol en los macrófagos acompañada por hepatoesplenomegalia y/o linfadenopatía junto con bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) que se pueden tratar mediante la administración de LAL. Por ejemplo, sin desear limitar la descripción a ninguna teoría o mecanismo de operación particular, se cree que la alteración de la actividad LAL disminuye la expresión de ABCA1 y por el contrario una actividad de LAL aumentada obtenida mediante la administración de LAL a un paciente con la enfermedad de Tangier/hipoalfalipoproteinemia familiar aumentará la expresión de ABCA1 para superar los efectos de un gen de ABCA1 con una actividad funcional reducida como resultado del polimorfismo.

**[0143]** Para el tratamiento de una enfermedad, en general, la dosificación administrada puede variar dependiendo de factores conocidos, tales como la edad, la salud y peso del receptor, tipo de tratamiento simultáneo, frecuencia del tratamiento, y similares. Por lo general, una dosificación de principio activo puede ser de entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 10 miligramos por kilogramo de peso corporal. La dosificación precisa, la frecuencia de administración y período de tiempo de tratamiento se pueden determinar por un médico experto en la técnica de la administración de la respectiva proteína terapéutica.

**[0144]** Además, se ha descubierto que las dosis de 1 mg/kg y menores pueden ser eficaces en el tratamiento de deficiencias de LAL. La presente descripción proporciona procedimientos de tratamiento de enfermedades que comprenden administrar a un mamífero (por ejemplo un paciente, preferiblemente un paciente humano) una dosis terapéuticamente eficaz de la lipasa ácida lisosomal entre una vez cada 5 días y una vez cada 25 días, por ejemplo, entre una vez cada 7 días y una vez cada 14 días. En un caso, la dosis de la lipasa ácida lisosomal administrada es entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, por ejemplo, la dosis puede estar entre aproximadamente 1 mg y 5 mg por kilogramo.

**[0145]** En un caso particularmente útil, la descripción proporciona procedimientos de tratamiento de una enfermedad mediante la administración de una dosis de la lipasa ácida lisosomal de entre aproximadamente 0,1 mg y 1,0 mg por kilogramo de peso corporal de acuerdo con cualquier régimen de dosificación terapéuticamente eficaz, tal como los descritos en este documento.

**[0146]** La descripción proporciona procedimientos para el tratamiento de cualquier complicación de la deficiencia de LAL que puede beneficiarse de la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de LAL. En un caso, la mala absorción y la falta de crecimiento pueden ser tratadas de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento. En otro caso, las complicaciones observadas en pacientes con deficiencia de LAL incluyendo, pero no restringidos a, hepatomegalia y disfunción hepática pueden tratarse utilizando los procedimientos proporcionados en este documento.

**[0147]** La descripción proporciona el tratamiento con LAL recombinante (por ejemplo, LAL recombinante humana) que puede producirse mediante cualquier sistema de expresión de proteína útil, por ejemplo, mamíferos y aves transgénicos tal como se entiende en la técnica. Otros sistemas de expresión de proteínas pueden incluir, pero no se limitan a, el cultivo de células, bacterias y sistemas de plantas.

**[0148]** La descripción abarca la administración de LAL recombinante como parte de una composición farmacéuticamente aceptable mediante cualquier vía que pueda lograr el efecto terapéutico deseado, según se determina por un médico experto en la técnica. En un caso, la LAL se puede administrar por infusión intravenosa durante un período de aproximadamente cinco horas. Por ejemplo, la infusión puede facilitarse mediante una bomba de infusión ambulatoria conectada a un puerto de acceso vascular (por ejemplo, un Port-a-Cath).

**[0149]** La descripción también incluye el seguimiento de la presentación clínica y patológica de las enfermedades, por ejemplo, enfermedad de Wolman y CESD, en el mamífero (por ejemplo, el paciente humano). En un caso, las evaluaciones consisten en, pero no se limitan a: el análisis de lípidos, radiografía de tórax, pruebas de función hepática, gráfico de las heces, ácido mevalónico en plasma, inmunogenicidad, lipasa ácida lisosomal en plasma, quitotriosidasa, PARC, hipertensión portal, antropometría, volumen y caracterización del hígado, el bazo y el tracto gastrointestinal utilizando, por ejemplo, la tecnología de imágenes. Por ejemplo, la tecnología de imágenes mencionada anteriormente puede consistir en ultrasonidos, imágenes por resonancia magnética y espectroscopía de

resonancia magnética nuclear.

## **EJEMPLOS**

5 **[0150]** La presente invención se ejemplifica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no pretenden, ni deben ser interpretados como limitantes de la invención de ninguna manera.

### **Ejemplo 1**

10 **Construcción del vector (pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA) que contiene la secuencia codificante de lipasa ácida lisosomal recombinante humana (rhLAL)**

15 **[0151]** La secuencia de nucleótidos del gen de hLAL en el vector pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA codifica una proteína que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína producida por el gen de la lipasa ácida lisosomal humana (GenBank Acceso, NP\_000226) (Figura 1). La transcripción de esta secuencia y la posterior traducción del ARNm resultante produce una proteína precursora de 399 aminoácidos, que se procesa a una proteína madura de 378 aminoácidos idéntica a LAL humana (GenBank Acceso, NP\_000226) (Figura 1), tal como se establece en la SEQ ID NO: 1. La expresión del gen de hLAL (véase la Figura 2 para la secuencia de ADNc) en este ejemplo está controlada por elementos no codificantes derivados del gen de la ovoalbúmina, incluyendo potenciador, promotor, intrón y secuencias no traducidas 5' y 3'. El gen de la ovoalbúmina produce ovoalbúmina, el constituyente principal de proteína de la clara de huevo. La actividad del promotor de ovoalbúmina de pollo es muy específica para las células dentro del oviducto de pollo que producen la clara de huevo; la expresión en otros tejidos es mínima.

25 **[0152]** El vector plásmido pALVIN-OVR1-I-hLAL-DSA (Figura 3A; la secuencia de nucleótidos de la que se muestra en la figura 4) se utilizó para producir un retrovirus de replicación deficiente (RDR), que de forma estable integró el transgén de hLAL en el genoma del progenitor (XLL109). Este vector plásmido incluye secuencias de nucleótidos retrovirales requeridos para el empaquetamiento del ARN viral, la transcripción inversa y la integración, pero no contiene las secuencias intactas de los genes virales gag, pol y env. Los procedimientos utilizados para generar el vector retroviral y su uso en los procedimientos posteriores de transgénesis se describen en este documento.

30 **[0153]** La porción retroviral de pALVIN-OVR1-I-hLAL-DSA se basa en el vector de ALV, pNLB. pNLB se modificó de tal manera que las LTR serían autoinactivantes (SIN) (Figura 3B). Para lograr esto, se han suprimido 273 pb de la 3' LTR, que incluye el potenciador y la caja CAAT de la región U3. Debido a que la región U3 inactivada en el extremo 3' de la secuencia retroviral sirve como plantilla para una nueva región U3 presente en el extremo 5' de un provirus integrado, 5' LTR está también normalmente inactivada. La delección de las secuencias LTR en el constructo SIN disminuye la interferencia del promotor en el promotor interno de la LTR, y minimiza la posibilidad de recombinación de secuencias para formar un retrovirus de replicación competente. El nuevo vector se denomina pALVIN para el vector de inactivación de ALV.

40 **[0154]** En dirección 3' de la LTR 5' están las secuencias codificantes de *gag* y *env*, que se acumularon a partir del vector pNLB. En pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA, permanece una pequeña porción (12%) de la secuencia de precursor de la proteína de *gag* (55% de la secuencia del péptido maduro p19) y permanece una pequeña porción (1,7%) de la secuencia de precursor de *env* de RAV2 (GenBank Acceso, AF033808). Estas regiones *gag* y *env* truncadas son incapaces de producir proteínas funcionales necesarias para crear retrovirus competentes de replicación (Cosset, 1991).

50 **[0155]** Los elementos de control de la transcripción y traducción del gen de la ovoalbúmina de pollo fueron insertados en pALVIN para crear pALVIN-OV-1.1-I (secuencia de la cual se muestra en la figura; SEQ ID NO: 8). La primera sección de pALVIN-OV-1.1-I se compone de una sección contigua del gen de ovoalbúmina de pollo que incluye la región de 1,1 kb del promotor proximal, el primer exón, el primer intrón y parte del 2º exón. La siguiente sección es un fragmento de inserto de relleno que ocupa el lugar de las secuencias codificantes de la proteína ovoalbúmina. El relleno va seguido por la región no traducida 3' (UTR) del gen de ovoalbúmina de pollo, que incluye secuencias que facilitan el procesamiento adecuado del ARNm, incluyendo la poliadenilación. En general, el fragmento de relleno está sustituido por fragmentos de ADN que codifican la proteína deseada, en este caso hLAL. El resultado es un vector que tiene elementos específicos que promueven la expresión regulada de la transcripción y la traducción de un ARNm en el oviducto de pollos transgénicos, que mimetizan la regulación del ARNm de ovoalbúmina endógeno, y que permiten una expresión elevada de la proteína de interés en la clara de huevo.

60 **[0156]** El vector pALVIN-OV-1.1-I incluye el primer intrón del gen de la ovoalbúmina. Debido a que el intrón es susceptible de corte y empalme durante la producción y el empaquetamiento del genoma de ARN retroviral, se insertó el casete de expresión en la orientación opuesta con respecto a las LTR. De esta manera, el intrón no es reconocible en el ARN retroviral y se empaqueta sin empalme. Para mayor comodidad todos los mapas de este documento se dibujan con las LTR en la orientación opuesta y el casete de expresión en la orientación hacia delante o a favor de las agujas del reloj.

65

[0157] pALVIN-OV-1.1-I es el vector de base en el cual se insertó el secuencia codificante (CDS) de hLAL. Se sintetizaron dos fragmentos de ADN, adaptador de hLAL y Syn hLAL, que componen las CDS de hLAL y secuencias necesarias para la compatibilidad con pALVIN-OV-1.1-I, en Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, (véanse las figuras 7 y 8; SEQ ID NOs: 9 y 10). Se insertaron un fragmento HpaI/BamHI de adaptador de hLAL de 229 pb y un fragmento BamHI/BstBI de Syn hLAL de 1113 pb en el fragmento HpaI/BstBI 7882 de pALVIN-OV-1.1-I, reemplazando de este modo la región de relleno por las CDS de hLAL y creando pALVIN-OV-1.1-I-hLAL.

[0158] Se descubrió que había un sitio de empalme críptico en la cadena antisentido de las CDS de hLAL que impidió el empaquetamiento de ARN retroviral intacto. El sitio de empalme críptico se eliminó mediante alteración de la secuencia de ADN sin cambiar la secuencia de aminoácidos de hLAL. Este cambio se realizó por amplificación en cadena de polimerasa de la región de 232 a 534 de pALVIN-OV-1.1-I-hLAL con el cebador 5'-AGAAACTGAGAGTGTCTTAT-3' (SEQ ID NO: 12) y el cebador 5'-TGACAGCTGTGGATCCAGAAACAAACATG-3' (SEQ ID NO: 13), creando un amplicón de 329 pb. Este amplicón se digirió con BamHI y SexAI y se ligó con el fragmento de 8940 pb BamHI/SexAI de pALVIN-OV-1.1-I-hLAL para crear pALVIN-OV-1.1-I-hLAL-dSA.

[0159] Se insertó un potencial potenciador promotor que contiene sitio III hipersensible a DNasa (DHSIII) del gen de ovoalbúmina de pollo (-3,819 a -2169 en relación al sitio de inicio del promotor de OV) (Kaye, Bellard et al. 1984) en pALVIN-OV-1.1-I-hLAL-dSA para crear pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA. Esto se realizó de la siguiente manera: un fragmento de ADN que incluía el promotor de DHSIII y promotor de OV proximal de 1,1 kb denominado promotor de OVR1 (ver la figura 9; y SEQ ID NO: 11 para la secuencia) se aisló por digestión con XhoI y BlnI. Para facilitar la subclonación, un fragmento adaptador, PCR de pSIN-OV-1.1-1 se generó mediante amplificación por PCR de la región de 6752 a 7974 de pALVIN-OV-1.1-I con los cebadores 5'-GCCGCTCGAGCGAGGAATATAAAAAAATT-3' (SEQ ID NO: 14) y 5'-TCCGCGCACATTTCCCGAA-3' (SEQ ID NO: 15) seguido por digestión con NgoMI y XhoI. El fragmento de 2772 pb XhoI/BlnI de promotor de OVR1 y el fragmento de 1067 pb NgoMI/XhoI de PCR de pSIN-OV-1.1-I se insertaron en el fragmento de 7043 pb NgoMI/BlnI de pALVIN-OV-1.1-I-hLAL-dSA, creando de este modo pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA (véase la figura 10 para los esquemas de construcción de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA). La construcción del segmento de vector retroviral del vector, indicado como pALVIN (akapAVIJCR-A395.22.3.1-KM o Palv-SIN), se describe en la solicitud de Patente de Estados Unidos 2008/0064862.

[0160] Además, se incluye la producción de LAL de acuerdo con la descripción utilizando un promotor y/o vector descritos en la publicación de patente US No. 2008/0064862, publicada el 13 de marzo, 2008.

### **Ejemplo 2**

#### **Producción de partículas virales**

[0161] El macho transgénico progenitor G0, XLL109, que lleva el transgén de hLAL en su genoma, se creó utilizando un procedimiento de transgénesis retroviral tal como se indica a continuación. Las partículas virales de replicación defectuosa que llevan el vector pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA se produjeron por transfección transitoria de una línea celular de fibroblastos de pollo inmortalizada. Estas células de fibroblastos de pollo se transfectaron simultáneamente con tres plásmidos, pALVIN-OVR1-I-hLAL-sSA, pCMV-gag-pol y pCMV-VSV-G. pCMV-gag-pol expresa los genes *gag* y *pol* de la cepa de RAV1 del virus de la leucosis aviar. pCMV-VSV-G expresa la proteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular. Cuatro horas después de la transfección, el medio se reemplazó por DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. El medio se recolectó a las 48 horas después de la transfección, se filtró a través de un filtro de 0,45 micras (Millipore) y se concentró por ultracentrifugación. El retrovirus concentrados que llevaba el transgén ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA se recogió y se utilizó en la transducción de embriones en etapa temprana. Cabe indicar que "p" es la notación para la forma de plásmido de vector, la "p" está ausente de las designaciones de transgenes una vez que el transgén está en la forma de vector empaquetado o transgén integrado.

### **Ejemplo 3**

#### **Transgénesis de embriones**

[0162] La integración del casete de expresión ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA en el genoma de un embrión se consiguió mediante la transducción de embriones en etapa temprana (Speksnijder y Ivarie, 2000). Se obtuvieron huevos White Leghorn fertilizados recién puestos de una colonia para crianza. Se realizó una abertura en la cáscara para proporcionar acceso al embrión. Se inyectaron siete microlitros de partículas de retrovirus concentradas de replicación deficiente que llevaban el casete de expresión ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA descrito anteriormente en la cavidad subgerminal del embrión. Los huevos se sellaron con pegamento caliente, y a continuación se incubaron y eclosionaron en condiciones estándar. A las prole producidas a partir de estas inyecciones se les dieron marcadores de identificación individuales en la eclosión para la identificación y la trazabilidad. Las muestras de sangre de la prole fueron positivas en el transgén cuando se analizaron por PCR de tiempo real para el transgén de hLAL usando cebadores de PCR específicos para la secuencia codificante de hLAL (tal como se describe a continuación). Esto proporcionó una indicación de que el procedimiento de transgénesis se había realizado correctamente. El ensayo de PCR de tiempo real para el transgén de hLAL utiliza química Taqman® (Applied

Biosystems). Los cebadores directo e inverso fueron 5'-ACGACTGGCTTGCAGATGTCT-3' (SEQ ID NO: 16) y 5'-CCCCAATGAAGTCAAGATGCT-3' (SEQ ID NO: 17), respectivamente. La secuencia de la sonda Taqman® fue 5'-CCGGAATGCTCTCATGGAACACCAA-3' (SEQ ID NO: 18) y se marcó con FAM (como el emisor) en el extremo 5' y Iowa Black (como el inactivador) en el extremo 3'. Los cebadores, sonda y 1 µl de ADN extraído se añadieron a 30 µl de Taqman® Universal Master Mix (Applied Biosystems). Las reacciones de control incluían varias diluciones de un plásmido que llevaba la secuencia de hLAL y el ADN de los pollos de tipo natural (datos no mostrados). Se utilizaron parámetros de ciclación estándar en un sistema de PCR de tiempo real Applied Biosystems 7500.

#### **Ejemplo 4**

##### **Identificación del progenitor G0**

[0163] Se recogió el semen de machos sexualmente maduros y se extrajo el ADN y se ensayó usando el ensayo de PCR de tiempo real de hLAL. El número de copias del transgén en cada muestra se calculó utilizando patrones conocidos (un plásmido que lleva el gen de hLAL) mezclados con ADN de semen de control negativo. El contenido de ADN del casete del transgén en XLL109 macho fue a un nivel que permitía la transmisión del transgén a su progenie, según lo estimado por PCR de tiempo real. Este macho XLL109 fue el progenitor transgénico G0 y fue criado con pollos no transgénicos para generar pollos transgénicos hemicigotos G1.

#### **Ejemplo 5**

##### **Propagación y caracterización de aves G1 hemicigotas**

[0164] Se analizó la progenie engendrada por el progenitor transgénico XLL109 por la presencia del transgén en el ADN de células de sangre usando el ensayo de PCR de tiempo real de hLAL. La sangre se recogió de progenie de 1-2 semanas de vida y se extrajo ADN utilizando una técnica de alto rendimiento (Harvey et al., 2002). Las soluciones de ADN no fueron cuantificadas antes del ensayo Taqman para facilitar el cribado de alto rendimiento. Habitualmente 1 µl de solución de ADN contiene de 50 a 400 ng de ADN que es suficiente para generar una señal de amplificación positiva. Se analizaron un total de 1.322 polluelos engendrados por XLL109 y se obtuvo sangre de nuevo de la progenie positiva y se analizó para confirmación. Según los resultados de la PCR, 22 de la progenie fueron positivos para el transgén ALVIN-OVR1-I-hLAL-DSA. Un ejemplo de los resultados Taqman se muestra en la Figura 11.

#### **Ejemplo 6**

##### **Identificación y caracterización de la línea de alta expresión**

[0165] Uno de los pollos G1, 1LL7466, puso huevos con niveles significativamente más altos de proteína rhLAL en la clara de huevo, en comparación a los otros pollos G1. Se realizó un análisis de transferencia Southern en 1LL7466 y machos G1 hermanos para identificar qué machos hermanos tenían el mismo sitio de integración que el pollo de alta expresión. Se llevaron a cabo digestiones con una enzima de restricción que cortaba sólo una vez dentro del transgén (BlnI), y las transferencias de Southern se sondaron con un segmento del promotor de la ovoalbúmina o la secuencia codificante de hLAL (Figuras. 12A-D). La posición del 2º sitio de restricción, que reside en la región genómica flanqueante, varía dependiendo del sitio de integración. De este modo, el tamaño de la banda BlnI detectada por la sonda de OV o sonda de hLAL es único para cada línea generada.

[0166] La sonda de OV detectó una sola banda de 4,1 kb en el ADN digerido con BlnI de los pollos de tipo natural, lo que correspondía al tamaño esperado de un segmento BlnI dentro del gen de la ovoalbúmina endógena del genoma de pollo (figuras 12B y 12D). Se detectó una segunda banda de 4,3 kb con el pollo 1LL7466, que correspondía a la banda transgén. Tres hermanos hembra adicionales, 1LL10409, 1LL10686 y 1LL12058 y tres hermanos varones adicionales, 1LL8922, 1LL9330 y 1LL11217, mostraron la banda de 4,3 kb, lo que indica que estos hermanos podrían ser de la misma línea (Figuras 12B y 12D).

[0167] Como se esperaba la sonda de hLAL no detectó una banda en el ADN de los pollos de tipo natural, ya que la secuencia de ADN del gen de la lipasa ácida lisosomal de pollo y la secuencia codificante de la lipasa ácida lisosomal recombinante humana están suficientemente diferenciadas para no permitir la hibridación bajo las condiciones usadas en estos ensayos Southern (Figura 12C). La sonda hLAL detectó una única banda de ~ 10,6 kb en el ADN genómico digerido con BlnI de los mismos pollos que dieron positivo para la banda de 4,3 kb detectada por la sonda de OV, lo que indica que estos 7 pollos G1 tienen el mismo sitio de integración y por lo tanto son de la misma línea.

[0168] No se detectaron otras bandas, lo que indica que 1LL7466, 1LL10409, 1LL10686, 1LL12058, 1LL8922, 1LL9330 y 1LL11217 todas tenían un único sitio de integración.

[0169] El análisis Southern indicó también que el transgén se integraba, ya que las bandas detectadas por las sondas de VO y hLAL eran de diferentes tamaños y de mayor tamaño que la del transgén solo. En la figura 12A se

muestra un mapa que muestra la estructura predicha del transgén integrado y la posición de los sitios BlnI en las regiones genómicas flanqueantes.

5 [0170] Para confirmar que el transgén está intacto, se realizaron dos etapas. En primer lugar, la secuencia codificante de hLAL se aisló por PCR a partir de 1LL7466. Los productos de PCR se secuenciaron en ambas cadenas desde el codón de inicio hasta el codón de parada de hLAL. La secuencia de ADN era exactamente como se esperaba, lo que indica que no hay cambios en la secuencia de ADN de las regiones de codificación en el transgén. En segundo lugar, el análisis de transferencia Southern se llevó a cabo usando la enzima de restricción  
10 ApaLI, que digiere el transgén intacto en 2 segmentos, 3,6 y 3,8 kb (Figura 13A). Se detectaron las bandas de 3,6 y 3,8 kb en el ADN genómico digerido con ApaLI de GIs, lo que indica que el transgén se integró en una forma totalmente intacta (Figura 13B).

### Ejemplo 7

#### 15 **Propagación y caracterización de G2**

[0171] La figura 14 muestra el linaje de los G2 de hLAL descendientes de un único progenitor G0, XLL109. En la fase G1, el transgén se caracterizó con respecto al número de copia, la integridad, la secuencia hLAL y el sitio de integración - y se identificaron y caracterizaron siete transgénicos G1 (cuatro pollos y tres gallos). La propagación de  
20 los G2 se logró mediante inseminación artificial de los pollos no transgénicos con esperma recogida de los progenitores G1 1LL8922, 1LL9330 y 1LL11217 (Figura 14). Cada pollo inseminado, sus huevos y posterior descendencia fueron alojados por separado de la otra progenie. La progenie eclosionada se analizó por la presencia del transgén de hLAL usando el ensayo de PCT de tiempo real de hLAL. Debido a que los progenitores G1 eran hemocigotos con respecto al transgén, se esperaba que la mitad de la progenie fueran G2 transgénicos. De 610  
25 progenies de G2 analizados hasta la fecha, 330 o el 54% eran transgénicas.

### Ejemplo 8

#### 30 **Análisis genético de las hLAL aviar**

[0172] Después de la identificación de cada pollo G2 mediante el ensayo de PCR de tiempo real de hLAL del ADN de la sangre, la línea de producción se somete a los siguientes ensayos genéticos: el gen de hLAL se amplificó por PCR a partir del ADN de la sangre y se secuenció para confirmar el 100% de homología con la secuencia humana; el sitio de integración del transgén fue confirmado por PCR del sitio de integración, tal como se describió  
35 anteriormente. La secuenciación por PCR y el análisis del sitio de integración se realizó en: cada pollo en una línea de producción <10 pollos; 10% de los pollos (mínimo 10) para la línea de producción 11-100 pollos; 5% de los pollos (mínimo 10) para la línea de producción de 101-1000s; 1% de los pollos (mínimo 50) para la línea de producción de 1001-10000 pollos; 0,1% de los pollos (mínimo 100) para la línea de producción > 10001 pollos. Los registros detallados se mantuvieron en cada etapa de la fase de crecimiento y producción.

### Ejemplo 9

#### 40 **Purificación de hLAL de clara de huevo**

45 [0173] Se solubilizó clara de huevo (EW) que contenía LAL a pH 6 durante la noche y se clarificaron a través de centrifugación (o filtración en profundidad) con una filtración a 0,2 um. La EW se ajustó con tampón NaOAc 1M (pH 4) a pH 6.

50 [0174] La EW clarificada se cargó en una columna de fenil-HIC (EW:tamaño de columna = 2:1) equilibrada con tampón fosfato 20 mM/NaCl 137 mM (pH 6). Después de la finalización de la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio y tampón de fosfato 5 mM (pH 6). La LAL se eluyó con propilenglicol al 30% con tampón Tris 5 mM (pH 7,2).

55 [0175] La fracción de LAL eluida se ajustó a pH 5 con ácido 1 M y a continuación se cargó en una columna GigaCap S (EW:sitio de columna = 10:1). La columna se equilibró con tampón de NaOAc 50 mM (pH 5). Después de la finalización de la carga, la columna se lavó con el tampón de equilibrio. La LAL se eluyó con NaOAc50 mM/NaCl 60 mM (pH 5).

60 [0176] La fracción de LAL de la columna de GigaCap S se ajustó a pH 6 con tampón Tris 1 M y a continuación se cargó en una columna Butil-HIC (EW:tamaño de columna = 10:1). La columna se equilibró con tampón fosfato 20 mM/NaCl 137 mM (pH 6). Después de la finalización de la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio y tampón de fosfato 5 mM (pH 6). La LAL pura se eluyó con propilenglicol al 50% con tampón Tris 5 mM (pH 7,2). La figura 15 representa las etapas de purificación de hLAL de la clara de huevo.

### 65 Ejemplo 10

**Análisis de carbohidratos de hLAL derivada de ave transgénica**

[0177] Se determinaron las estructuras de oligosacáridos se determinaron para LAL humana derivada de ave mediante el empleo de las siguientes técnicas de análisis que son bien conocidas por los técnicos en la materia.

[0178] Se digirieron doscientos microgramos con tripsina y quimotripsina durante 18 h a 37°C en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, que contenía CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Los productos de digestión se enriquecieron y se liberaron de contaminantes mediante una columna de cartucho C18 Sep-Pak. Después del enriquecimiento, los glicopéptidos se digirieron con 2 µl de PNGasa F (7,5 unidad/ml) en 50 µl de tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5, durante 18 horas a 37°C. Los oligosacáridos liberados se separaron del péptido y la enzima mediante el paso a través de una columna de cartucho C18 Sep-Pak.

[0179] La fracción de glicano se disolvió en dimetilsulfóxido y a continuación se permitió basándose en el procedimiento de Anumula y Taylor (Anumula y Taylor, 1992). La reacción se inactivó por adición de agua y se extrajeron carbohidratos per-O-metilados con diclorometano. Los glicanos per-O-metilados se secaron bajo una corriente de nitrógeno.

[0180] Se llevó a cabo MALDI/TOF-MS (desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo) en el modo de ión positivo reflector usando ácido α-dihidroxibenzoico (DHBA, solución de 20 mg/ml en 50% de metanol:agua) como una matriz. Todos los espectros se obtuvieron usando un Microflex LRF (Bruker).

[0181] Se realizaron un análisis MALDI-TOF-MS y ESI MS/MS (espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray) en los oligosacáridos tras la liberación de la cadena principal del péptido y la purificación tal como se entiende en la técnica. Las muestras de las especies de polisacáridos individuales también se digirieron con ciertas enzimas y los productos de digestión se analizaron por HPLC tal como se entiende en la técnica.

[0182] Se cree que existen aproximadamente seis sitios de glicosilación unidos a N presentes en la LAL humana. Véase, Zschenker, et al (2005) J. Biochem., Vol 137, pág. 387-394. Esta referencia también indica que puede haber un sitio de glicosilación unido a O en la LAL humana. Las estructuras de oligosacáridos unidos a N identificados se muestran en la figura 16.

[0183] Los datos revelaron que muchas o todas estas estructuras se encontraban como una estructura de glicosilación unida a N en LAL producida de acuerdo con la descripción (Figura 16). Por ejemplo, A-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, O-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, al menos uno de B-n, C-n y D-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, al menos uno de E-n y F-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, al menos uno de I-n y J-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, al menos uno de K-n y L-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, al menos uno de M-n y N-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, G-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, H-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción.

**Ejemplo 11****Especies de N-glicano de LAL derivada de ave transgénica**

[0184] Se dializaron muestras purificadas de hLAL derivada de ave transgénica (600 µg/muestra) utilizando un tubo-O-dializador (membrana de corte de 4,0 kDa; G BioSciences) contra agua nanopura a 4°C durante aproximadamente 24 horas para eliminar sales y otros contaminantes. El agua nanopura fue reemplazada cuatro veces durante todo el período diálisis.

[0185] Después de la diálisis, cada una de las muestras se dividió en tres alícuotas: ~ 1/4 del peso de la muestra para el análisis de azúcares neutros y amino, ~ 1/4 del peso de la muestra para el análisis de manosa-6-fosfato, y ~ 1/2 del peso de la muestra para el perfil de oligosacárido. La alícuota destinada al análisis de azúcares neutros y amino se hidrolizó con ácido trifluoroacético (TFA) 2 N a 100°C durante 4 horas y la alícuota para el análisis de manosa-6-fosfato se hidrolizó con TFA 6,75 N a 100°C durante 1,5 horas. Los hidrolizados se secaron a continuación bajo N<sub>2</sub>, se redisolviaron con 50 µl de H<sub>2</sub>O, se sonicaron durante 7 min en hielo y se transfirieron a un vial de inyección. Sin embargo, las muestras de azúcar neutros y amino se diluyeron 2 veces porque los picos producidos a partir de los hidrolizados disueltos originalmente eran demasiado grandes.

[0186] Se hidrolizó una mezcla de patrones para azúcares neutros y amino, y para manosa-6-fosfato con un número conocido de moles de la misma manera y al mismo tiempo que la muestra. Se prepararon cuatro concentraciones de la mezcla de patrones de azúcar neutro y amino (Fuc y GalNAc, 0,2, 0,4, 0,8, y 1,6 nmoles por 10 µl; GlcNAc, 0,5, 1,0, 2,0, y 4,0 nmoles por 10 µl; Gal y Man, 0,3, 0,6, 1,2, y 2,4 nmoles por 10 µl; y Glc, 0,1, 0,2, 0,4, y 0,8 nmoles por 10 µl) y manosa-6-fosfato (640, 1280, 2560, 5120 picomoles por 10 µl) para establecer una ecuación de

calibración. El número de moles de cada azúcar en la muestra se cuantificó mediante interpolación lineal a partir de la ecuación de calibración.

5 **[0187]** Los azúcares neutros y amino y manosa-6-fosfato se analizaron mediante HPAEC usando un sistema Dionex ICS3000 equipado con una bomba de gradiente, un detector electroquímico y un muestreador automático. Los azúcares neutros y amino individuales, y la manosa-6-fosfato se separaron mediante una columna analítica Dionex CarboPac PA20 (3 x 150 mm) con un atrapador de amino. Los programas de gradiente utilizaron eluyentes A, agua nanopura desgasificada y B, NaOH 200 mM para azúcares neutros y amino, y C, NaOH 100 mM y D, acetato de sodio 1 M en NaOH 100 mM para manosa-6-fosfato. Se realizó una inyección (10 µl/inyección) cada 40 minutos para la determinación del azúcar neutro y amino y cada 35 minutos para la determinación de la manosa-6-fosfato. Todos los procedimientos se basaron en los protocolos descritos por Hardy y Townsend (Hardy, M.R., y Townsend; R.R. "High-pH anion-exchange chromatography of glycoprotein-derived carbohydrates", 1994, Methods Enzymol 230: 208-225). El control de los instrumentos y la adquisición de datos se realizaron utilizando el software Chromeleon Dionex. Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación. La muestra de control es ovomucoide purificado a partir de EW.

**Tabla 1. Composición de monosacáridos de control y LAL mediante HPAEC**

Muestra ID	Analito	nanomoles	nanomoles/µg	moles %
Control	Fucosa	nd	-	-
	N-acetil galactosamina	5,066	0,020	9,6
	N-acetil glucosamina	26,947	0,108	51,4
	Galactosa	3,876	0,016	7,4
	Glucosa	nd	-	-
	Manosa	16,565	0,066	31,6
	Manosa-6-fosfato	nd	-	-
	ácido N-acetil neuramínico	ndm	-	-
	ácido N-glicolil neuramínico	ndm	-	-
	hLAL derivada de ave transgénica	Fucosa	nd	-
N-acetil galactosamina		nd	-	-
N-acetil glucosamina		17,932	0,120	37,6
Galactosa		0,879	0,006	1,8
Glucosa		nd	-	-
Manosa		23,290	0,155	48,8
Manosa-6-fosfato		5,642	0,038	11,8
ácido N-acetil neuramínico		ndm	-	-
ácido N-glicolil neuramínico		ndm	-	-

nd = no detectado; ndm = no determinado

## 20 Características estructurales de LAL

25 **[0188]** LAL tiene 6 sitios potenciales en su secuencia de aminoácidos para la N-glicosilación, Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>72</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup>. Se encontró que cinco de ellos, Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup> estaban glicosilados, mientras que Asn<sup>72</sup> no estaba glicosilado o sustancialmente glicosilado (sustancialmente no glicosilado significa en una mezcla de moléculas de LAL, menos Asn<sup>72</sup> están glicosilados que cualquiera de Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup>). Por consiguiente, un aspecto de la descripción es LAL (por ejemplo, LAL humana), que no está glicosilada y/o sustancialmente glicosilado en Asn<sup>72</sup>, y la producción y el uso de dicha LAL. Sin embargo, LAL que tiene una Asn<sup>72</sup> glicosilada está dentro del alcance de la descripción. Las estructuras de N-glicano consisten principalmente en una mezcla de estructuras biantenarias, triantenarias y tetraantenarias con N-acetilglucosamina, manosa y manosa-6-fosfato (M6P) como los principales azúcares. Cada sitio parece tener un conjunto favorecido de estructuras (Tabla 2 y Figura 17), que es un aspecto de la descripción. Por ejemplo, N-glicanos modificados con M6P residen al menos en Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>273</sup>. Las estructuras no fosforiladas son típicas de N-glicanos que se encuentran en las proteínas endógenas de clara de huevo. No se detectaron glicanos unidos por O tal como se determina por la falta de N-acetilgalactosamina (GalNAc). No se detectó ácido siálico lo cual es consistente con estructuras de N-glicano determinadas previamente de otras proteínas endógenas y exógenas producidas de acuerdo con la descripción. La descripción incluye LAL glicosilada con una o más de las estructuras de oligosacáridos descritas en este documento.

**Tabla 2. Sitio de residencia de estructuras de glicano de LAL determinado mediante LC/MS de glicopéptidos**

Sitio	Estructura de glicano
Asn <sup>36</sup>	GlcNAc4Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2
Asn <sup>72</sup>	No detectado
Asn <sup>101</sup>	Phos2Man7GlcNAc2
Asn <sup>161</sup>	Phos1Man6GlcNAc2 GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2 Man3GlcNAc2 GlcNAc2Man3GlcNAc2 GlcNAc2Man3GlcNAc2
Asn <sup>273</sup>	GlcNAc3Man3GlcNAc2 GlcNAc4Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2 Man7GlcNAc2 Man8GlcNAc2 Man9GlcNAc2 Phos1Man8GlcNAc2 Phos1Man9GlcNAc2
Asn <sup>321</sup>	GlcNAc2Man3GlcNAc2 GlcNAc3Man3GlcNAc2 GlcNAc4Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2 GlcNAc5Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc5Man3GlcNAc2 GlcNAc6Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc6Man3GlcNAc2
Hex, galactosa; Phos, fosfato; Man, manosa; GlcNAc2, N-acetilglucosamina	

### Procedimientos

- 5 **[0189]** Se determinó la composición de monosacáridos, incluidos los neutros, amino y M6P, cualitativa y cuantitativamente mediante detección amperométrica pulsada con cromatografía de intercambio aniónico de pH elevado (HPAEC-PAD).
- 10 **[0190]** Las estructuras de los glicanos predominantes se determinaron con los datos de varios procedimientos de espectrometría de masas (MALDI-TOF, NSI-MS/MS y LC-MS de glicopéptidos).
- 15 **[0191]** MALDI-TOF era útil para la determinación de N-glicanos neutros y fue capaz de detectar N-glicanos fosforilados (Figura 18). NSI-MS/MS se empleó para determinar la naturaleza de los picos menores en los espectros de MALDI-TOF, algunos de los cuales se atribuyeron a N-glicanos fosforilados (Figura 19). Los esfuerzos para mejorar la capacidad de MALDI-TOF para detectar N-glicanos fosforilados no fueron fructíferas.
- 20 **[0192]** LC/MS de glicopéptidos fue capaz de detectar estructuras neutras y fosforiladas y fue capaz de determinar la posición de estructuras específicas en la secuencia de aminoácidos de LAL (datos resumidos en la Figura 17 y en la Tabla 2).
- 25 **[0193]** Para determinar qué picos en el cromatograma de HPAEC-PAD se deben a N-glicanos fosforilados, LAL se trató con fosfatasa y se analizó (Figura 3). Los picos en los grupos C y D disminuyeron en área bajo la curva (AUC), mientras que un pico en el grupo A se hizo más prominente. Los picos en el grupo B no cambiaron en proporción a los otros picos. Basado en el conocimiento de que el tiempo de retención es proporcional al grado de carga (ya sea debido a la fosforilación o a la sialilación), se contempla que el grupo C se compone de N-glicanos con un fosfato (mono M6P) y el grupo D está compuesto de N-glicanos con dos fosfatos (bis-M6P).
- 30 **[0194]** El tiempo de retención también se vio afectado por la composición y posición estructural relativa de los monosacáridos neutros y amino. Tales ejemplos incluyen la presencia de galactosa, la presencia de un GlcNAc en bisección y el grado de sustitución GlcNAc. Tales factores contribuyen a la multiplicidad de los picos en el cromatograma HPAEC-PAD.

### Ejemplo 12

#### 35 **Análisis de actividad enzimática in vitro de hLAL derivada de ave transgénica en clara de huevo**

**[0195]** Se determinó la actividad de lipasa ácida lisosomal en la clara de huevo utilizando el sustrato fluorogénico ensayo de oleato de 4-metilumbeliferilo esencialmente como se describe en Yan et al. (2006), American Journal of Pathology, vol. 169, No. 3, pág. 916-926.

[0196] Se preparó una solución madre de oleato de 4-metilumbeliferilo (4-MUO) que consistía en 4-MUO 2,5 mM en Triton X-100 al 4%. El ensayo se realizó en una placa de microtitulación conteniendo cada pocillo 62,5 µl de citrato de sodio 0,2 M (pH 5,5) en Tween80 al 0,01%, 12,5 µl de muestra de clara de huevo y 25 µl de 4-MUO 2,5 mM. el cambio en la fluorescencia se monitorizó durante 30 minutos a 37°C utilizando un lector fluorométrico de microplacas Bio-Tek Synergy HT (excitación 360 nm y emisión 460 nm). Antes del ensayo, la clara de huevo que contenía la hLAL se diluyó hasta una concentración de enzima que dio lugar a que la reacción continuó linealmente durante al menos 30 minutos. La reacción se detuvo con 50 micras µl de Tris-HCl 0,75 M, pH 8,0 y la señal de fluorescencia de punto final se midió en el mismo lector de placas usado anteriormente (excitación 360 nm y emisión 460 nm).

[0197] Las unidades de actividad se determinaron usando 4-metilumbeliferilo como patrón. Una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que da como resultado la formación de 1 umol de 4-metilumbeliferilo/min bajo las condiciones de ensayo descritas anteriormente. Se utilizó clara de huevo que no contenía hLAL como control negativo.

[0198] Las muestras de clara de huevo que fueron positivas para hLAL contenían entre 1 U y 100 U de actividad por ml de clara de huevo. Se analizó la clara de huevo de 21 pollos G1. La clara de huevo de 10 de los pollos dio positivo para la actividad hLAL.

### **Ejemplo 13**

#### **Análisis *in vitro* de LAL derivada de ave transgénica**

[0199] Se examinó *in vitro* la capacidad de LAL producida en las células de oviducto de aves transgénicas (denominadas en este documento como "SBC-102", "LAL derivada de ave", "LAL", o "HLAL") para unirse a células y ser internalizada en el compartimento lisosomal utilizando células de macrófagos y fibroblastos. Cuando se incubaba con células de macrófagos, se encontró que el SBC-102 marcado fluorescentemente se localizaba en el lisosoma. Este efecto podría atenuarse mediante el uso de un competidor de polisacárido de manosa, implicando al receptor de N-acetilglucosamina/manosa (GlcNAc/manosa) como un mecanismo de reconocimiento y captación por estas células. SBC-102 aumentó la actividad LAL asociada a las células en fibroblastos humanos deficientes de LAL y fibroblastos murinos normales después de la incubación *in vitro*, lo que indica que la exposición a SBC-102 puede resultar en la sustitución sustancial de actividad enzimática deficiente.

[0200] La manosa-6-fosfato (M6P) está presente en las estructuras de oligosacáridos de SBC-102 que se ha demostrado que están implicadas en la liberación de enzimas lisosomales a una amplia variedad de tipos de células a través del receptor de M6P ubicuo.

[0201] Se purificó LAL de la clara de huevo de gallinas transgénicas. Se obtuvo Oregon Green NHS de Invitrogen™ (# 0-10241). La línea de macrófagos de rata alveolar, NR8383, y la línea de fibroblastos de ratón, NIH-3T3, se obtuvieron de ATCC. Los fibroblastos de Wolman deficientes en LAL se obtuvieron de Coriell Institute for Medical Research y LysoTracker® Red se obtuvo de Invitrogen™.

[0202] Marcaje de enzimas: Se marcaron 4 mg de LAL derivada de ave transgénica en PBS con Oregon Green, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y la reacción se dializó posteriormente contra PBS, a continuación se concentró.

[0203] Captación de macrófagos: Se incubaron LAL derivada de ave transgénica marcada fluorescentemente (5 µg/ml) y LysoTracker® Red con células NR8383 durante 2 horas. Las células fueron examinadas mediante microscopía de fluorescencia confocal utilizando un modo de rastreo secuencial a 488 nm y a continuación 514 nm.

[0204] Inhibición competitiva con manano: Se incubaron SBC-102 marcada fluorescentemente (5 µg/ml) y manano con células NR8383 durante 2 horas. Las células se tripsinizaron y la captación de LAL se midió mediante clasificación celular activada por fluorescencia usando la intensidad de fluorescencia mediana como el punto final.

[0205] La capacidad de la LAL derivada de ave transgénica para ser captada y posteriormente incorporarse en los lisosomas de las células diana se examinó usando la línea celular de macrófagos, NR8383. Se incubaron la LAL derivada de ave transgénica marcada con fluorescencia y el marcador lisosomal, "LysoTracker® Red" (Invitrogen™) con células durante 2 horas. La colocalización de LAL derivada de ave transgénica y marcador lisosomal en los lisosomas de estas células se examinó posteriormente mediante microscopía de fluorescencia confocal utilizando un modo de rastreo secuencial (Figura 20). La LAL mostró la localización a los lisosomas, que es consistente con estudios *in vitro* similares utilizando rhLAL de una variedad de fuentes.

[0206] La especificidad de unión de LAL derivada de ave transgénica al receptor de GlcNAc/manosa se ha evaluado mediante ensayos de unión competitiva utilizando la línea celular de macrófagos, NR8383 (Figura 21). Se coinubaron LAL derivada de ave transgénica marcada fluorescentemente (Oregon Green) a 5 µg/ml y diversas

concentraciones del oligosacárido que contiene manosa, manano, con células durante 2 horas. La inhibición relativa de la captación de LAL derivada de ave transgénica por manano, en comparación con un control sin manano, se cuantificó por análisis de clasificación celular activada por fluorescencia usando la intensidad de fluorescencia mediana como el punto final. Se observó una inhibición dependiente de la dosis de manosa en la captación/unión de LAL derivada de ave transgénica, lo cual es coherente con la interacción de LAL derivada de ave transgénica:GlcNAcR.

[0207] Además, la captación mediada por manosa-6-fosfato en células de fibroblastos se demostró mediante experimentos de competición con manosa-6-fosfato (resultados no mostrados).

[0208] Se ha examinado la capacidad de la exposición de LAL derivada de ave transgénica para aumentar la actividad LAL en las células utilizando células normales y deficientes en LAL *in vitro*. Se incubaron fibroblastos aislados a partir de un paciente de Wolman y fibroblastos murinos normales (NIH-3T3) en presencia de LAL derivada de ave transgénica a concentraciones de 0, 0,16 o 0,5 µg/ml durante 5 horas. A continuación, las células se lavaron para eliminar la señal no específica y se ensayaron los lisados celulares por la actividad de LAL usando el sustrato 4-MUO. La actividad de LAL endógena asociada a células fue menor en los fibroblastos de Wolman en comparación con NIH-3T3 y se observaron aumentos dependientes de la dosis en la actividad en ambos tipos de células después de la incubación con LAL derivada de ave transgénica (Fig. Fig. 22).

**Ejemplo 14**

**Análisis *in vivo* de LAL derivada de ave transgénica**

[0209] Se trataron ratas Yoshida (es decir, homocigotas) deficientes en LAL (ver Kuriyama et al (1990), Journal of Lipid Research, vol 31, pág. 1605-1611; Nakagawa et al, (1995) Journal of Lipid Research, vol 36, pág. 2212-2218; y Yoshida y Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol 40, pág. 486-489) con SBC-102 (5 mg/kg, IV) o placebo, una vez/semana durante cuatro semanas a partir de las cuatro semanas de vida. Para cada administración el SBC-102 se inyectó en la vena de la cola de la rata en dos dosis iguales (2,5 mg/kg) con 30 minutos de diferencia. Las ratas y los controles de tipo natural emparejados por edad se examinaron una semana después de la dosis final. Los análisis se realizaron por triplicado.

[0210] El examen patológico macroscópico de los animales tratados con SBC-102 demostró la normalización en el color de hígado además de la reducción en el tamaño del órgano. Las ratas tratadas con SBC-102 mostraron una histología hepática esencialmente normal en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con vehículo (datos no presentados). Los niveles de alanina y aspartato transferasas en suero, que están elevados en ratas con LAL<sup>-/-</sup>, también se redujeron en ratas tratadas con SBC-102 (no mostrados).

[0211] Se determinó la masa de órganos y tejidos internos para cada rata y los datos se muestran en la Figura 23. El tamaño del órgano se representa como el porcentaje del peso corporal determinado a las 8 semanas de vida, en ratas LAL<sup>-/-</sup> y ratas LAL<sup>+/+</sup> después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg/kg durante 4 semanas.

[0212] El peso corporal de las ratas Yoshida tratadas con SBC-102 o vehículo se compararon con ratas de tipo natural, tal como se muestra en la Figura 24. SBC-102 (5 mg/kg) o vehículo se administraron mediante inyección IV, ya sea como una dosis única o como dosis separadas (dentro de un período de 4 horas) para ratas LAL<sup>-/-</sup>. Las ratas LAL<sup>+/+</sup> son controles de una camada emparejados por edad.

**Ejemplo 15**

**Análisis de triglicéridos**

[0213] El análisis de triglicéridos se realizó en el tejido del hígado y el bazo de tejido de tipo natural, placebo homocigoto y animales homocigotos tratados SBC-102. Los análisis de triglicéridos se realizaron utilizando metodologías estándar (es decir, kit de cuantificación de triglicéridos de MBL Internacional Catálogo # JM-K622-100) y se realizaron por triplicado.

**Tabla 3: Niveles de triglicéridos en hígado y bazo en ratas de tipo natural y deficientes en LAL**

	Triglicérido (ug/mg de tejido húmedo)		
	Tipo natural (n = 3)	Placebo (n = 3)	SBC-102 (n = 3)
Hígado	48	84	57
Bazo	3	22	4

**Niveles de sustrato en hígado**

[0214] La figura 25 muestra los niveles de colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos en el hígado determinados a las 8 semanas de vida, en ratas WT y deficientes de LAL después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg·kg<sup>-1</sup> durante 4 semanas.

5

**Ejemplo 16**

**Estudio de respuesta a la dosis**

[0215] En base a los estudios realizados anteriormente, se examinaron los efectos farmacodinámicos (PD) de un intervalo de dosis y programas de dosis (cada semana y cada dos semanas) de LAL ("SBC-102") en ratas LAL<sup>-/-</sup>. En estos estudios, se administró SBC-102 mediante inyecciones IV en dosis de 0,2, 1, 3 y 5 mg/kg, cada dos semanas, o 0,35, 1 y 5 mg/kg, cada semana, durante 1 mes, a partir de las 4 semanas de vida. Los resultados demuestran mejoras en la ganancia de peso corporal (BW) (Figura 26), organomegalia (Figura 27), y los niveles de sustrato en tejido (Figura 28). Los niveles séricos de transaminasas también se redujeron a medida que aumentaba la dosis de SBC-102, con niveles que alcanzan esencialmente los niveles de tipo natural en las dosis más altas.

10

15

**Ejemplo 17**

**Administración de LAL recombinante en un modelo de rata**

20

25

[0216] Se evaluaron los efectos de repetición de la dosificación con lipasa ácida lisosomal (LAL) recombinante sobre el peso, los triglicéridos y el colesterol del tejido, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, peso intestinal, y otros parámetros en ratas Donryu deficientes de LAL descritos en Yoshida y Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol. 40, pág. 486-489 (véase también Kuriyama et al (1990) Journal of Lipid Research, vol 31, pág. 1605-1611; Nakagawa et al, (1995) Journal of Lipid Research, vol 36, pág. 2212- 2218).

30

35

[0217] A las 4 semanas de vida, las ratas Donryu homocigotas para la delección LAL (LAL<sup>-/-</sup>) fueron asignadas en grupos para dosificarse con LAL recombinante humana producida en un sistema de oviducto de pollo transgénico o un placebo de solución salina. Como controles se utilizaron ratas de una camada de tipo natural emparejadas por la edad. Las ratas LAL<sup>-/-</sup> se dosificaron una vez por semana durante cuatro semanas (cuatro dosis en total) o una vez cada dos semanas durante cuatro semanas (dos dosis en total) mediante inyección en la vena de la cola como una sola dosis o en dos dosis iguales con 30 minutos de diferencia. Las dosis de LAL fueron 1 mg/kg o 5 mg/kg. La programación de dosificación se muestra en la Tabla 4. Las ratas se pretrataron con difenhidramina (5 mg/kg) para contrarrestar el riesgo de reacciones anafilácticas, un procedimiento que se basa en experiencias anteriores en modelos animales de terapia de reemplazo enzimático para el tratamiento de la enfermedad de almacenamiento lisosomal (Shull et al (1994) Proceedings of the National Academy of Science, vol 91, pág.12937; Bielicki et al (1999) The Journal of Biological Chemistry, 274, pág. 36335; Vogler et al (1999) Pediatric Research, 45, pág. 838).

40

[0218] La figura 29 muestra el progreso diario en el aumento de peso de las ratas que se les administró 1 mg/kg de LAL por semana o 5 mg/kg de LAL por semana o 5 mg/kg de LAL en dos semanas. Se puede observar en la figura que hay poca o ninguna diferencia en el efecto terapéutico entre los dos tamaños y frecuencias de dosis.

45

**Tabla 4. Programación de pesado y dosificación**

Día desde el nacimiento	Valoraciones/inyecciones realizadas	
Día 13	PESADO	
Día 14		
Día 20		
Día 21		Cachorro destetado
Día 24		
Día 25		
Día 27		
Día 28	Primera inyección para la administración una vez por semana y una vez cada dos semanas	
Día 31		
Día 32		
Día 34		
Día 35	Segunda inyección para la administración una vez cada semana	
Día 38		
Día 39		
Día 41		
Día 42	Tercera inyección para la	

	administración una vez por semana; segunda administración una vez cada dos semanas
Día 45	
Día 48	
Día 49	Cuarta inyección para la administración una vez cada semana
Día 55	
Día 56	Necropsia

**Examen patológico de ratas LAL<sup>-</sup> tratadas con LAL recombinante**

5 [0219] A la terminación del estudio descrito en el Ejemplo 1, los animales de estudio fueron humanamente sacrificados y se realizó una necropsia para examinar macroscópicamente la patología, la histopatología, y la química clínica. La necropsia macroscópica incluyó el examen de la superficie externa del cuerpo, todos los orificios, y las cavidades craneales, torácicas y abdominales y sus contenidos. Se determinó la masa de órganos y tejidos internos para las ratas y se recogieron los órganos y tejidos y se fijaron en formalina al 10% tamponada neutra. Después de la fijación, los tejidos se procesaron y se prepararon y evaluaron portaobjetos histológicos de secciones manchadas de hematoxilina y eosina.

15 [0220] El examen patológico macroscópico de los animales tratados analizados mostró una normalización sustancial en el tamaño y el color del hígado tal como puede verse en la disección que se muestra en la Figura 30. Se determinaron las relaciones de peso del órgano con respecto al cuerpo y mostraron una reducción en el tamaño relativo del órgano para el hígado, bazo, tejido mesentérico, duodeno, yeyuno e íleon en los animales tratados con éxito que fueron disecados, en comparación con las ratas tratadas con placebo (Figura 23). La histopatología de tejido hepático de LAL de ratas tratadas analizadas muestra una histología hepática esencialmente normal en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con placebo (Figura 30).

**Ejemplo 18**

**[0221] Tratamiento de la enfermedad de Wolman (WD) mediante la administración de LAL recombinante**

25 [0222] A las 7 semanas de vida una paciente es ingresada en el hospital a causa de dificultades en la ganancia de peso y la mala evolución desde su nacimiento. En el examen físico inicial la paciente pesa 3,6 kg (peso al nacer 3,7 kg) y es delgada con pliegues de la piel suelta. El abdomen está distendido con una hepatomegalia firme de 6 cm y una esplenomegalia firme de aproximadamente 4 cm. Se observan ganglios linfáticos agrandados en la ingle y la actividad muscular es débil.

30 [0223] El nivel de hemoglobina inicial es 9,2 gm, plaquetas 506.000, y glóbulos blancos 11.550. El análisis de orina es normal y el frotis de médula ósea reveló linfocitos vacuolados y numerosas células espumosas. Mediciones químicas del suero: lípidos totales 834 mg/100 ml, fosfolípidos 176 mg/100 ml, triglicéridos 141 mg/100 ml, colesterol 129 mg/100 ml, bilirrubina 0,3 mg/100 ml, fosfatasa alcalina 9,0 %BU, SGOT 90 unidades, SGPT 50 unidades, 20 unidades de la colinesterasa, urea de nitrógeno 8,3 mg, azúcar en ayuno 45 mg/100 ml. El TC de abdomen muestra hepatoesplenomegalia y glándulas suprarrenales bilaterales simétricamente agrandadas con calcificación.

40 [0224] Al paciente se le implanta quirúrgicamente un puerto de acceso vascular venoso para la dosificación. Después de conectar el puerto a una máquina de infusión ambulatoria, el paciente se trata previamente con 1 mg/kg de difenhidramina 20 minutos antes de la infusión de LAL con el fin de contrarrestar posibles reacciones anafilácticas a la infusión. Al paciente se le administra a continuación LAL a 1 mg/kg en el transcurso de 5 horas por infusión intravenosa. Esta terapia se repite una vez cada 7 días durante un tiempo indefinido.

45 [0225] Dentro de las dos semanas de la administración de la primera dosis de LAL, el paciente experimenta una mejora significativa en el aumento de peso y la normalización del tamaño de los órganos abdominales clave, tal como se determina mediante ultrasonidos. Los resultados de laboratorio demuestran que la infusión de la LAL restaura la actividad de la lipasa ácida lisosomal en el paciente y conduce a la corrección de las alteraciones relacionadas.

**Ejemplo 19**

**Tratamiento de la enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol (CESD) mediante la administración de LAL recombinante**

55 [0226] Se examina un niño de 3 años de vida con una erupción pruriginosa abdominal por su pediatra. Tras un examen abdominal, se observa hepatomegalia por el médico y se confirma por ultrasonido. En este punto no se

hace el diagnóstico y el paciente se monitoriza periódicamente.

[0227] A la edad de 8 años es ingresado en el hospital con gastroenteritis. Una microscopía óptica de una biopsia de hígado muestra un aumento de glucógeno intracitoplasmático y pequeñas gotas de lípidos en los hepatocitos. La microscopía electrónica muestra gotitas de lípidos unidas a la membrana con gránulos densos de electrones pequeños. Se hace un diagnóstico de trabajo de la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo III (enfermedad DeBrancher), pero la actividad DeBrancher de los fibroblastos de la piel es normal.

[0228] A la edad de 10 años, persiste la hepatomegalia y se toma una segunda biopsia de hígado. Una microscopía óptica muestra una arquitectura lobular alterada del parénquima hepático con hepatocitos distendidos que contienen gránulos citoplasmáticos y vacuolas con fibrosis periportal leve. Se encuentra que la actividad de la lipasa ácida en fibroblastos es del 7% de lo normal, lo que confirma el diagnóstico de CESD. Las concentraciones plasmáticas de colesterol total (TC), triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) están cada una por encima del percentil 95 para la edad y el sexo a 7,51, 3,24 y 5,58 mmol/L, respectivamente, mientras que el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) en plasma está por debajo del percentil 5 a 0,47 mmol/L; ha combinado la hiperlipidemia (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia e hiperbetalipoproteinemia).

[0229] Al paciente se le implanta quirúrgicamente un puerto de acceso vascular venoso para la dosificación. Después de conectar el puerto a una máquina de infusión ambulatoria, el paciente se trata previamente con 5 mg/kg de difenhidramina 20 minutos antes de la infusión de LAL con el fin de contrarrestar posibles reacciones anafilácticas a la infusión. Al paciente se le administra a continuación LAL a 5 mg/kg en el transcurso de 5 horas por infusión intravenosa. Esta terapia se repite una vez cada 14 días indefinidamente.

[0230] Dentro de las dos semanas de la administración de la primera dosis de LAL, el paciente experimenta una mejora significativa en el aumento de peso y la normalización en el tamaño de los órganos clave, tal como se determina mediante ultrasonido. Los resultados de laboratorio demuestran que la infusión de la LAL restaura la actividad de la lipasa ácida lisosomal en el paciente y conduce a la corrección de las alteraciones relacionadas.

**Ejemplo 20**

**Descripción y composición del medicamento**

[0231] La sustancia fármaco de LAL descrito en este documento ("SBC-102") es una lipasa ácida lisosomal recombinante humana (rhLAL) purificada a partir de la clara de huevo producida a partir de *Gallus* transgénico. Los excipientes utilizados en SBC-102 son similares a los utilizados para otros productos para los trastornos de almacenamiento lisosomal (LSD) que están actualmente en el mercado, y se han seleccionado para mantener la estabilidad del producto farmacéutico.

[0232] SBC-102 es un líquido claro, incoloro, estéril proporcionado en un vial de vidrio transparente de borosilicato de tipo I con un tapón recubierto de látex no natural (butilo), FluroTec®, y sellado hermético de aluminio. SBC-102 se proporciona como una solución acuosa compuesta de SBC-102 (2 mg/ml), citrato trisódico dihidratado (13,7 mg/ml, USP), ácido cítrico monohidratado (1,57 mg/ml, USP), albúmina de suero humano (10 mg/ml, USP), y agua para inyección (hasta el volumen final, USP) El pH de SBC-102 es 5,9 ± 0,2. SBC-102 no contiene conservantes y los viales están destinados para un solo uso.

Tabla 5. Excipientes en SBC-102 (LAL)

Excipiente	Número CAS	Grado	Función
citrato trisódico dihidratado	6132-04-03	USP	Tampón
ácido cítrico monohidratado	5949-29-1	USP	Tampón
albúmina de suero humano	70024-90-7	USP	Estabilizante

**Componentes del producto farmacéutico**

[0233]

Tabla 6 Formulación de SBC-102

Componente	Concentración
SBC-102 (rhLAL)	2 mg/ml*
citrato trisódico dihidratado	13,7 mg/ml
ácido cítrico monohidratado	1,57 mg/ml

ES 2 627 535 T3

albúmina de suero humano	10 mg/ml
Agua para inyección, cantidad suficiente para	1,0 ml

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulación farmacéutica que comprende una lipasa ácida lisosomal recombinante humana (rhLAL) aislada en combinación con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicha rhLAL una o más estructuras de N-glicano, en la que rhLAL está glicosilada unida a N en Asn<sup>15</sup>, Asn<sup>80</sup>, Asn<sup>140</sup>, Asn<sup>252</sup> y Asn<sup>300</sup> de la SEQ ID NO: 2, y en la que la formulación farmacéutica es una solución acuosa que tiene un pH entre 5,6 y 6,2 o un pH de 5,9 ± 0,2.
- 10 2. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que la rhLAL comprende una estructura de N-glicano que comprende una manosa fosforilada en Asn<sup>80</sup>, Asn<sup>140</sup> o Asn<sup>252</sup> de la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 2, en la que la rhLAL comprende una estructura de N-glicano que comprende una manosa fosforilada en Asn<sup>80</sup>; opcionalmente en la que al menos el 30% de las estructuras de N-glicano asociadas con Asn<sup>80</sup> tienen una manosa fosforilada, o en la que la rhLAL comprende una estructura de N-glicano que comprende una manosa bisfosforilada en Asn<sup>80</sup>.
- 20 4. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 2, en la que la rhLAL comprende una estructura de N-glicano que comprende una manosa fosforilada (M6P) en Asn<sup>140</sup>; opcionalmente en la que entre el 10% y el 50% de las estructuras de N-glicano asociadas con Asn<sup>140</sup> comprenden una M6P.
- 25 5. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 2, en la que la rhLAL comprende una estructura de N-glicano que comprende una manosa fosforilada (M6P) en Asn<sup>252</sup>; opcionalmente en la que al menos el 50% de las estructuras de N-glicano en Asn<sup>252</sup> comprenden una M6P.
- 30 6. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que la rhLAL comprende una estructura de N-glicano que comprende un grupo con alto contenido de manosa en Asn<sup>80</sup> o Asn<sup>252</sup>.
- 35 7. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 6, en la que el grupo con alto contenido de manosa comprende 6, 7, 8, 9 ó 10 manosas; opcionalmente en la que la rhLAL comprende una estructura de N-glicano que comprende 7, 8 ó 9 manosas en Asn<sup>80</sup> o en Asn<sup>252</sup>.
- 40 8. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que la rhLAL comprende una estructura de N-glicano que comprende una galactosa terminal en Asn<sup>15</sup>, Asn<sup>140</sup> o Asn<sup>300</sup>; opcionalmente en la que del 2% al 10% de las estructuras de N-glicano asociadas con Asn<sup>15</sup> comprenden una galactosa terminal; opcionalmente en la que menos del 5% de las estructuras de N-glicano asociadas con Asn<sup>140</sup> comprenden una galactosa terminal; u opcionalmente en la que la rhLAL comprende una galactosa terminal en Asn<sup>300</sup>.
- 45 9. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que Asn<sup>51</sup> de la rhLAL no está glicosilada.
- 50 10. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que la rhLAL comprende estructuras de N-glicano que no tienen xilosa y menos del 15% de las estructuras de N-glicano contienen ácido siálico.
- 55 11. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que la rhLAL no contiene fucosa.
- 60 12. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que la rhLAL es un polipéptido o una mezcla de polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 19.
- 65 13. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que la rhLAL comprende un perfil de glicosilación unido a N, tal como se indica a continuación:  
a) en Asn<sup>15</sup>, GlcNAc4Man3GlcNAc2, o Gal1 GlcNAc4Man3GlcNAc2;  
b) en Asn<sup>80</sup>, Phos2Man7GlcNAc2;  
c) en Asn<sup>140</sup>, Phos1Man6GlcNAc2, GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2, Man3GlcNAc2; GlcNAc2Man3GlcNAc2; GlcNAc3Man3GlcNAc2; GlcNAc4Man3GlcNAc2, o Gal1 GlcNAc4Man3GlcNAc2;  
d) en Asn<sup>252</sup>, Man7GlcNAc2, Man8GlcNAc2, Man9GlcNAc2, Phos1Man8GlcNAc2, o Phos1Man9GlcNAc2; y  
e) en Asn<sup>300</sup>, GlcNAc2Man3GlcNAc2,

5      GlcNAc3Man3GlcNAc2,  
         GlcNAc4Man3GlcNAc2,  
         Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2,  
         GlcNAc5Man3GlcNAc2,  
         Gal1GlcNAc5Man3GlcNAc2,  
         GlcNAc6Man3GlcNAc2, or  
         Gal1GlcNAc6Man3GlcNAc2,  
         en el que Man = manosa,  
         GlcNAc = N-Acetil Glucosamina  
10      Phos = fosfato  
         Gal = galactosa.

15      14. Formulación farmacéutica, según la reivindicación 1, en la que la rhLAL se produce en un ave transgénica de línea germinal; opcionalmente en la que la rhLAL es produce a partir de una célula de oviducto de ave transgénica de línea germinal; y opcionalmente en la que el ave es pollo.

15      15. Formulación farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el pH de la formulación farmacéutica es  $5,9 \pm 0,2$ .

20      16. Formulación farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación farmacéutica comprende un excipiente adecuado para la formulación para infusión o inyección intravenosa seleccionado entre citrato trisódico deshidratado, ácido cítrico y albúmina de suero humano.

ES 2 627 535 T3

	1		60
rhLAL	MKMRFLGLVVCLVWLWTLHSEG	<u>SGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFPSEEYLVETEDGYI</u>	
Natural	MKMRFLGLVVCLVWLWTLHSEG	<u>SGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFPSEEYLVETEDGYI</u>	
	61		120
rhLAL	<u>LCLNRIPHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGLLADSSNWVTNLANS</u>	<u>SLGFILADAGFDVWMGNS</u>	
Natural	<u>LCLNRIPHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGLLADSSNWVTNLANS</u>	<u>SLGFILADAGFDVWMGNS</u>	
	121		180
rhLAL	<u>RGNTWSRKHKTLSVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILNKTGQEQVYYVGH</u>	<u>SQGTIG</u>	
Natural	<u>RGNTWSRKHKTLSVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILNKTGQEQVYYVGH</u>	<u>SQGTIG</u>	
	181		240
rhLAL	<u>FIAFSQIPELAKRIKMFFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDLFGDKEFLPQSAFL</u>		
Natural	<u>FIAFSQIPELAKRIKMFFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDLFGDKEFLPQSAFL</u>		
	241		300
rhLAL	<u>KWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTTTSPAGTSVQNMLHWSQAV</u>		
Natural	<u>KWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTTTSPAGTSVQNMLHWSQAV</u>		
	301		360
rhLAL	<u>KFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPTYNVKDMLVPTAVWSSGGHDWLADVYDVNILLTQI</u>		
Natural	<u>KFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPTYNVKDMLVPTAVWSSGGHDWLADVYDVNILLTQI</u>		
	361	399	
rhLAL	<u>TNLVFHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ</u>	(SEQ ID NO:1)	
Natural	<u>TNLVFHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ</u>	(SEQ ID NO:20)	

Figura 1

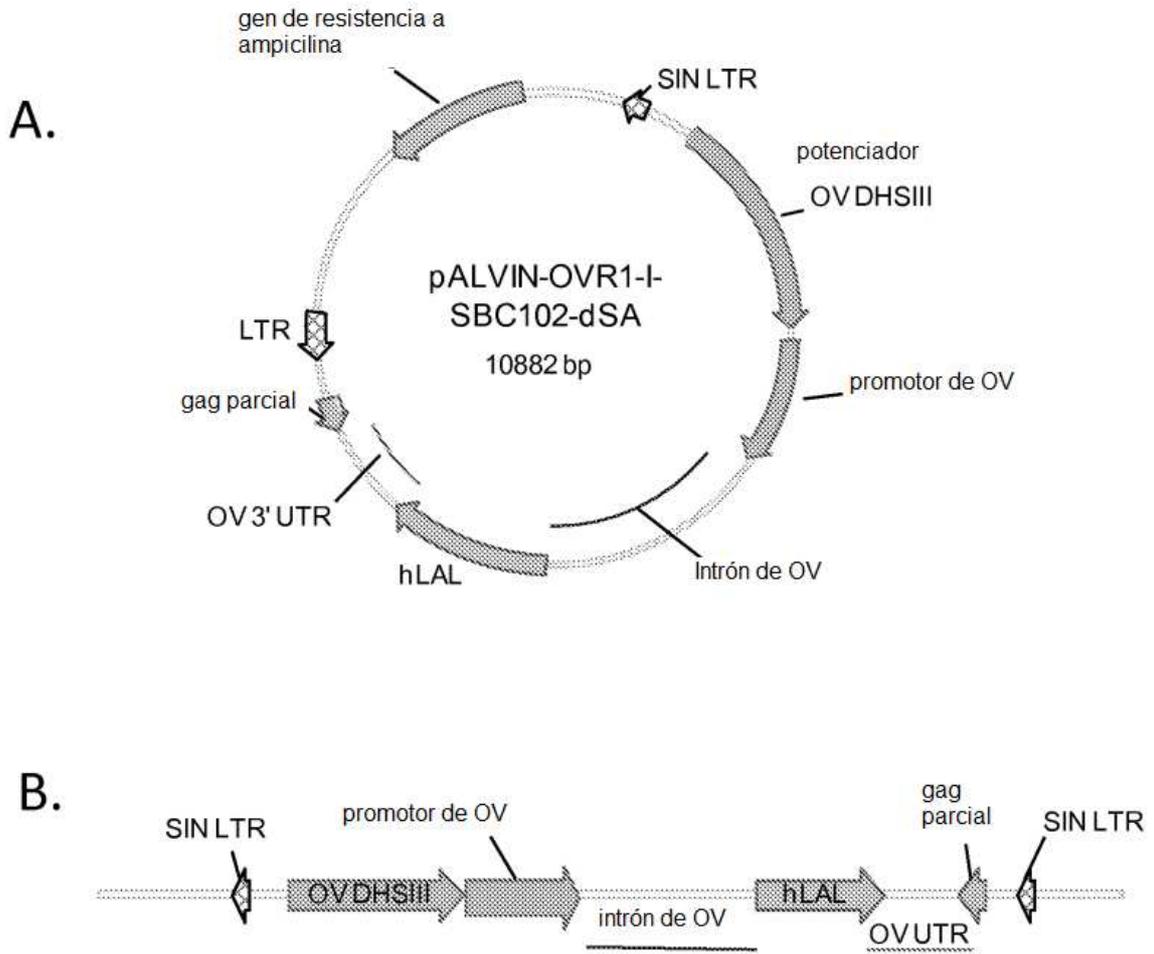
```

1   ATGAAAATGC GGTTCCTGGG GTTGGTGGTC TGTTTGGTTC TCTGGACCCT
51  GCATTCGGAG GGGTCCGGAG GGAAACTGAC AGCTGTGGAT CCTGAAACAA
101 ACATGAATGT CAGTGAAATT ATCTCTTACT GGGGATTCCC TAGTGAGGAA
151 TACCTAGTTG AGACAGAAGA TGGATATATT CTGTGCCTTA ACCGAATTCC
201 TCATGGGAGG AAGAACCATT CTGACAAAGG TCCCAAACCA GTTGTCTTCC
251 TGCAACATGG CTTGCTGGCA GATTCTAGTA ACTGGGTCAC AAACCTTGCC
301 AACAGCAGCC TGGGCTTCAT TCTTGCTGAT GCTGGTTTTG ACGTGTGGAT
351 GGGCAACAGC AGAGGAAATA CCTGGTCTCG GAAACATAAG ACACTCTCAG
401 TTTCTCAGGA TGAATTCTGG GCTTTCAGTT ATGATGAGAT GGCAAAATAT
451 GACCTACCAG CTTCCATTAA CTTCATTCTG AATAAGACTG GCCAAGAACA
501 AGTGTATTAT GTGGGTCATT CTCAAGGCAC CACTATAGGT TTTATAGCAT
551 TTTCACAGAT CCCTGAGCTG GCTAAAAGGA TTAAAATGTT TTTTGCCCTG
601 GGTCCGTGGG CTTCCGTCGC CTTCTGTACT AGCCCTATGG CCAAACGGG
651 ACGACTGCCA GATCATCTCA TTAAGGACCT CTTTGGAGAC AAAGAATTTT
701 TTCCCAGAG TCGTTTTTTG AAGTGGCTGG GTACCCACGT TTGCACTCAT
751 GTCATACTGA AGGAGCTCTG TGGAAATCTC TGTTTTCTTC TGTGTGGATT
801 TAATGAGAGA AATTTAAATA TGTCTAGAGT GGATGTGTAT ACAACACATT
851 CTCCTGCTGG AACTTCTGTG CAAAACATGT TACACTGGAG CCAGGCTGTT
901 AAATTCCAA AGTTTCAAGC CTTTGACTGG GGAAGCAGTG CCAAGAATTA
951 TTTTCATTAC AACCAGAGTT ATCCTCCCAC ATACAATGTG AAGGACATGC
1001 TTGTGCCGAC TGCAGTCTGG AGCGGGGGTC ACGACTGGCT TGCAGATGTC
1051 TACGACGTCA ATATCTTACT GACTCAGATC ACCAACTTGG TGTTCCATGA
1101 GAGCATTCCG GAATGGGAGC ATCTTGACTT CATTGGGGGC CTGGATGCC

```

(SEQ ID NO:5)

## Figura 2



**Figura 3**

**Secuencia de pALVIN-OVR1-I-SBC102-dSA (10882 pb)**

Característica	Localización (pb)
SIN LTR	521-693 (cadena complementaria)
Potenciador DHSIII	1069-2720
Promotor de OV	2720-3851
Intron	3899-5487
hLAL CDS	5505-6704
OV 3'UTR	6719-7392
CDS gag parcial	7404-7657 (cadena complementaria)
LTR	7955-8300 (cadena complementaria)
Gen de resistencia a ampicilina	9764-10621 (cadena complementaria)

1	CTTTCCCGT	CAAGCTCTAA	ATCGGGGGCT	CCCTTTAGGG	TTCCGATTTA	GTGCTTTACG
61	GCACCTCGAC	CCCAAAAAC	TTGATTAGGG	TGATGGTTCA	CGTAGTGGGC	CATCGCCCTG
121	ATAGACGGTT	TTTCGCCCTT	TGACGTTGGA	GTCCACGTTT	TTTAATAGTG	GACTCTTGTT
181	CCAAACTGGA	ACAACACTCA	ACCCTATCTC	GGTCTATTCT	TTTGATTTAT	AAGGGATTTT
241	GCCGATTTTCG	GCCTATTGGT	TAAAAAATGA	GCTGATTTAA	CAAAAATTTA	ACGCGAATTT
301	TAACAAAATA	TTAACGCTTA	CAATTTCCAT	TCGCCATTCA	GGCTGCGCAA	CTGTTGGGAA
361	GGGCGATCGG	TGCGGGCCTC	TTCGCTATTA	CGCCAGCTGG	CGAAAGGGGG	ATGTGCTGCA
421	AGGCGATTAA	GTTGGGTAAC	GCCAGGGTTT	TCCAGCTCAC	GACGTTGTAA	AACGACGGCC
481	AGTGAGCGCG	TATTCCCTAA	CGATCAGTFC	GGGGTCACCA	AATGAAGCCT	TCTGCTTCAT
541	GCATGTGCTC	GTAGTCGTCA	GGGAATCAAC	GGTCCGGCCA	TCAACCCAGG	TGCACACCAA
601	TGTGGTGAAT	GGTCAAATGG	CGTTTATFTG	ATCGAGCTAG	GCACTTAAAT	ACAATATCTC
661	TGCAATGCGG	AATTCAGTGG	TTCTGTTCAAT	CCGTCCCCCT	CCCTATGCAA	AAGCGAAACT
721	ACTATATCCT	GAGGGGACTC	CTAACCGCGT	ACAACCGAAG	CCCCGCTTTT	CGCCTAAACA
781	TGCTATTGTC	CCCTCAGTCA	AGCCTTGCCC	GTTACAACCC	GATTCGCAAG	CCTTGCCCTC
841	CCCACATTAT	CCGTAGCATT	ATTTCTTAGC	AGTCATCAGA	GCTACAGAAG	ATACTCTATG
901	CTGTAGCCAA	GTCTACAAGT	TTACTATFCA	GCGACCTCCT	ATATTCCGCG	TGCCAGCCGA
961	TCAATTACCA	ATCCAACCAG	CTATCACACG	GAATACAAGA	ACTCGCCTAC	GCTCTTCTTT
1021	CGGGCTGCTT	ATAAGCCTCC	TGTAATTTTT	TTATATTCCT	CGCTCGAGTC	TCTTCAGAAAT
1081	GGCACAGCAC	CGCTGCAGAA	AAATGCCAGG	TGGACTATGA	ACTCACATCC	AAAGGAGCCTT
1141	GACCTGATAC	CTGATTTTCT	TCAAACAGGG	GAAACAACAC	AATCCCACAA	AACAGCTCAG
1201	AGAGAAACCA	TCACTGATGG	CTACAGCACC	AAGGTATGCA	ATGGCAATCC	ATTCGCAATT
1261	CATCTGTGAC	CTGAGCAAAA	TGATTTATCT	CTCCATGAAT	GGTTGCTTCT	TTCCCTCATG
1321	AAAAGGCAAT	TTCCACACTC	ACAATATGCA	ACAAAGACAA	ACAGAGAACA	ATTAATGTGC
1381	TCCTTCCTAA	TGTTAAAATT	GTAGTGGCAA	AGAGGAGAAC	AAAATCTCAA	GTTCTGAGTA
1441	GGTTTTAGTG	ATTGGATAAG	AGGCTTTGAC	CTGTGAGCTC	ACCTGGACTT	CATATCCTTT
1501	TGGATAAAAA	GTGCTTTTAT	AACTTTCAGG	TCTCCGAGTC	TTTATTTCATG	AGACTGTTGG
1561	TTTAGGGACA	GACCCACAAT	GAAATGCCTG	GCATAGGAAA	GGGCAGCAGA	GCCTTAGCTG
1621	ACCTTTTCTT	GGGACAAGCA	TTGTCAAACA	ATGTGTGACA	AAACTATTTG	TACTGCCTTG
1681	CACAGCTGTG	CTGGGCAGGG	CAATCCATFG	CCACCTATCC	CAGGTAACCT	TCCAACGCA
1741	AGAAGATTGT	TGCTTACTCT	CTCTAGACCC	CCAAGTCAAA	CCAACATATGC	AGGTATGCTG
1801	ACAACACTAT	GATGACAGCC	TGTTCTGATC	AAGATCTCAT	TTGTTTCATGG	ACAATTTTTG
1861	TTGCTTGCAG	CTGGTCTTCC	ATTGGGAAAAG	AGTGTAGTAT	ATCCTTCTCA	TCTGACAGAA
1921	AAGCAGAAAT	TCTCATGCTC	CACACTTAAT	CTACATTGTT	TTAAACCACC	GGCTACTTCT
1981	TGGAGAGGAA	AAATGGCTTT	TATAAGACTC	ACAAAACAAA	GCTCTGCAAG	TCAAATGCAT
2041	ACAAAACGTG	TCTGTAGGTC	TGGAATCAGG	ACACTATGTG	GAAGTCAAAT	AGAGCAGCTT
2101	TAAAAAGCCT	TTGGGATCAT	TCTCATCTTA	TATTTGCAGC	ACGATACTAT	GACAGTGATA
2161	ACTGACATAA	CTGCATCAAT	TTCTTTGATA	TTTTATTTGT	CTTAAAGTAC	AAGACATAGA
2221	GATGGACGTA	AAGATGGACA	TATGACTCAG	GTCTGGACAG	GTCCGTGGTC	CATGTATGAT
2281	AAAAGAGATG	AAGGGAAGGA	GAATTGAGAC	TGTCTAAGAA	GGGCTTCAGG	GACGTTCTGA
2341	AGGCAGATTT	GACTGAATCA	GATGTACTGT	CCAAGTCTCA	TATGTAGCAA	TGGAAGGCTG
2401	ATATTGGAGA	AATATAAAGA	AATGGCTGTG	AACTCAAAGT	GACCCTGAAC	AGAAAAGGGA
2461	TATGGAGTTA	AAATAATGTC	ACAGAACTGA	GGTTTATATG	ATATAACCATG	GGCTGCAGAG
2521	GGTCAGAGTG	CTCCACCATG	GGCCTCTCTT	GGGCTGCAGG	GAACCTTCTGT	TCTACACCTG
2581	GAACACCTCC	TGCCCTCCTC	CGCACTGACC	TCAGTGTGAT	CAGGGCTGTT	TCTCTCATAT
2641	TTTCTCACTC	ACCTCTCCCA	ACTACCATTG	TACAGCAGTT	GTTCTTACAT	ATTGCTCCTC
2701	CTGAGGTACA	TCTAGCATCG	TTAAGTCCCTC	AGACTTGGCA	AGGAGAATGT	AGATTTCCAC
2761	AGTATATATG	TTTTACAAA	AGGAAGGAGA	GAAACAAAAG	AAAATGGCAC	TGACTAAACT

ES 2 627 535 T3

2821 TCAGCTAGTG GTATAGGAAA GTAATTCTGC TTAACAGAGA TTGCAGTGAT CTCTATGTAT  
 2881 GTCCTGAAGA ATTATGTTGT ACTTTTTTCC CCCATTTTTA AATCAAACAG TGCTTTACAG  
 2941 AGGTCAGAAT GGTTCCTTTA CTGTTTGTC ATTCTATTAT TTCAATACAG AACAAATAGCT  
 3001 TCTATAACTG AAATATATTT GCTATTGTAT ATTATGATTG TCCCTCGAAC CATGAACACT  
 3061 CCTCCAGCTG AATTTACAAA TTCCTCTGTC ATCTGCCAGG CCATTAAGTT ATTCATGGAA  
 3121 GATCTTTGAG GAACACTGCA AGTTCATATC ATAAACACAT TTGAAATGA GTATTGTTTT  
 3181 GCATTGTATG GAGCTATGTT TTGCTGTATC CTCAGAATAA AAGTTTGTTA TAAAGCATTG  
 3241 ACACCCATAA AAAGATAGAT TTAAATATTC CAACTATAGG AAAGAAAGTG TGTCTGCTCT  
 3301 TCACTCTAGT CTCAGTTGGC TCCTTCACAT GCACGCTTCT TTATTTCTCC TATTTTGTCA  
 3361 AGAAAATAAT AGGTCAAGTC TTGTTCTCAT TTATGTCCTG TCTAGCGTGG CTCAGATGCA  
 3421 CATTGTACAT ACAAGAAGGA TCAAATGAAA CAGACTTCTG GTCTGTTACT ACAACCATAG  
 3481 TAATAAGCAC ACTAACTAAT AATTGCTAAT TATGTTTTCC ATCTCCAAGG TTCCCACATT  
 3541 TTTCTGTTTT CTTAAAGATC CCATTATCTG GTTGTAACTG AAGCTCAATG GAACATGAGC  
 3601 AATATTTCCC AGTCTTCTCT CCCATCCAAC AGTCCTGATG GATTAGCAGA ACAGGCAGAA  
 3661 AACACATTGT TACCCAGAAT TAAAACTAA TATTTGCTCT CCATTCAATC CAAAATGGAC  
 3721 CTATTGAAAC TAAAATCTAA CCCAATCCCA TTAAATGATT TCTATGGTGT CAAAGGTCAA  
 3781 ACTTCTGAAG GGAACCTGTG GGTGGGTCAC AATTCAGACT ATATATTTCC CAGGGCTCAG  
 3841 CCAGTGTCTG TACATACAGC TAGAAAGCTG TATTGCCTTT AGCAGTCAAG CTCGAAAGGT  
 3901 AAGCAACTCT CTGGAATTAC CTTCTCTCTA TATTAGCTCT TACTTGCACC TAAACTTTAA  
 3961 AAAATTAACA ATTATTGTGC TATGTGTTGT ATCTTTAAGG GTGAAGTACC TGCGTGATAC  
 4021 CCCCTATAAA AACTTCTCAC CTGTGTATGC ATTCTGCACT ATTTTATTAT GTGTAAGGC  
 4081 TTTGTGTTTG TTTTCAGGAG GCTTATTCTT TGTGCTTAAA ATATGTTTTT AATTTACAGAA  
 4141 CATCTTATCC TGTCGTTTCC TATCTGATAT GCTTTGCAGT TTGCTTGATT AACTTCTAGC  
 4201 CCTACAGAGT GCACAGAGAG CAAAATCATG GTGTTCCAGT AATTCGGGGT AGTTATTTTA  
 4261 ATGTGAAAAAT TCTCTAGAAG TTTAATTCCT GCAAAGTGCA GCTGCTGATC ACTACACAAG  
 4321 ATAAAAATGT GGGGGGTGCA TAAACGTATA TTCTTACAAT AATAGATACA TGTGAACTTA  
 4381 TATACAGAAA AGAAAATGAG AAAAATGTGT GTGTGTATAC TCACACACGT GGTCAGTAAA  
 4441 AACTTTTGAG GGGTTTAATA CAGAAAATCC AATCCTGAGG CCCCAGCAC T CAGTACGCAT  
 4501 ATAAAGGGCT GGGCTCTGAA GGACTTCTGA CTTTCACAGA TTATATAAAT CTCAGGAAAG  
 4561 CAACTAGATT CATGCTGGCT CCAAAGCTG TGCTTTATAT AAGCACACTG GCTATACAAAT  
 4621 AGTTGTACAG TTCAGCTCTT TATAATAGAA ACAGACAGAA CAAGTATAAA TCTTCTATTG  
 4681 GTCTATGTCA TGAACAAGAA TTCATTGAGT GGCTCTGTTT TATAGTAAAC ATTGCTATTT  
 4741 TATCATGTCT GCATTTCTCT TCTGTCTGAA TGTCACCACT AAAATTTAAC TCCACAGAAA  
 4801 GTTTATACTA CAGTACACAT GCATCTTTT GAGCAAAGCA AACCATACCT GAAAGTGCAA  
 4861 TAGAGCAGAA TATGAATTAC ATGCGTGTCT TTCTCCTAGA CTACATGACC CCATATAAAT  
 4921 TACATTCCTT ATCTATTCTG CCATCACCAA AACAAAGGTA AAAATACTTT TGAAGATCTA  
 4981 CTCATAGCAA GTAGTGTGCA ACAAACAGAT ATTTCTCTAC ATTTATTTTT AGGGAATAAA  
 5041 AATAAGAAAT AAAATAGTCA GCAAGCCTCT GCTTTCTCAT ATATCTGTCC AAACCTAAAG  
 5101 TTTACTGAAA TTTGCTCTTT GAATTTCCAG TTTTGCAAGC CTATCAGATT GTGTTTTAAT  
 5161 CAGAGGTACT GAAAAGTATC AATGAATTCT AGCTTTCACT GAACAAAAAT ATGTAGAGGC  
 5221 AACTGGCTTC TGGGACAGTT TGCTACCCAA AAGACAAC TG AATGCAAATA CATAAATAGA  
 5281 TTTATGAATA TGTTTTTGAA CATGCACATG AGAGGTGGAT ATAGCAAACAG ACACATTACC  
 5341 ACAGAATTAC TTTAAAATA CTTGTTAACA TTTAATTGCC TAAAACTGC TCGTAATTTA  
 5401 CTGTTGTAGC CTACCATAGA GTACCTGCA TGGTACTATG TACAGCATC CATCCTTACA  
 5461 TTTTCACTGT TCTGCTGTTT GCTCTAGACA ACTCAGAGTT CACCATGAAA ATCGGTTCT  
 5521 TGGGGTTGGT GGTCTGTTTG GTTCTCTGGA CCCTGCATTC CGAGGGGTCC GGAGGGAAC  
 5581 TGACAGCTGT GGATCCAGAA ACAAACATGA ATGTCAGTGA AATTATCTCT TACTGGGGAT  
 5641 TCCCTAGTGA GGAATACCTA GTTGAGACAG AAGATGGATA TATTCTGTGC CTTAACCAGAA  
 5701 TTCCTCATGG GAGGAAGAAC CATTCTGACA AAGGTCCCAA ACCAGTTGTC TTCCTGCAAC  
 5761 ATGGCTTGCT GGCAGATTCT AGTAACTGGG TCACAAACCT TGCCAACAGC AGCCTGGGCT  
 5821 TCATTCTTGC TGATGCTGGT TTTGACGTGT GGATGGGCAA CAGCAGAGGA AATACCTGGT  
 5881 CTCGGAAACA TAAGACTCTC TCAGTTTCTC AGGATGAATT CTGGGCTTTC AGTTATGATG  
 5941 AGATGGCAAA ATATGACCTA CCAGCTTCCA TTAACCTCAT TCTGAATAAG ACTGGCCAAG  
 6001 AACAAAGTGA TTATGTGGGT CATTCTCAAG GCACCCTAT AGGTTTTATA GCATTTTCAC  
 6061 AACCCCTGA GCTGGCTAAA AGGATTAATA TGTTTTTTGC CCTGGGTCCT GTGGCTCCG  
 6121 TCGCCTTCTG TACTAGCCCT ATGGCCAAAC TGGGACGACT GCCAGATCAT CTCATTAAGG  
 6181 ACCTCTTTGG AGACAAAGAA TTTCTTCCCC AGAGTGCCTT TTTGAAGTGG CTGGGTACCC  
 6241 ACGTTTGCAC TCATGTCATA CTGAAGGAGC TCTGTGAAA TCTCTGTTTT CTCTGTGTG  
 6301 GATTTAATGA GAGAAATTTA AATATGTCTA GAGTGGATGT GTATAACA CAATTCTCCTG  
 6361 CTGGAACCTC TGTGCAAAAC ATGTTACTCT GGAGCCAGGC TGTTAAATTC CAAAAGTTTC  
 6421 AAGCCTTTGA CTGGGGAAGC AGTGCCAAGA ATTATTTTCA TTACAACCAG AGTTATCCTC

ES 2 627 535 T3

6481 CCACATACAA TGTGAAGGAC ATGCTTGTGC CGACTGCAGT CTGGAGCGGG GGTCACGACT  
6541 GGCTTGCAGA TGTCTACGAC GTCAATATCT TACTGACTCA GATCACCAAC TTGGTGTTC  
6601 ATGAGAGCAT TCCGGAATGG GAGCATCTTG ACTTCATTTG GGGCCTGGAT GCCCCTTGGA  
6661 GGCTTTATAA TAAGATTATT AATCTAATGA GGAAATATCA GTGATTCGAA GCGGCCGCAA  
6721 GAAGAAAGCT GAAAACTCT GTCCCTTCCA ACAAGACCCA GAGACTGTA GTATCAGGGG  
6781 TAAAAAGAAA AGTATGTTAT CTGCTGCATC CAGACTTCAT AAAAGCTGGA GCTTAATCTA  
6841 GAAAAAAAT CAGAAAAGAAA TTACACTGTG AGAACAGGTG CAATTCACTT TTCCTTTACA  
6901 CAGAGTAATA CTGGTAACTC ATGGATGAAG GCTTAAGGGA ATGAAATTGG ACTCACAGTA  
6961 CTGAGTCATC AACTGAAAA ATGCAACCTG ATACATCAGC AGAAGGTTTA TGGGGGAAAA  
7021 ATGCAGCCTT CCAATTAAGC CAGATATCTG TATGACCAAG CTGCTCCAGA ATTAGTCACT  
7081 CAAAATCTCT CAGATTAAAT TATCAACTGT CACCAACCAT TCCTATGCTG ACAAGGCAAT  
7141 TGCTTGTTCCT CTGTGTTCCCT GATACTACAA GGCTCTTCCT GACTTCCTAA AGATGCATTA  
7201 TAAAAATCTT ATAATTCACA TTTCTCCCTA AACTTTGACT CAATCATGGT ATGTTGGCAA  
7261 ATATGGTATA TTACTATTCA AATTGTTTTT CTTGTACCCA TATGTAATGG GTCTTGTGAA  
7321 TGTGCTCTTT TGTTCCTTTA ATCATAATAA AAACATGTTT AAGCAAACAC TTTTCACTTG  
7381 TAGTATTGA AGGTACCGGA TCTCGAGCCG CCTTCAATGC CCCAAAACC AATCCCAGG  
7441 TTTTAACTC TCCCATTCTT CCAAGTACCA TAGCCCCTG AGAGAGCCG CCGGTAATGG  
7501 GATCCCAGGA CCCCAGGGAA TATAAGTCTG AGGGGGACGT AAGCAACCTT TCCTTTTGTA  
7561 ACAGGGACAA CATAGCCCCT ATTTCTTCT TAGAAGGAGA GGTTTTCCCG CAATAGGTCT  
7621 TACACGCGGA CGAAATCACC TTTATGACGG CTTCCATGCT TGATCCACCG GCGGACCGGA  
7681 ATCACGCAGA GCAACCGGAA TCACGCCTGG GGTGGACCGC TCAGTCGTCG GGCTTCCTTC  
7741 CCGTCTTCCA ACGACTCTCT GAGTTCCTCG TAGGGTATGT TGGCCCCCTG CAGTAGGGCT  
7801 CCCTCCGACG CCACTCAGCT TCTGCCCTCC TAAGCCGCAG CCCCCTCTAC TAGGGTCATC  
7861 GTCCGCTCCC CGAATAAGCG AGACGGATGA GGACAGGATC GCCACGCCG CTGTGGCCGA  
7921 CCACTATTCC CTAACGATCA CGTCGGGGTC ACCAAATGAA GCCTTCTGCT TCATGCATGT  
7981 GCTCGTAGTC GTCAGGGAAT CAACGGTCCG GCCATCAACC CAGGTGCACA CCAATGTGGT  
8041 GAATGGTCAA ATGGCGTTTA TTGTATCGAG CTAGGCACTT AAATACAATA TCTCTGCAAT  
8101 GCGGAATCCA GTGGTTCGTC CAATCCGTGT TAGACCCGTC TGTTGCCTTC CTAACAAGGC  
8161 ACGATCATA CACGATCATA CCACCTTACT CCCACCAATC GGCATGCACG GGCTTTTTC  
8221 TCTCCTTATA AGGCATGTTG CTAATCATA GTTACATAAG CATGTTGCAA GACTACAAGA  
8281 GTATTGCATA AGACTACATT TCCCCCTCCC TATGCAAAAG CGAACTACT ATATCCTGAG  
8341 GGGACTCCTA ACCGCGTACA ACCGAAGCCC CGCTTTTCGC CTAACATGC TATTGTCCCC  
8401 TCAGTCAAGC CTTGCCCGTT ACAACCCGAT TCGCAAGCCT TGCCCTCCCC ACATTATCCG  
8461 TAGCATTATT TCCTAGCAGT CATCAGAGCT ACAGAAGATA CTCTATGCTG TAGCCAAGTC  
8521 TACAAGTTTA CTATTAGCG ACCTCCTATA TTCCGCGTGC CAGCCGATCA ATTACCAATG  
8581 CGCGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT TTCTGTGTG AAATTGTTAT CCGCTCACAA  
8641 TTCCACACAA CATAAGGACC GGAAGCATAA AGTGTAAGC CTGGGGTGCC TAATGAGTGA  
8701 GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC TGCCCGCTTT CCAGTCGGGA AACCTGTCTG  
8761 GCCAGTGA TTAATGAATC GGCCAACCGC CGGGGAGAGG CGGTTTTCGT ATTGGGCGCT  
8821 CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGTGC GCTCGGTCGT TCGGTCGCG CGAGCGGTAT  
8881 CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC GAGGAAAAGA  
8941 ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT  
9001 TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT  
9061 GGCGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC  
9121 GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCTTTCTC CCTTCGGGAA  
9181 GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTCTGCT  
9241 CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA  
9301 ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG  
9361 GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCCTG AAGTGGTGGC  
9421 CTAACACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA  
9481 CTTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAACA ACCACCCTG GGTAGCGGTG  
9541 GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC CAGAAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCCTT  
9601 TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG  
9661 TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAATAA TGAAGTTTAA  
9721 AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG  
9781 AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTT GTTCATCCAT AGTTGCCTGA CTCCCCGTCG  
9841 TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGTGCA ATGATACCGC  
9901 GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGCCG  
9961 AGCGCAGAAG TGGTCTTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTCGGGG  
10021 AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCAGAA CGTTGTTGCC ATTGCTACAG  
10081 GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT

```
10141 CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC TTCGGTCCTC
10201 CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC
10261 ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA
10321 CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCG GCGTCAATAC
10381 GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA AAACGTTCTT
10441 CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC
10501 GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA
10561 CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA
10621 TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT
10681 ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCGGAA
10741 AAGTGCCACC TGACGCGCCC TGTAGCGGCG CATTAAAGCGC GGCGGGTGTG GTGGTTACGC
10801 GCAGCGTGAC CGCTACACTT GCCAGCGCCC TAGCGCCCGC TCCTTTCGCT TTCTTCCCTT
10861 CCTTTCGCG CACGTTTCGCC GG
```

(SEQ ID NO: 6)

## Figura 4

**Secuencia de ADN de la región proviral (7780 pb)**

Características	Localización (pb)
SIN LTR	1-173 (cadena complementaria)
Potenciador DHSIII	549-2200
Promotor de OV	2200-3331
Intron	3379-4967
hLAL CDS	4985-6184
OV 3'UTR	6199-6872
CDS gag parcial	6884-7137 (cadena complementaria)
LTR	7435-7780 (cadena complementaria)

1	AATGAAGCCT	TCTGCTTCAT	GCATGTGCTC	GTAGTCGTCA	GGGAATCAAC	GGTCCGGCCA
61	TCAACCCAGG	TGCACACCAA	TGTGGTGAAT	GGTCAAAATGG	CGTTTATTGT	ATCGAGCTAG
121	GCACTTAAAT	ACAATATCTC	TGCAATGCGG	AATTCAGTGG	TTCGTCCAAT	CCGTCCCCCT
181	CCCTATGCAA	AAGCGAAACT	ACTATATCTC	GAGGGGACTC	CTAACCCGCT	ACAACCAAG
241	CCCCGCTTTT	CGCCTAAACA	TGCTATTGTC	CCCTCAGTCA	AGCCTTGCCC	GTTACAACCC
301	GATTGCGAAG	CCTTGCCCTC	CCCACATTAT	CCGTAGCATT	ATTTCTTAGC	AGTCATCAGA
361	GCTACAGAAG	ATACTCTATG	CTGTAGCCAA	GTCTACAAGT	TTACTATTCA	GCGACCTCCT
421	ATATTCCGCG	TGCCAGCCGA	TCAATTACCA	ATCCAACCAG	CTATCACACG	GAATACAAGA
481	ACTCGCCTAC	GCTCTTCTTT	CGGGCTGCTT	ATAAGCCTCC	TGTAATTTTT	TTATATTCTT
541	CGCTCGAGTC	TCTTCAGAAT	GGCACAGCAC	CGCTGCAGAA	AAATGCCAGG	TGGACTATGA
601	ACTCACATCC	AAAGGAGCTT	GACCTGATAC	CTGATTTTCT	TCAAACAGGG	GAAACAACAC
661	AATCCCACAA	AACAGCTCAG	AGAGAAAACA	TCACTGATGG	CTACAGCACC	AAGGTATGCA
721	ATGGCAATCC	ATTCGACATT	CATCTGTGAC	CTGAGCAAAA	TGATTTATCT	CTCCATGAAT
781	GGTTGCTTCT	TTCCCTCATG	AAAAGGCAAT	TTCCCACTC	ACAATATGCA	ACAAAGACAA
841	ACAGAGAACA	ATTAATGTGC	TCCTTCCTAA	TGTTAAAATT	GTAGTGCCAA	AGAGGAGAAC
901	AAAATCTCAA	GTTCTGAGTA	GGTTTTAGTG	ATTGGATAAG	AGGCTTTGAC	CTGTGAGCTC
961	ACCTGGACTT	CATATCCTTT	TGGATAAAAA	GTGCTTTTAT	AACTTTTAGG	TCTCCGAGTC
1021	TTTATTCATG	AGACTGTTGG	TTTAGGGACA	GACCCACAAT	GAAATGCCTG	GCATAGGAAA
1081	GGGCAGCAGA	GCCTTAGCTG	ACCTTTTCTT	GGGACAAGCA	TTGTCAAACA	ATGTGTGACA
1141	AAACTATTTG	TACTGCTTTG	CACAGCTGTG	CTGGGCAGGG	CAATCCATTG	CCACCTATCC
1201	CAGGTAACCT	TCCAAC TGCA	AGAAGATTGT	TGCTTACTCT	CTCTAGACCC	CCAAGTCAAA
1261	CCAACATATG	AGGTATGCTG	ACAACACTAT	GATGACAGCC	TGTTCTGATC	AAGATCTCAT
1321	TTGTTCATGG	ACAATTTTTG	TTGCTTGACG	CTGGTCTTCC	ATTGGGAAAG	AGTGTAGTAT
1381	ATCCTTCTCA	TCTGACAGAA	AAGCAGAAAT	TCTCATGCTC	CACACTTAAT	CTACATTGTT
1441	TTAACACC	GGTACTTCT	TGGAGAGGAA	AAATGGCTTT	TATAAGACTC	ACAAAACAAA
1501	GCTCTGCAAG	TCAAATGCAT	ACAAAAC TGT	TCTGTAGGTC	TGGAATCAGG	ACACTATGTG
1561	GAAGTCAAAT	AGAGCAGCTT	TAAAAAGCCT	TTGGGATCAT	TCTCATCTTA	TATTTGCAGC
1621	ACGATACTAT	GACAGTGATA	ACTGACATAA	CTGCATCAAT	TTCCTTGATA	TTTTATTTGT
1681	CTTAAAGTAC	AAGACATAGA	GATGGACGTA	AAGATGGACA	TATGACTCAG	GTCTGGACAG
1741	GTCCGTGGTC	CATGTATGAT	AAAAGAGATG	AAGGGAAGGA	GAATTGAGAC	TGTCTAAGAA
1801	GGGCTTCAGG	GACGTTCTGA	AGGCAGATTT	GACTGAATCA	GATGTACTGT	CCAAGTCTCA
1861	TATGTAGCAA	TGGAAGGCTG	ATATTGGAGA	AATATAAAGA	AATGGCTGTG	AACTCAAAGT
1921	GACCCTGAAC	AGAAAAGGGA	TATGGAGTTA	AAATAATGTC	ACAGAACTGA	GGTTTATATG
1981	ATATAACATG	GGCTGCAGAG	GGTCAGAGTG	CTCCACCATG	GGCCTCTCTT	GGGCTGCAGG
2041	GAACTTCTGT	TCTACACCTG	GAACACCTCC	TGCCCTCCTC	CGCACTGACC	TCAGTGTGAT
2101	CAGGGCTGTT	TCTCTCACAT	TTTCTCACTC	ACCTCTCCCA	ACTACCATTG	TACAGCAGTT
2161	GTTCTTACAT	ATTGCTCCTC	CTGAGGTACA	TCTAGCATCG	TTAAGTCTCT	AGACTTGGCA
2221	AGGAGAATGT	AGATTTCCAC	AGTATATATG	TTTTCACAAA	AGGAAGGAGA	GAAACAAAAG
2281	AAAATGGCAC	TGACTAAACT	TCAGCTAGTG	GTATAGGAAA	GTAATTCTGC	TTAACAGAGA
2341	TTGCAGTGAT	CTCTATGTAT	GTCCTGAAGA	ATTATGTTGT	ACTTTTTTCC	CCCATTTTTA
2401	AATCAAACAG	TGCTTTACAG	AGGTGAGAAT	GGTTTCTTTA	CTGTTTGTCA	ATTCTATTAT
2461	TTCAATACAG	AACAATAGCT	TCTATAACTG	AAATATATTT	GCTATTGTAT	ATTATGATTG
2521	TCCCTCGAAC	CATGAACACT	CCTCCAGCTG	AATPTCACAA	TTCTCTGTG	ATCTGCCAGG
2581	CCATTAAAGTT	ATTCATGGAA	GATCTTTGAG	GAACACTGCA	AGTTCATATC	ATAAACACAT
2641	TTGAAATGGA	GTATTGTTTT	GCATTGTATG	GAGCTATGTT	TTGCTGTATC	CTCAGAATAA
2701	AAGTTTGTTA	TAAAGCATTC	ACACCCATAA	AAAGATAGAT	TTAAATATTC	CAACTATAGG
2761	AAAGAAAGTG	TGTCTGCTCT	TCACTCTAGT	CTCAGTTGGC	TCCTTCACAT	GCACGCTTCT
2821	TTATTTCTCC	TATTTTGTCA	AGAAAATAAT	AGGTCAAGTC	TTGTTCTCAT	TTATGTCTTG

2881 TCTAGCGTGG CTCAGATGCA CATTGTACAT ACAAGAAGGA TCAAATGAAA CAGACTTCTG  
2941 GTCTGTTACT ACAACCATAG TAATAAGCAC ACTAACTAAT AATTGCTAAT TATGTTTTCC  
3001 ATCTCCAAGG TTCCCACATT TTTCTGTTTT CTFAAAGATC CCATTATCTG GTTGTAAGTG  
3061 AAGCTCAATG GAACATGAGC AATATPTTCC AGTCTTCTCT CCCATCCAAC AGTCTTGATG  
3121 GATTAGCAGA ACAGGCAGAA AACACATTGT TACCCAGAAT TAAAACTAA TATTTGCTCT  
3181 CCATTCAATC CAAAATGGAC CTATTGAAAC TAAAACTAA CCCAATCCCA TTAAATGATT  
3241 TCTATGGTGT CAAAGGTCAA ACTTCTGAAG GGAACCTGTG GGTGGGTCAC AATTCAGACT  
3301 ATATATTCCC CAGGGCTCAG CCAGTGTCTG TACATACAGC TAGAAAGCTG TATTGCCTTT  
3361 AGCAGTCAAG CTCGAAAGGT AAGCAACTCT CTGGAATTAC CTCTCTCTTA TATTAGCTCT  
3421 TACTTGACC TAAACTTTAA AAAATTAACA ATTATTGTGC TATGTGTTGT ATCTTTAAGG  
3481 GTGAAGTACC TCGGTGATAC CCCCTATAAA AACTTCTCAC CTGTGTATGC ATTCTGCACT  
3541 ATTTTATTAT GTGTAAAAGC TTTGTGTTTG TTTTCAGGAG GCTTATTCTT TGTGCTTAAA  
3601 ATATGTTTTT AATTTTCAGAA CATCTTATCC TGTCGTTTAC TATCTGATAT GCTTTGCAGT  
3661 TTGCTTGATT AACTTCTAGC CCTACAGAGT GCACAGAGAG CAAAATCATG GTGTTAGTG  
3721 AATTCGCGG AGTTATTTTA ATGTGAAAAT TCTCTAGAAG TTTAATTCTT GCAAAGTGCA  
3781 GCTGCTGATC ACTACACAAG ATAAAAATGT GGGGGGTGCA TAAACGTATA TTCTTACAAT  
3841 AATAGATACA TGTGAACTTA TATACAGAAA AGAAAAATGAG AAAAAATGTT GTGTGTATAC  
3901 TCACACACGT GGTTCAGTAAA AACTTTTTGAG GGGTTTAATA CAGAAAATCC AATCCTGAGG  
3961 CCCCAGCACT CAGTACGCAT ATAAAGGGCT GGGCTCTGAA GGACTTCTGA CTTTCACAGA  
4021 TTATATAAAT CTCAGGAAAG CAACTAGATT CATGCTGGCT CAAAAGCTG TGCTTTATAT  
4081 AAGCACACTG GCTATACAAT AGTTGTACAG TTCAGCTCTT TATAATAGAA ACAGACAGAA  
4141 CAAGTATAAA TCTTCTATTG GTCTATGTCA TGAACAAGAA TTCATTGAGT GGCTCTGTTT  
4201 TATAGTAAAC ATTGCTATTT TATCATGTCT GCATTTCTCT TCTGTCTGAA TGTCAACACT  
4261 AAAATTTAAC TCCACAGAAA GTTTATACTA CAGTACACAT GCATATCTTT TGTCAAAGCA  
4321 AACCATACCT GAAAGTGCAA TAGAGCAGAA TATGAATTAC ATGCGTGTCT TTCTCCTAGA  
4381 CTACATGACC CCATATAAAT TACATTCCTT ATCTATTCTG CCATCACCAA AACAAAGGTA  
4441 AAAATACTTT TGAAGATCTA CTCATAGCAA GTAGTGTGCA ACAAACAGAT ATTTCTCTAC  
4501 ATTTATTTTT AGGGAATAAA AATAAGAAAAT AAAATAGTCA GCAAGCCTCT GCTTTCTCAT  
4561 ATATCTGTCC AAACCTAAAG TTTACTGAAA TTTGCTCTTT GAATTTCCAG TTTTGAAGC  
4621 CTATCAGATT GTGTTTTAAT CAGAGGTAAT GAAAAGTATC AATGAATTCT AGCTTTCACT  
4681 GAACAAAAAT ATGTAGAGGC AACTGGCTTC TGGGACAGTT TGCTACCCAA AAGACAACCTG  
4741 AATGCAAATA CATAAATAGA TTTATGAATA TGGTTTTGAA CATGCACATG AGAGGTGGAT  
4801 ATAGCAACAG ACACATTACC ACAGAATTAC TTTAAAACTA CTTGTTAACA TTTAATTGCC  
4861 TAAAACTGC TCGTAATTTA CTGTTGTAGC CTACCATAGA GTACCCTGCA TGGTACTATG  
4921 TACAGCATTC CATCCTTACA TTTTCACTGT TCTGTGTTT GCTCTAGACA ACTCAGATT  
4981 CACCAATGAA ATGCGTPTCT TGGGTTGGT TGGTGTGTTG GPTCTGTGGA CCTGCAGTTC  
5041 CGAGGGGTCC GGAGGGAAAC TGACAGCTGT GGATCCAGAA ACAAACATGA ATGTCAGTGA  
5101 AATTATCTCT TACTGGGGAT TCCCTAGTGA GGAATACCTA GTTGAGACAG AAGATGGATA  
5161 TATTCTGTGC CTTAACCGAA TTCTCATGG GAGGAAGAAC CATTCTGACA AAGGTCCCAA  
5221 ACCAGTTGTC TTCTGCAAC ATGGCTTGCT GGCAGATTCT AGTAACTGGG TCACAAACCT  
5281 TGCCAACAGC AGCCTGGGCT TCATTCTTGC TGATGCTGGT TTTGACGTGT GGATGGGCAA  
5341 CAGCAGAGGA AATACCTGGT CTCGGAAACA TAAGACACTC TCAGTTTCTC AGGATGAATT  
5401 CTGGGCTTTC AGTTATGATG AGATGGCAAA ATATGACCTA CCAGCTTCCA TTAACTTCAT  
5461 TCTGAATAAG ACTGGCCAAG AACAAAGTGA TTATGTGGGT CATTCTCAAG GCACCACTAT  
5521 AGGTTTTATA GCATTTTCAC AGATCCCTGA GCTGGCTAAA AGGATTAATA TGTTTTTTGC  
5581 CCTGGTCTCT GTGGCTTCCG TCGCTTCTG TACTAGCCCT ATGGCCAAAC TGGGACGACT  
5641 GCCAGATCAT CTCATTAAGG ACCTCTTGG AGACAAAAGAA TTTCTTCCCC AGAGTGCCTT  
5701 TTTGAAGTGG CTGGGTACCC ACGTTTGCAC TCATGTCATA CTGAAGGAGC TCTGTGAAAA  
5761 TCTCTGTTTT CTCTGTGTG GATTTAATGA GAGAAAATTA AATATGTCTA GAGTGGATGT  
5821 GTATAACA CAATCTCCTG CTGGAACCTC TGTGCAAAAC ATGTTACACT GGAGCCAGGC  
5881 TGTTAAATTC CAAAAGTTTC AAGCCTTTGA CTGGGGAAGC AGTGCCAAGA ATTATTTTCA  
5941 TTACAACCAG AGTTATCCTC CCACATACAA TGTGAAGGAC ATGCTTGTGC CGACTGCAGT  
6001 CTGGAGCGGG GGTACGACT GGCTTGCAGA TGCTACGAC GTCAATATCT TACTGACTCA  
6061 GATCACC AAC TTGGTGTTC ATGAGAGCAT TCCGGAATGG GAGCATCTTG ACTTCATTTG  
6121 GGGCTGGAT GCCCTTGGG GGCTTTATAA TAAGATTATT AATCTAATGA GGAAATATCA  
6181 GTGATTCGAA GCGGCCGAA GAAGAAAGCT GAAAACTCT GTCCCTTCCA CAAAGCCCA  
6241 GAGCACTGTA GTATCAGGG TAAAAAGAAA AGPATGTTAT CTGCTGCATC CAGACTTCAT  
6301 AAAAGCTGGA GCTTAATCTA GAAAAAAT GAGAAAAGAAA TTACTGTGTG AGAAGAGGTG  
6361 CAATTCACCT TTCTTTTACA CAGAGTAATA CTGGTAACTC ATGGATGAAG GCTTAAGGGA  
6421 ATGAAATGG ACTCACAGTA CTGAGTCATC AACTGAAAA ATGCAACCTG ATACATCAGC  
6481 AGAAGGTTTA TGGGGGAAAA ATGCAGCCTT CCAATTAAGC CAGATATCTG TATGACCAAG

## ES 2 627 535 T3

```
6541 CTGCTCCAGA ATTAGTCACT CAAAATCTCT CAGATTAAAT TATCAACTGT CACCAACCAT
6601 TCCTATGCTG ACAAGGCAAT TGCTTGTTCT CTGTGTTTCCT GATACTACAA GGCTCTTCCT
6661 GACTTCCTAA AGATGCATTA TAAAAATCTT ATAATTCACA TTTCTCCCTA AACTTTGACT
6721 CAATCATGGT ATGTTGGCAA ATATGGTATA TTACTATTCA AATTGTTTTT CTTGTACCCA
6781 TATGTAATGG GTCTTGTGAA TGTGCTCTTT TGTTCCTTTA ATCATAATAA AAACATGTTT
6841 AAGCAAACAC TTTTCACTTG TAGTATTTGA AGGTACCGGA TCTCGAGCCG CCTTCAATGC
6901 CCCCCAAACC AATCCCCAGG TTTTAACTC TCCCGATTTT CCAAGTACCA TAGCCCGCTG
6961 AGAGAGCGCC GCGGTAATGG GATCCCAGGA CCCCAGGGAA TATAAGTCTG AGGGGGACGT
7021 AAGCAACCCT TCCTTTTGTA ACAGGGACAA CATAGCCCCT ATTTCTTCTT TAGAAGGAGA
7081 GGTTCCTCCG CAATAGGTCT TACACGCGGA CGAAATCACC TTTATGACGG CTTCCATGCT
7141 TGATCCACCG GGCGACCGGA ATCACGCAGA GCAACCGGAA TCACGCCTGG GGTGGACCGC
7201 TCAGTCGTCG GGCTTCCTTC CCGTCTTCCA ACGACTCTCT GAGTTCTCGG TAGGGTATGT
7261 TGGCCCCCTG CAGTAGGGCT CCCTCCGACG CCACTCAGCT TCTGCCCTCC TAAGCCGCAG
7321 CCCCCTCTAC TAGGGTCATC GTCCGCTCCC CGAATAAGCG AGACGGATGA GGACAGGATC
7381 GCCACGCCGC CTGTGGCCGA CCACTATTCC CTAACGATCA CGTCGGGGTC ACCAAATGAA
7441 GCCTTCTGCT TCATGCATGT GCTCGTAGTC GTCAGGGAAT CAACGGTCCG GCCATCAACC
7501 CAGGTGCACA CCAATGTGGT GAATGGTCAA ATGGCGTTTA TTGTATCGAG CTAGGCACTT
7561 AAATACAATA TCTCTGCAAT GCGGAATTCA GTGGTTCGTC CAATCCGTGT TAGACCCGTC
7621 TGTTGCCTTC CTAACAAGGC ACGATCATA CACGATCATA CCACCTTACT CCCACCAATC
7681 GGCATGCACG GTGCTTTTTT TCTCCTTATA AGGCATGTTG CTAACTCATC GTTACATAAG
7741 CATGTTGCAA GACTACAAGA GTATTGCATA AGACTACATT
```

(SEQ ID NO:7)

## Figura 5

**Secuencia de ADN de pALVIN-OV-1.1-I (10762 pb)**

<b>Característica</b>	<b>Localización (pb)</b>
Stuffer	1-2734
OV 3'UTR	2750-3423
CDS gag parcial	3435-3688 (cadena complementaria)
LTR	3986-4331 (cadena complementaria)
Gen.de resistencia a ampicilina	5795-6652 (cadena complementaria)
SIN LTR	7434-7606 (cadena complementaria)
Promotor de OV	7975-9106
Intron	9154-10742
ATG de ovoalbúmina o POI	10760-10762

```

1  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
61  nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
121 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
181 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
241 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
301 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
361 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
421 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
481 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
541 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
601 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
661 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
721 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
781 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
841 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
901 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
961 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1021 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1081 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1141 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1201 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1261 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1321 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1381 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1441 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1501 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1561 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1621 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1681 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1741 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1801 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1861 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1921 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
1981 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2041 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2101 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2161 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2221 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2281 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2341 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2401 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2461 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2521 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2581 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2641 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
2701 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnTTCGA AGCGGCCGCA AGAAGAAAGC
2761 TGAAAAACTC TGTCCCTTCC AACAAGACCC AGAGCACTGT AGTATCAGGG GTAAAATGAA
    
```

ES 2 627 535 T3

2821 AAGTATGTTA TCTGCTGCAT CCAGACTTCA TAAAAGCTGG AGCTTAATCT AGAAAAAAAA  
2881 TCAGAAAGAA AATFACACTGT GAGAACAGGT GCAATTCACT TTTCTTTTAC ACAGAGTAAT  
2941 ACTGGTAACT CATGGATGAA GGCTTAAGGG AATGAAATTG GACTCACAGT ACTGAGTCAT  
3001 CACACTGAAA AATGCAACCT GATACATCAG CAGAAGGTTT ATGGGGGAAA AATGCAGCCT  
3061 TCCAATTAAG CCAGATATCT GTATGACCAA GCTGCTCCAG AATTAGTCAC TCAAAAATCTC  
3121 TCAGATTAATA TTATCAACTG TCACCAACCA TTCCTATGCT GACAAGGCAA TTGCTTGTTT  
3181 TCTGTGTTCC TGATACTACA AGGCTCTTCC TGACTTCCTA AAGATGCATT ATAAAAATCT  
3241 TATAATTCAC ATTTCTCCCT AAACCTTGAC TCAATCATGG TATGTTGGCA AATATGGTAT  
3301 ATTACTATTC AAATTGTTTT CCTTGTAACC ATATGTAATG GGCTTTGTGA ATGTGCTCTT  
3361 TTGTTCCTTT AATCATAATA AAAACATGTT TAAGCAAAACA CTTTTCACTT GTAGTATTTG  
3421 AAGGTACCGG ATCTCGAGCC GCCTTCAATG CCCCCAAAAC CAATCCCCAG GTTTTTAACT  
3481 CTCCCATTGTT TCCAAGTACC ATAGCCCCTG GAGAGAGCGC CGCGGTAATG GGATCCCAGG  
3541 ACCCCGGGGA ATATAAGTCT GAGGGGGACG TAAGCAACC TTCCTTTTGT AACAGGGACA  
3601 ACATAGCCCC TATTTCCCTC TTAGAAGGAG AGGTTTTCCC GCAATAGGTC TTACACGCGG  
3661 ACGAAATCAC CTTTATGACG GCTTCCATGC TTGATCCACC GGGCGACCGG AATCACGCAG  
3721 AGCAACCGGA ATCACGCCTG GGGTGGACCG CTCAGTCGTC GGGCTTCCTT CCCGTCTTCC  
3781 AACGACTCTC TGAGTTCTCG GTAGGGTATG TTGGCCCCCT GCAGTAGGGC TCCCTCCGAC  
3841 GCCACTCAGC TTCTGCCCTC CTAAGCCGCA GCCCCTCTA CTAGGGTCAT CGTCCGCTCC  
3901 CCGAATAAGC GAGACGGATG AGGACAGGAT CGCCACGCCG CCTGTGGCCG ACCACTATTC  
3961 CCTAACGATC ACGTCGGGGT CACCAAATGA AGCCTTCTGC TTCATGCATG TGCTCGTAGT  
4021 CGTCAGGGAA TCAACGGTCC GGCCATCAAC CCAGGTGCAC ACCAATGTGG TGAATGGTCA  
4081 AATGGCGTTT ATTGTATCGA GCTAGGCACT TAAATACAAT ATCTCTGCAA TCGGGAATTC  
4141 AGTGGTTCGT CCAATCCGTG TTAGACCCGT CTGTTGCCTT CCTAACAAAG CACGATCATA  
4201 CCACGATCAT ACCACCTTAC TCCCACCAAT CGGCATGCAC GGTGCTTTTT CTCTCTTAT  
4261 AAGCATGTT GCTAACTCAT CGTTACATAA GCATGTTGCA AGACTACAAG AGTATTGCAT  
4321 AAGACTACAT TTCCCCCTCC CTATGCAAAA GCGAAACTAC TATATCTGA GGGACTCCT  
4381 AACC CGGTAC AACCGAAGCC CCGCTTTTCG CCTAAACATG CTATTGTCCC CTCAGTCAAG  
4441 CCTTGCCCGT TACAACCCGA TTCGCAAGCC TTGCCCTCCC CACATPATCC GTAGCATTAT  
4501 TTCCTAGCAG TCATCAGAGC TACAGAAGAT ACTCTATGCT GTAGCCAAGT CTACAAGTTT  
4561 ACTATTCAGC GACCTCCTAT ATTCCGCGTG CCAGCCGATC AATTACCAAT GCGCGCTTGG  
4621 CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCACACA  
4681 ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTCA  
4741 CATTAATTGC GTPGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG AAACCTGTCTG TGCCAGCTGC  
4801 ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTFCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT  
4861 CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGTTCGGTCC TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGTCTACT  
4921 CAAAGCCGGT AATACGGTTA TCCACGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG  
4981 CAAAAGGCCA GCAAAAAGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG TTTTCCATA  
5041 GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAAACC  
5101 CGACAGGACT ATAAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG  
5161 TTCCGACCTT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC  
5221 TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCCGGTGA GGTGTTTCGC TCCAAGCTGG  
5281 GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTATCCGGT AACTATCGTC  
5341 TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA  
5401 TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG  
5461 GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA  
5521 AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG  
5581 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT  
5641 CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT  
5701 TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT TAAATTAAAA ATGAAGTTTT AAATCAATCT  
5761 AAAGTATATA TGAGTAAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA  
5821 TCTCAGCGAT CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA  
5881 CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC  
5941 GCTCACCAGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA  
6001 GTGGTCTCTG AACTTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG  
6061 TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCACA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG  
6121 TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG  
6181 TTACATGATC CCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGGTCTT CCGATCTGTG  
6241 TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGACTG CATAATCTC  
6301 TTAATGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT  
6361 TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCCAGTT GCTCTTGCCC GCGCTCAATA CGGGATAATA  
6421 CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAGAGTGC TCATCATTTG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA

ES 2 627 535 T3

6481 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA  
6541 ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTTACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC  
6601 AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC  
6661 TTTTTC AATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG  
6721 AATGTATTTA GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC  
6781 CTGACGCGCC CTGTAGCGGC GCATTAAGCG CGGCGGGTGT GGTGGTTACG CGCAGCGTGA  
6841 CCGCTACACT TGCCAGCGCC CTAGCGCCCG CTCCTTTTCG TTTCTTCCCT TCCTTTCTCG  
6901 CCACGTTCGC CGGCTTTCCC CGTCAAGCTC TAAATCGGGG GCTCCCTTTA GGGTTCGGAT  
6961 TTAGTGCTTT ACGGCACCTC GACCCCAAAA AACTTGATTA GGGTGATGGT TCACGTAGTG  
7021 GGCCATCGCC CTGATAGACG GTTTTTTCGCC CTTTGACGTT GGAGTCCACG TTCTTTAATA  
7081 GTGGACTCTT GTTCCAAACT GGAACAACAC TCAACCCTAT CTCGGTCTAT TCTTTTGATT  
7141 TATAAGGGAT TTTGCCGATT TCGGCCTATT GGTAAAAAAA TGAGCTGATT TAACAAAAAT  
7201 TTAACGCGAA TTTTAACAAA ATATTAACGC TTACAATTTT CATTGCCAT TCAGGCTGCG  
7261 CAACTGTTGG GAAGGGCGAT CGGTGCGGGC CTC TTCGCTA TTACGCCAGC TGGCGAAAGG  
7321 GGGATGTGCT GCAAGGCGAT TAAGTTGGGT AACGCCAGGG TTTTCCCAGT CACGACGTTG  
7381 TAAAAACGACG GCCAGTGAGC GCGTATTCCC TAACGATCAC GTCGGGGTCA CCAAATGAAG  
7441 CCTTCTGCTT CATGCATGTG CTCGTAGTCG TCAGGGAATC AACGGTCCGG CCATCAACCC  
7501 AGGTGCACAC CAATGTGGTG AATGGTCAAA TGGCGTTTAT TGTATCGAGC TAGGCACTTA  
7561 AATACAATAT CTCTGCAATG CGGAATTCAG TGGTTCGTCC AATCCGTCCT CCTCCCTATG  
7621 CAAAAGCGAA ACTACTATAT CCTGAGGGGA CTCCTAACCG CGTACAACCG AAGCCCCGCT  
7681 TTTCGCTTAA ACATGCTATT GTCCCTCAG TCAAGCCTTG CCCGTTACAA CCCGATTTCG  
7741 AAGCCTTGCC CTCCCCACAT TATCCGTAGC ATTTATTTCC AGCAGTCATC AGAGCTACAG  
7801 AAGATACTCT ATGCTGTAGC CAAGTCTACA AGTTTACTAT TCAGCGACCT CCTATATTC  
7861 GCGTGCCAGC CGATCAATTA CCAATCCAAC CAGCTATCAC ACGGAATACA AGAAGCTCGC  
7921 TCCCTCTTTC TTTGCGGCTG CTTATAAGCC TCCTGTAATT TTTTATATT CCTCGTTAAG  
7981 TCCTCAGACT TGGCAAGGAG AATGTAGATT TCCACAGTAT ATATGTTTTT AAAAAAGGAA  
8041 GGAGAGAAAAC AAAAGAAAAT GGCCTGACT AAACCTCAGC TAGTGGTATA GGAAAGTAAT  
8101 TCTGCTTAAC AGAGATTGCA GTGATCTCTA TGTATGTCCT GAAGAATTAT GTTGTACTTT  
8161 TTTCCCCCAT TTTTAAATCA AACAGTGCTT TACAGAGGTC AGAATGGTTT CTTTACTGTT  
8221 TGTCAATTCT ATTATTTCAA TACAGAACAA TAGCTTCTAT AACTGAAATA TATTTGCTAT  
8281 TGTATATTAT GATTGTCCCT CGAACCATGA AACTCCTCC AGCTGAATTT CACAATTCCT  
8341 CTGTCATCTG CCAGGCCATT AAGTTATPCA TGGAAGATCT TTGAGGAACA CTGCAAGTTC  
8401 ATATCATATA CACATTTGAA ATTGAGTATT GTTTTGCAAT GTATGGAGCT ATGTTTTGCT  
8461 GTATCCTCAG AATAAAAAGT TGTATAAAAG CATTACACCC CATAAAAAGA TAGATTTAAA  
8521 TATTTCAACT ATAGGAAAAG AAGTGTGTCT GCTCTTCACT CTAGTCTCAG TTGGCTCCTT  
8581 CACATGCACG CTCTTTTATT TCTCCTATTT TGTCAGAAA ATAATAGGTC AAGTCTTGTT  
8641 TCATTTATG TCCTGTCTAG CGTGGCTCAG ATGCACATTG TACATACAAG TAGGATCAAA  
8701 TGAAACAGAC TTCTGGTCTG TTACTACAAC CATAGTAATA AGCACACTAA CTAATAATTG  
8761 CTAATTATGT TTTCCATCTC CAAGGTTCCC ACATTTTTTCT GTTTTCTTAA AGATCCCATT  
8821 ATCTGGTTGT AACTGAAGCT CAATGGAACA TGAGCAATAT TTCCCAGTCT TCTCTCCCAT  
8881 CCAACAGTCC TGATGGATTA GCAGAACAGG CAGAAAACAC ATTTGTTACCC AGAATTTAAA  
8941 ACTAATATTT GCTCTCCATT CAATCCAAAA TGGACCTATT GAAACTAAAA TCTAACCCAA  
9001 TCCCATTAATA TGATTTCTAT GGTGTCAAAG GTCAAACCTC TGAAGGGAAC CTGTGGGTGG  
9061 GTCACAATTC AGACTATATA TTCCCAGGG CTCAGCCAGT GTCTGTACAT ACAGCTAGAA  
9121 AGCTGTATTG CCTTTAGCAG TCAAGCTCGA AAGGTAAGCA ACTCTCTGGA ATTACCTTCT  
9181 CTCTATATTA GCTCTTACTT GCACCTAAAC TTTAAAAAAT TAACAATTAT TGTGCTATGT  
9241 GTTGTATCTT TAAGGGTGAA GTACCTGCGT GATACCCCTT AAAAAACTT CTCACCTGTG  
9301 TATGCATCTT GCACTATTTT ATTATGTGTA AAAGCTTTGT GTTTGTTTTT AGGAGGCTTA  
9361 TTCTTTGTGC TTAATAATAG TTTTAAATTT CAGAACATCT TATCCTGTCT TTCACCTACT  
9421 GATATGCTTT GCAGTTTGCT TGATTAACTT CTAGCCCTAC AGAGTGCACA GAGAGCAAAA  
9481 TCATGGTGTT CAGTGAATTC TGGGGAGTTA TTTTAAATGTG AAAATTTCTCT AGAAGTTTAA  
9541 TTCTTGCAAAA GTGCAGCTGC TGATCACTAC ACAAGATAAA AATGTGGGGG GTGCATAAAC  
9601 GTATATTCTT ACAATAATAG ATACATGTGA ACTTATATAC AGAAAAGAAA ATGAGAAAAA  
9661 TGTGTGTGTG TATACTCACA CACGTGGTCA GTAAAAACTT TTGAGGGGTT TAATACAGAA  
9721 AATCCAATCC TGAGGCCCCA GCACTCAGTA CGCATATAAA GGGCTGGGCT CTGAAGGACT  
9781 TCTGACTTTC ACAGATTATA TAAATCTCAG GAAAGCAACT AGATTTCATGC TGGCTCCAAA  
9841 AGCTGTGCTT TATATAAGCA CACTGGCTAT ACAAATAGTT TACAGTTCAG CTCTTTATAA  
9901 TAGAAAACAGA CAGAACAAGT AAAAACTTCT TATTGGTCTA TGTCATGAAC AAGAATTCAT  
9961 TCAGTGGCTC TGTTTTATAG TAAACATTGC TATTTTATCA TGCTGCAAT TCTCTTCTGT  
10021 CTGAATGTCA CCACTAAAAT TTAACCTCCAC AGAAAGTTTA TACTACAGTA CACATGCATA  
10081 TCTTTGAGCA AAGCAAACCA TACCTGAAAG TGCAATAGAG CAGAAATATGA ATTACATGCG

## ES 2 627 535 T3

```
10141 TGTCTTTCTC CTAGACTACA TGACCCCAATA TAAATTACAT TCCTTATCTA TTCTGCCATC
10201 ACCAAAACAA AGGTAAAAAT ACTTTTGAAG ATCTACTCAT AGCAAGTAGT GTGCAACAAA
10261 CAGATATTTT TCTACATTTA TTTTATAGGA ATAAAAATAA GAAATAAAAT AGTCAGCAAG
10321 CCTCTGCTTT CTCATATATC TGTCCAAACC TAAAGTTTAC TGAAATTTGC TCTTTGAATT
10381 TCCAGTTTTG CAAGCCTATC AGATTGTGTT TTAATCAGAG GTACTGAAAA GTATCAATGA
10441 ATTCTAGCTT TCACTGAACA AAAATATGTA GAGGCAACTG GCTTCTGGGA CAGTTTGCTA
10501 CCCAAAAGAC AACTGAATGC AAATACATAA ATAGATTTAT GAATATGGTT TTGAACATGC
10561 ACATGAGAGG TGGATATAGC AACAGACACA TTACCACAGA ATTACTTTAA AACTACTTGT
10621 TAACATTTAA TTGCCTAAAA ACTGCTCGTA ATTTACTGTT GTAGCCTACC ATAGAGTACC
10681 CTGCATGGTA CTATGTACAG CATTCCATCC TTACATTTTC ACTGTTCTGC TGTTTGCTCT
10741 AGACAACCTCA GAGTTCACCA TG
```

(SEQ ID NO:8)

## Figura 6

**Secuencia de ADN del adaptador de SBC102 (242 pb)**

Característica	Localización (pb)
De gen de OV	1-149
CDS parcial de hLAL	150-242

```

1   CCCGGGTTGT TAACATTTAA TTGCCTAAAA ACTGCTCGTA ATTTACTGTT GTAGCCTACC
61  ATAGAGTACC CTGCATGGTA CTATGTACAG CATTCCATCC TTACATTTTC ACTGTTCTGC
121 TGTTTGCTCT AGACAACCTCA GAGTTCACCA TGAAAATGCG GTTCTTGGGG TTGGTGGTCT
181 GTTTGGTTCT CTGGACCCTG CATTCCGAGG GGTCCGGAGG GAAACTGACA GCTGTGGATC
241 CT
    
```

(SEQ ID NO:9)

**Figura 7**

**Secuencia de ADN deSyn SBC102 (1575 pb)**

Característica		Localización (pb)				
Promotor parcial de OV		1-355				
hLAL CDS		356-1575				
1	CCATTATCTG	GTTGTAAGT	AAGCTCAATG	GAACATGAGC	AATATTTCCC	AGTCTTCTCT
61	CCCATCCAAC	AGTCCTGATG	GATTAGCAGA	ACAGGCAGAA	AACACATTGT	TACCCAGAAT
121	TAAAAACTAA	TATTTGCTCT	CCATTCAATC	CAAAATGGAC	CTATTGAAAC	TAAAATCTAA
181	CCCAATCCCA	TTAAATGATT	TCTATGGTGT	CAAAGGTCAA	ACTTCTGAAG	GGAACCTGTG
241	GGTGGGCAC	AATTCAGACT	ATATATTCCC	CAGGGCTCAG	CCAGTGTCTG	TACATACAGC
301	TAGAAAAGCTG	TATTGCCTTT	AGCAGTCAAG	CTCGAAAGAC	AACTCAGAGT	TCACCATGAA
361	AATGCGGTTC	TTGGGGTTGG	TGGTCTGTTT	GGTCTCTGG	ACCCTGCATT	CCGAGGGGTC
421	CGGAGGAAA	CTGACAGCTG	TGGATCCTGA	AACAAACATG	AATGTCAGTG	AAATTATCTC
481	TTACTGGGGA	TTCCCTAGTG	AGGAATACCT	AGTTGAGACA	GAAGATGGAT	ATATTCTGTG
541	CCTTAACCGA	ATTCCTCATG	GGAGGAAGAA	CCATTCTGAC	AAAGGTCCCA	AACCAGTTGT
601	CTTCTGCAA	CATGGCTTGC	TGGCAGATTC	TAGTAACTGG	GTCACAAACC	TTGCCAACAG
661	CAGCCTGGGC	TTCATTCTTG	CTGATGCTGG	TTTTGACGTG	TGGATGGGCA	ACAGCAGAGG
721	AAATACCTGG	TCTCGGAAAC	ATAAGACACT	CTCAGTTTCT	CAGGATGAAT	TCTGGGCTTT
781	CAGTTATGAT	GAGATGGCAA	AATATGACCT	ACCAGCTTCC	ATTAACCTCA	TTCTGAATAA
841	GACTGGCCAA	GAACAAGTGT	ATTATGTGGG	TCATTCTCAA	GGCACCACCTA	TAGTTTTTAT
901	AGCATTTTCA	CAGATCCCTG	AGCTGGCTAA	AAGGATTAAT	ATGTTTTTTG	CCCTGGGTCC
961	TGTGGCTTCC	GTCGCCTTCT	GTAAGTACCC	TATGGCCAAA	CTGGGACGAC	TGCCAGATCA
1021	TCTCATTAAAG	GACCTCTTTG	GAGACAAAGA	ATTTCTTCCC	CAGAGTGCCT	TTTTGAAGTG
1081	GCTGGGTACC	CACGTTTGCA	CTCATGTCAT	ACTGAAGGAG	CTCTGTGGAA	ATCTCTGTTT
1141	TCTTCTGTGT	GGATTTAATG	AGAGAAATTT	AAATATGTCT	AGAGTGGATG	TGTATACAAC
1201	ACATTCTCCT	GCTGGAACCT	CTGTGCAAAA	CATGTTACAC	TGGAGCCAGG	CTGTTAAATT
1261	CCAAAAGTTT	CAAGCCTTTG	ACTGGGGAAG	CAGTGCCAAG	AATTATTTTC	ATTACAACCA
1321	GAGTTATCCT	CCCACATACA	ATGTGAAGGA	CATGCTTGTG	CCGACTGCAG	TCTGGAGCGG
1381	GGGTCACGAC	TGGCTTGCAG	ATGTCTACGA	CGTCAATATC	TTACTGACTC	AGATCACCAA
1441	CTTGGTGTTC	CATGAGAGCA	TTCCGGAATG	GGAGCATCTT	GACTTCATTT	GGGGCCTGGA
1501	TGCCCTTGG	AGGCTTTATA	ATAAGATTAT	TAATCTAATG	AGGAAATATC	AGTGATTCTGA
1561	AGCGGCCGCC	CCGGG				

(SEQ ID NO:10)

**Figura 8**

**Secuencia de ADN de promotor de OVR1 (2789 pb)**

<b>Característica</b>		<b>Localización (pb)</b>				
De la región DSHIII del gen de OV		7-1658				
Promotor de OV		1658-2789				
1	CTCGAGTCTC	TTCAGAATGG	CACAGCACCG	CTGCAGAAAA	ATGCCAGGTG	GACTATGAAC
61	TCACATCCAA	AGGAGCTTGA	CCTGATACCT	GATTTTCTTC	AAACAGGGGA	AACAACACAA
121	TCCCACAAAA	CAGCTCAGAG	AGAAACCATC	ACTGATGGCT	ACAGCACCAA	GGTATGCAAT
181	GGCAATCCAT	TCGACATTCA	TCTGTGACCT	GAGCAAAATG	ATTTATCTCT	CCATGAATGG
241	TTGCTTCTTT	CCCTCATGAA	AAGGCAATTT	CCACACTCAC	AATATGCAAC	AAAGACAAAC
301	AGAGAACAAT	TAATGTGCTC	CTTCCTAATG	TTAAAAATTGT	AGTGGCAAAG	AGGAGAACAA
361	AATCTCAAGT	TCTGAGTAGG	TTTTAGTGAT	TGGATAAGAG	GCTTTGACCT	GTGAGCTCAC
421	CTGGACTTCA	TATCCTTTTG	GATAAAAAAGT	GCTTTTATAA	CTTTTCAGGTG	TCCGAGTCTT
481	TATTCATGAG	ACTGTTGGTT	TAGGGACAGA	CCCACAATGA	AATGCCTGGC	ATAGGAAAGG
541	GCAGCAGAGC	CTTAGCTGAC	CTTTTCTTGG	GACAAGCATT	GTCAAACAAT	GTGTGACAAA
601	ACTATTTGTA	CTGCTTTGCA	CAGCTGTGCT	GGGCAGGGCA	ATCCATTGGC	ACCTATCCCA
661	GGTAACCTTC	CAACTGCAAG	AAGATTGTTG	CTTACTCTCT	CTAGACCCCC	AAGTCAAACC
721	AACTATGCAG	GTATGCTGAC	AACACTATGA	TGACAGCCTG	TTCTGATCAA	GACTCTCATT
781	GTTTCATGGAC	AATTTTTGTT	GCTTGCAGCT	GGTCTTCCAT	TGGGAAAGAG	TGTAGTATAT
841	CCTTCTCATC	TGACAGAAAA	GCAGAAATTC	TCATGCTCCA	CACHTAATCT	ACATTGTTTT
901	AAACCACCGG	CTACTTCTTG	GAGAGGAAAA	ATGGCTTTTA	TAAGACTCAC	AAAACAAAGC
961	TCTGCAAGTC	AAATGCATAC	AAAACTGTTC	TGTAGGCTG	GAATCAGGAC	ACTATGTGGA
1021	AGTCAAATAG	AGCAGCTTTA	AAAAGCCTTT	GGGATCATT	TCATCTTATA	TTTGCAGCAC
1081	GATACTATGA	CAGTGATAAC	TGACATAACT	GCATCAATTT	CCTTGATATT	TTATTTGTCT
1141	TAAAGTACAA	GACATAGAGA	TGGACGTAAA	GATGGACATA	TGACTCAGGT	CTGGACAGGT
1201	CCGTGGTCCA	TGTATGATAA	AAGAGATGAA	GGGAAGGAGA	ATTGAGACTG	TCTAAGAAGG
1261	GCTTCAGGGA	CGTTCTGAAG	GCAGATTTGA	CTGAATCAGA	TGTACTGTCC	AAGTCTCATA
1321	TGTAGCAATG	GAAGGCTGAT	ATTGGAGAAA	TATAAAGAAA	TGGCTGTGAA	CTCAAAGTGA
1381	CCCTGAACAG	AAAAGGGATA	TGGAGTTAAA	ATAATGTCAC	AGAACTGAGG	TTTATATGAT
1441	ATACCATGGG	CTGCAGAGGG	TCAGAGTGCT	CCACCATGGG	CCTCTCTTGG	GCTGCAGGGA
1501	ACTTCTGTTC	TACACCTGGA	ACACCTCCTG	CCCTCCTCCG	CACTGACCTC	AGTGTCAATC
1561	GGGCTGTTTC	TCTCACATTT	TCTCACTCAC	CTCTCCCAAC	TACCATTGTA	CAGCAGTTGT
1621	TCTTACATAT	TGCTCCTCCT	GAGGTACATC	TAGCATCGTT	AAGTCCCTCAG	ACTTGGCAAG
1681	GAGAATGTAG	ATTTCCACAG	TATATATGTT	TTCACAAAAG	GAAGGAGAGA	AACAAAAGAA
1741	AATGGCACTG	ACTAAACTTC	AGCTAGTGGT	ATAGGAAAGT	AATTCTGCTT	AACAGAGATT
1801	GCAGTGATCT	CTATGTATGT	CCTGAAGAAT	TATGTTGTAC	TTTTTTCCCC	CATTTTTTAAA
1861	TCAAACAGTG	CTTTACAGAG	GTCAGAATGG	TTTCTTTACT	GTTTGTCAAT	TCTATTATTT
1921	CAATACAGAA	CAATAGCTTC	TATAACTGAA	ATATATTTGC	TATTGTATAT	TATGATTGTC
1981	CCTCGAACCA	TGAACACTCC	TCCAGCTGAA	TTTCACAATT	CCTCTGTCAT	CTGCCAGGCC
2041	ATTAAGTTAT	TCATGGAAGA	TCTTTGAGGA	ACACTGCAAG	TTCATATCAT	AAACACATTT
2101	GAAATTGAGT	ATTGTTTTGC	ATTGTATGGA	GCTATGTTTT	GCTGTATCCT	CAGAATAAAA
2161	GTTTGTATA	AAGCATTAC	ACCCATAAAA	AGATAGATTT	AAATATTCCA	ACTATAGGAA
2221	AGAAAGTGTG	TCTGCTCTTC	ACTCTAGTCT	CAGTTGGCTC	CTTCACATGC	ACGCTTCTTT
2281	ATTTCTCCTA	TTTTGTCAAG	AAAATAATAG	GTCAAGTCTT	GTTCTCATT	ATGTCCTGTC
2341	TAGCGTGGCT	CAGATGCACA	TTGTACATAC	AAGAAGGATC	AAATGAAACA	GACTTCTGGT
2401	CTGTTACTAC	AACCATAGTA	ATAAGCACAC	TAACATAATA	TTGCTAATTA	TTGTTTTCCAT
2461	TCCAAGGTT	CCCACATTTT	TCTGTTTTCT	TAAAGATCCC	ATTATCTGGT	TGTAAGTCAA
2521	GCTCAATGGA	ACATGAGCAA	TATTTCCCAG	TCTTCTCTCC	CATCCAACAG	TCCTGATGGA
2581	TTAGCAGAAC	AGGCAGAAAA	CACATTGTTA	CCCAGAATTA	AAAATAATA	TTTGCTCTCC
2641	ATTCAATCCA	AAATGGACCT	ATTGAAACTA	AAATCTAACC	CAATCCCATT	AAATGATTTT
2701	TATGGTGTCA	AAGGTCAAAC	TTCTGAAGGG	AACCTGTGGG	TGGGTCACAA	TTCAGACTAT
2761	ATATTCCTCA	GGGCTCAGCC	AGTGTCTGT			

(SEQ ID NO: 11)

**Figura 9**

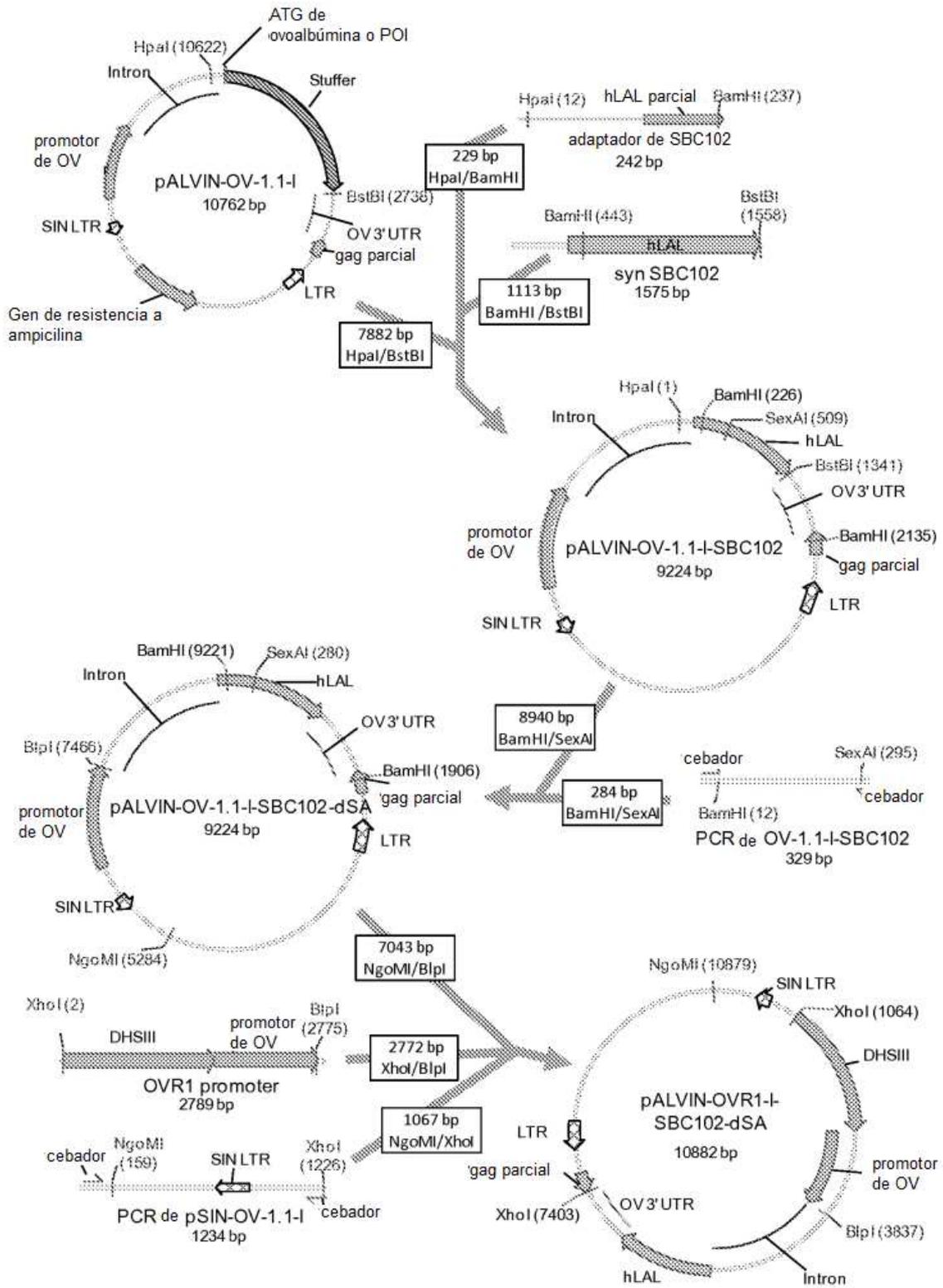
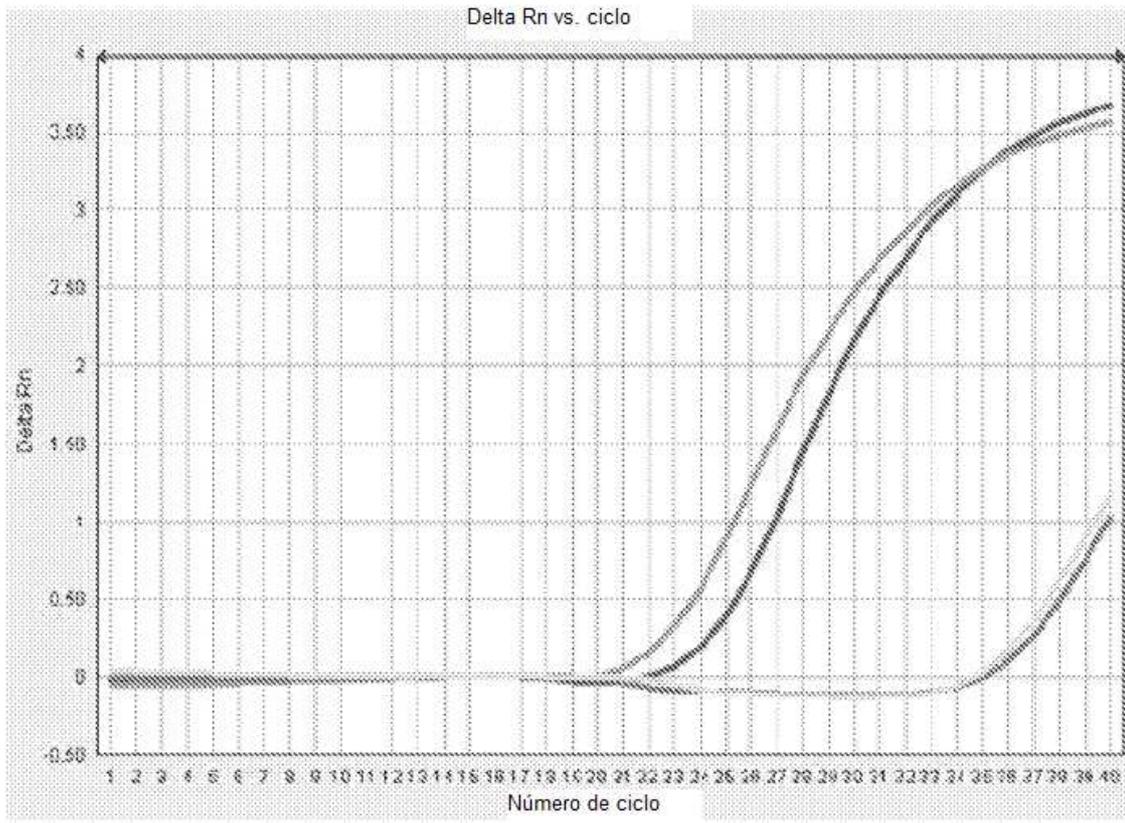
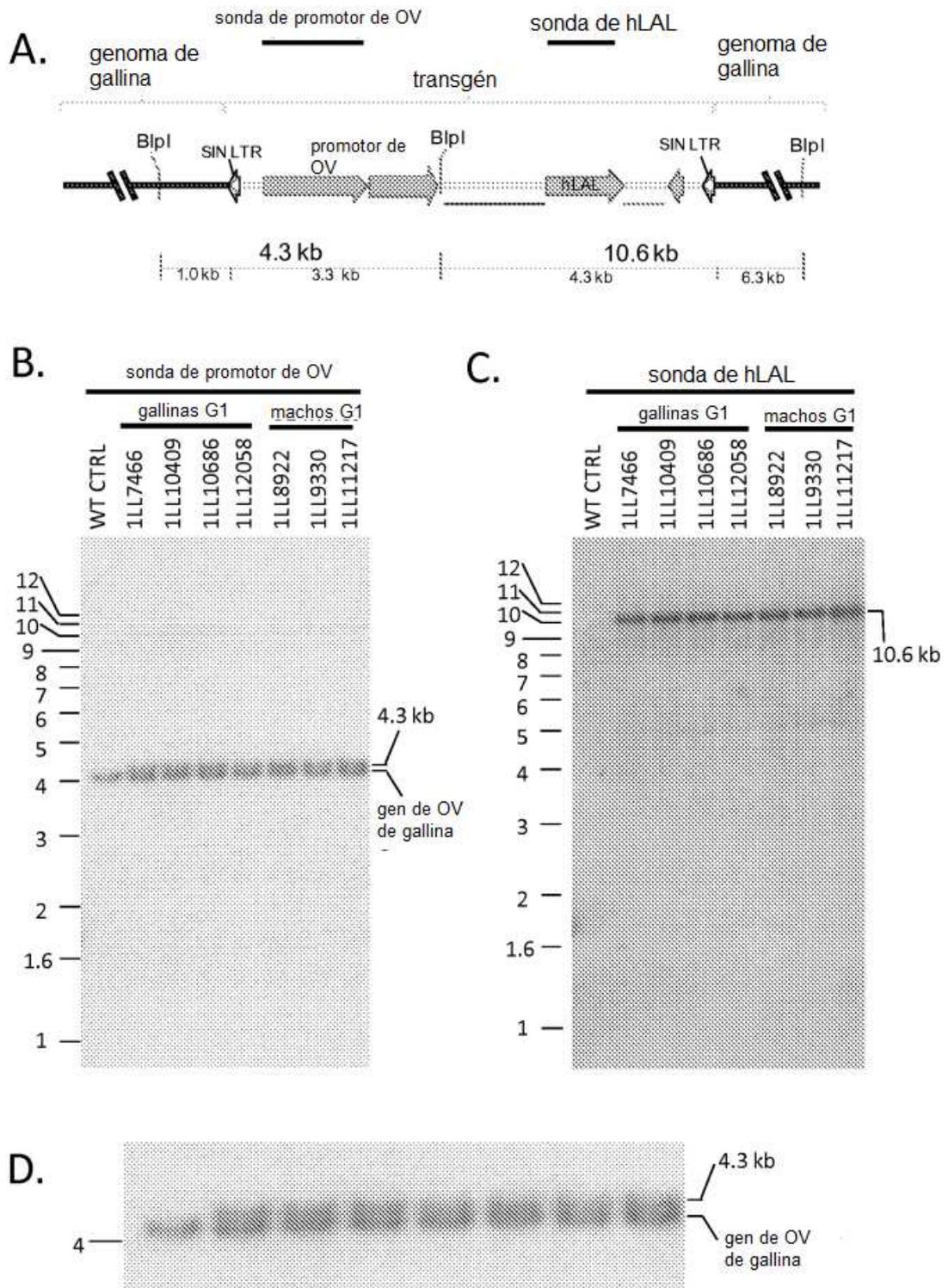


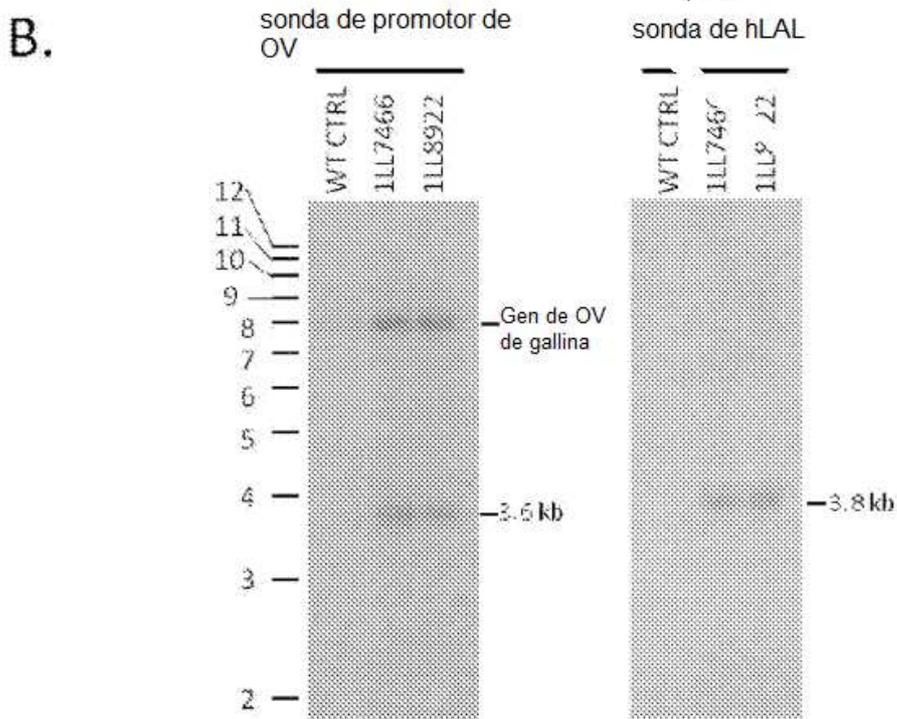
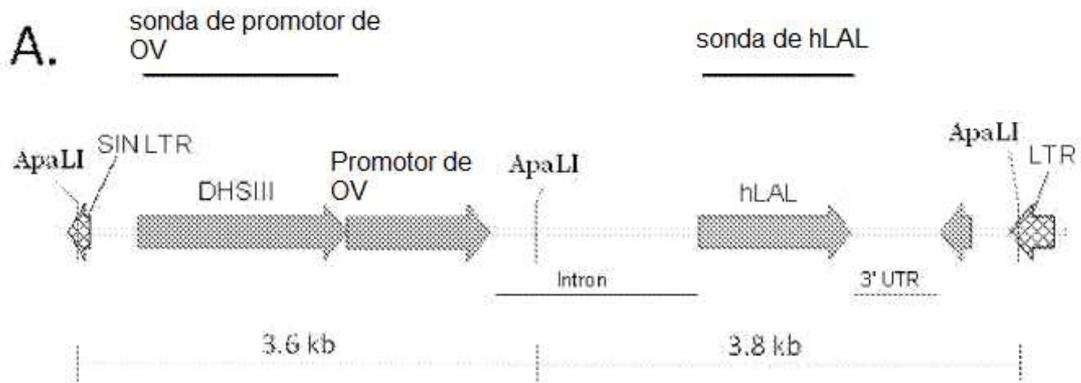
Figura 10



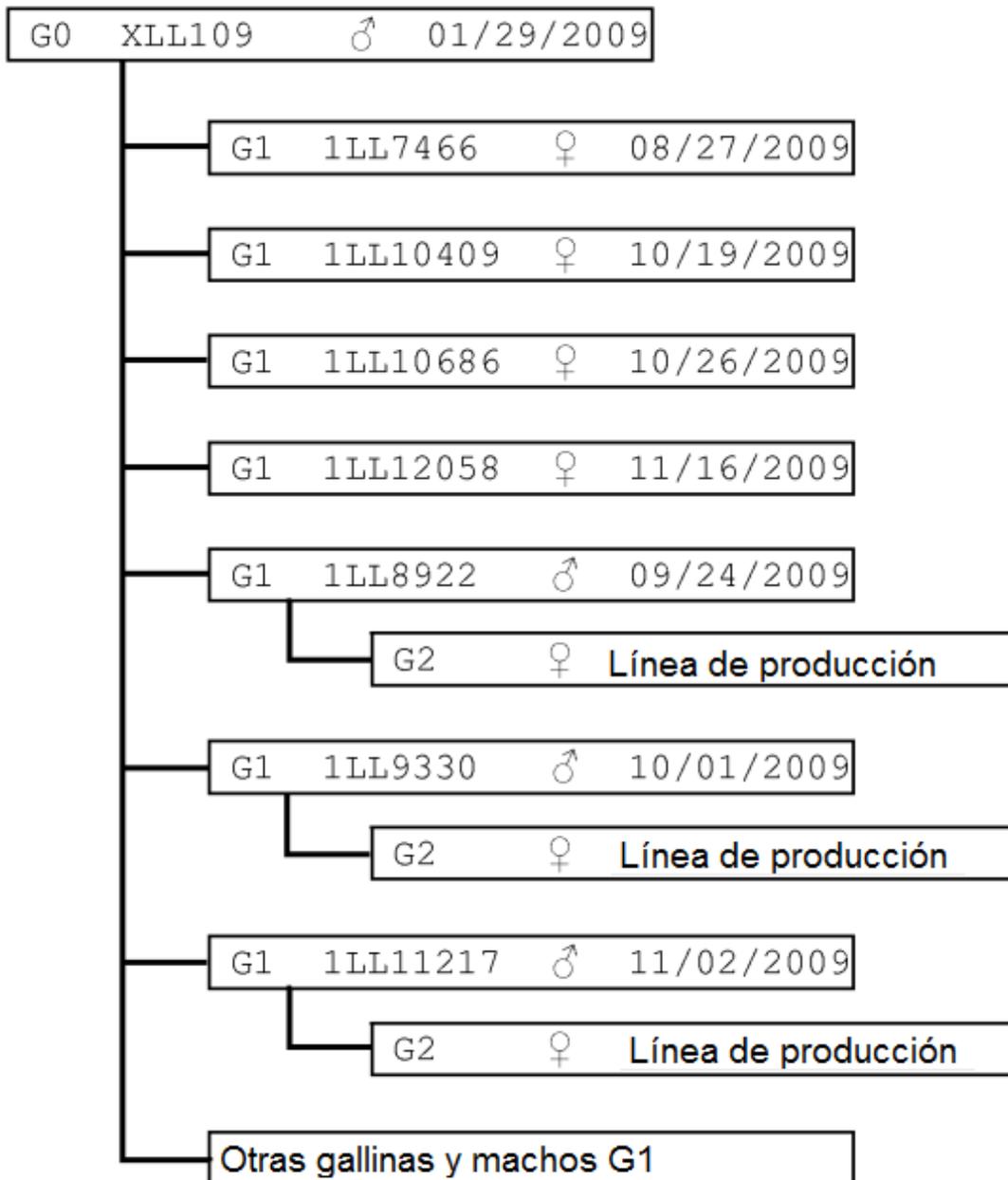
**Figura 11**



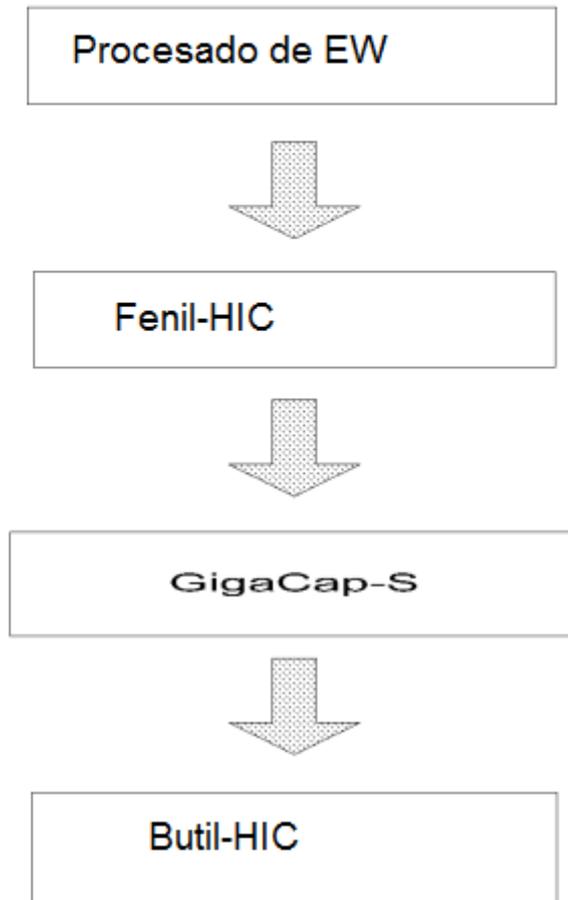
**Figura 12**



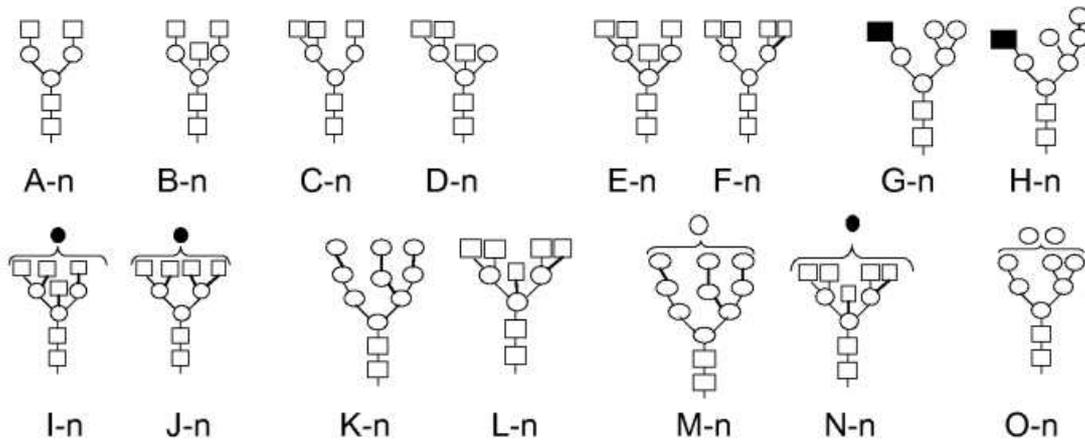
**Figura 13**



**Figura 14**



**Figura 15**



Cuadrado = N-acetil glucosamina

Cuadrado relleno = Manosa-6-fosfato

Círculo = Manosa

Círculo relleno = Galactosa

Triángulo relleno = fucosa

**Figura 16**

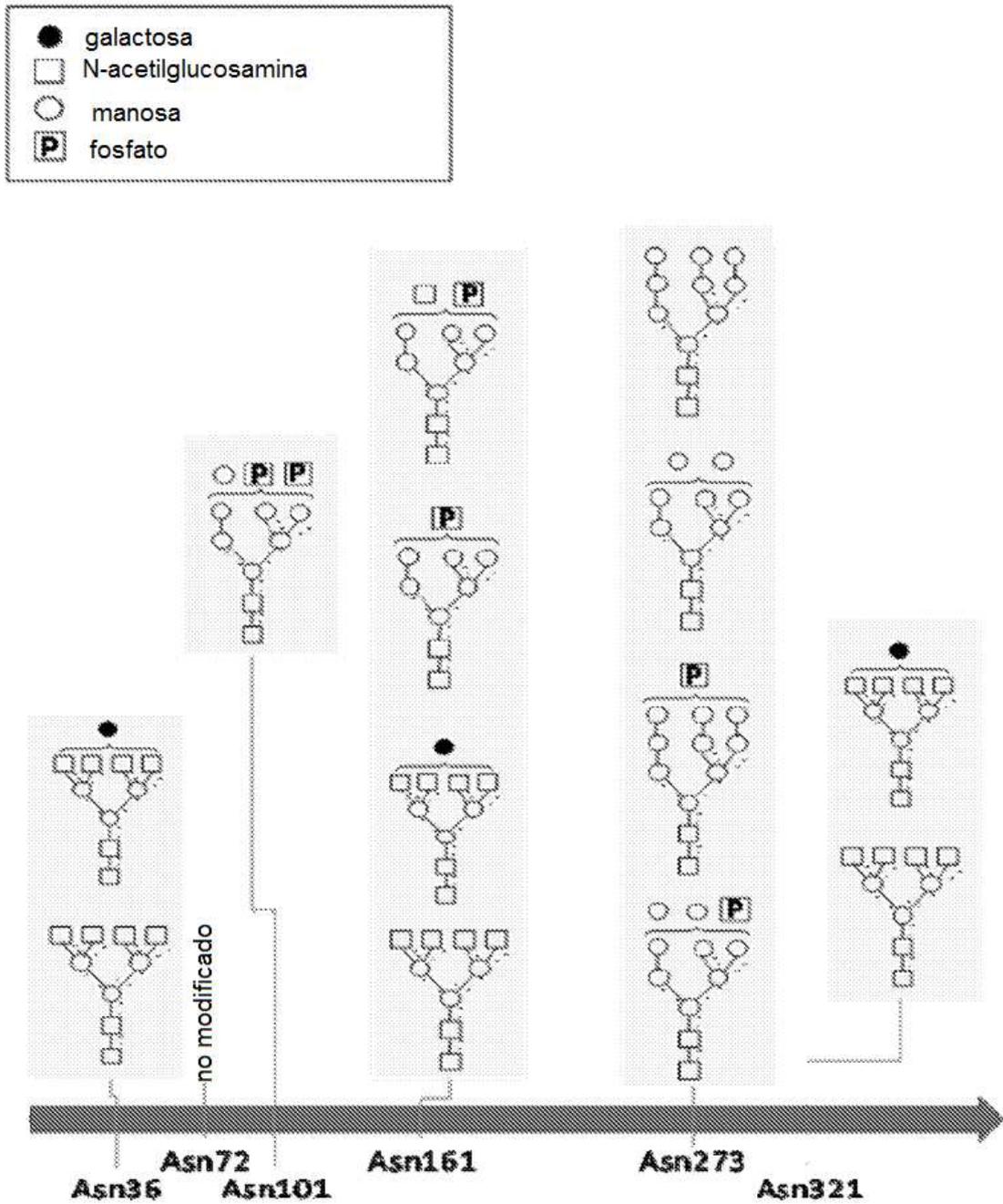
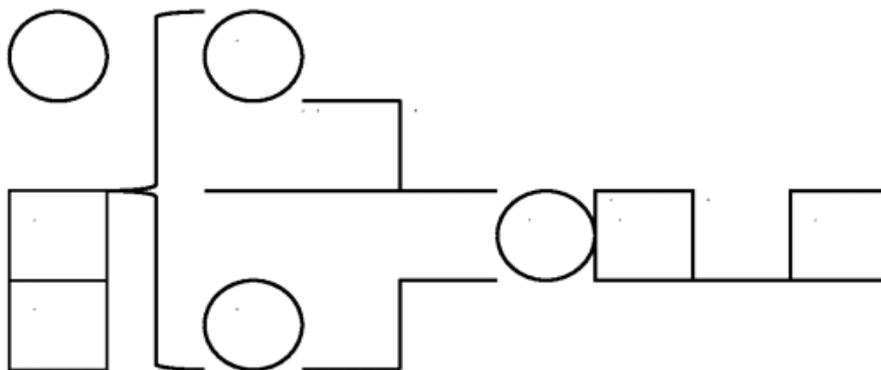
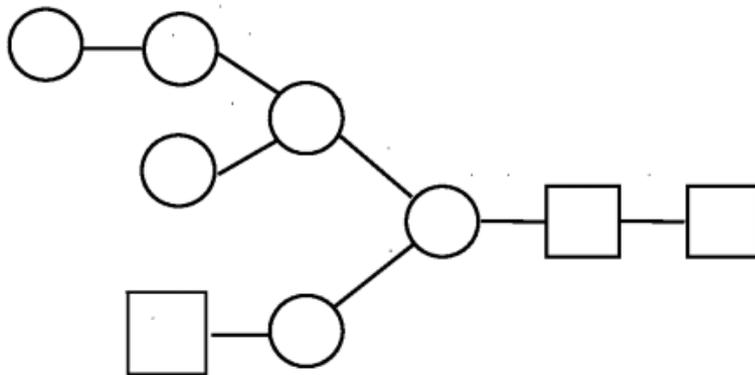
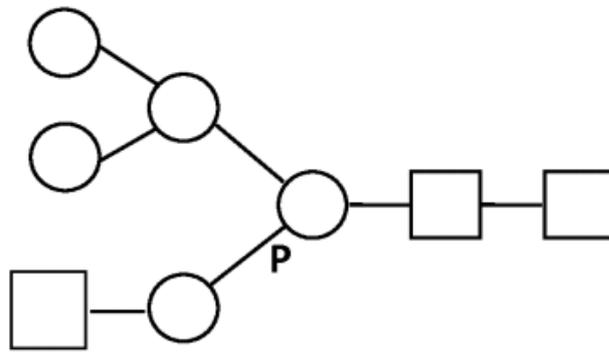


Figura 17



**Figura 18**

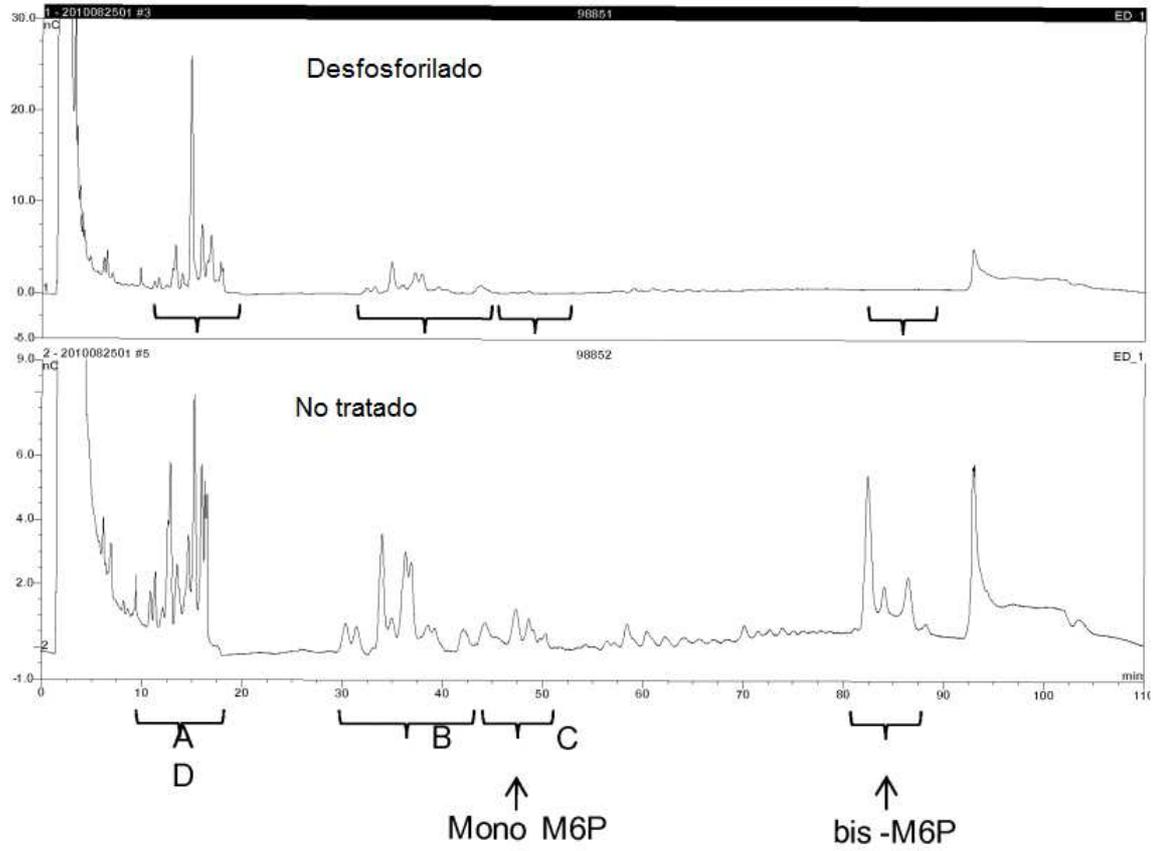
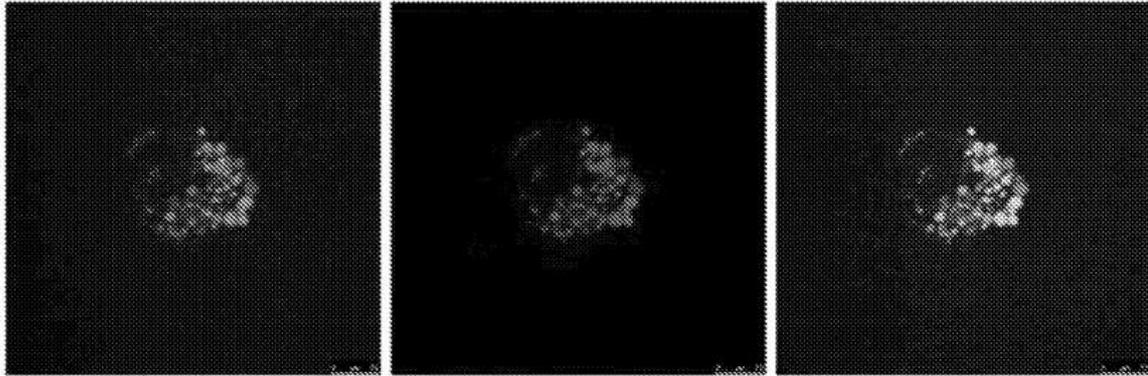


Figura 19

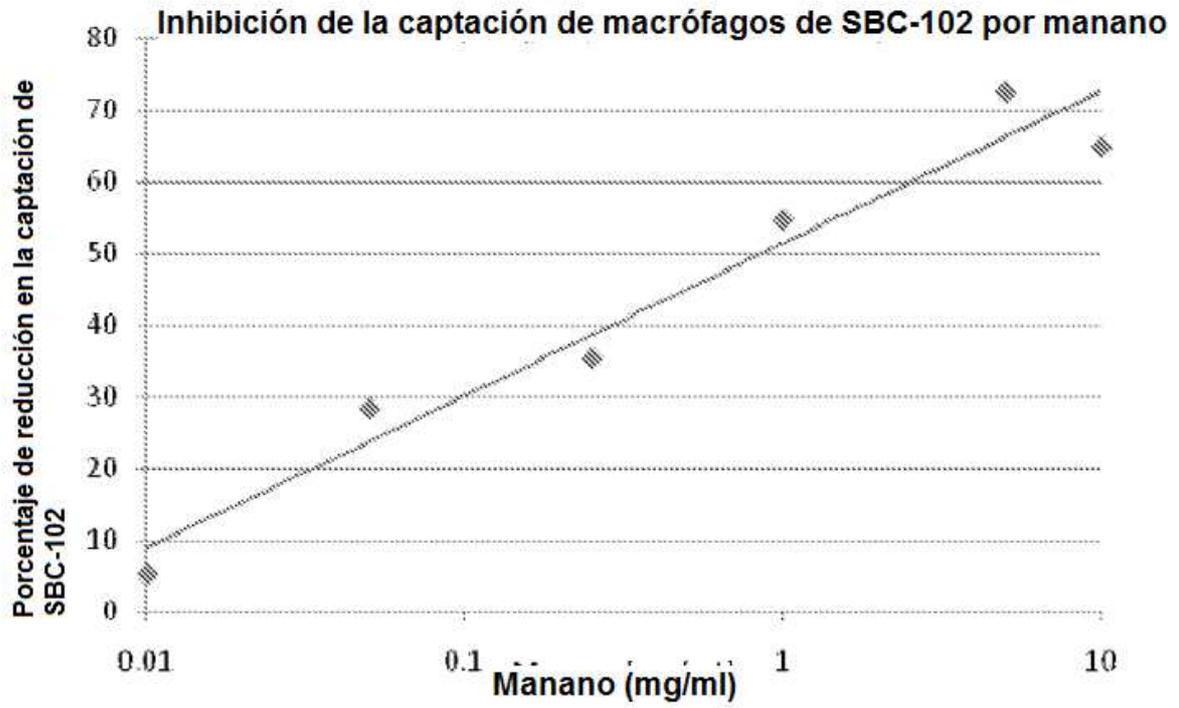
**Figura 20**



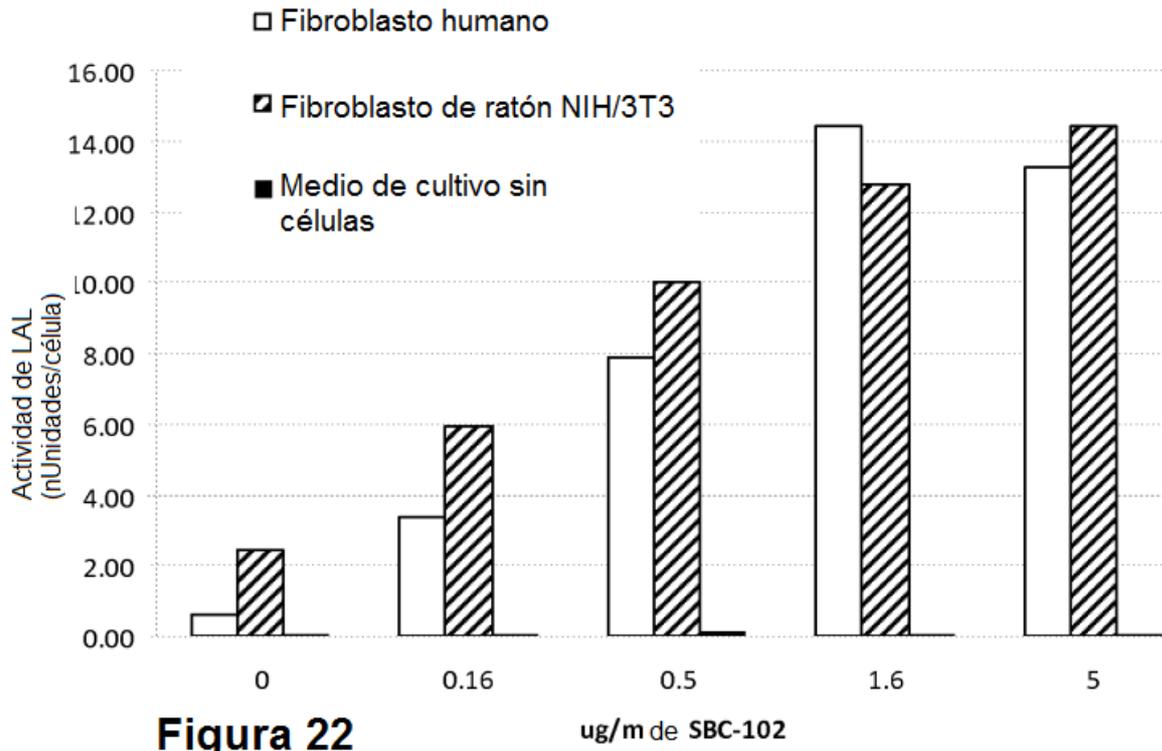
SBC-102 marcado con Oregon Green

LysoTracker Red

Imágenes solapadas



**Figura 21**



**Figura 22**

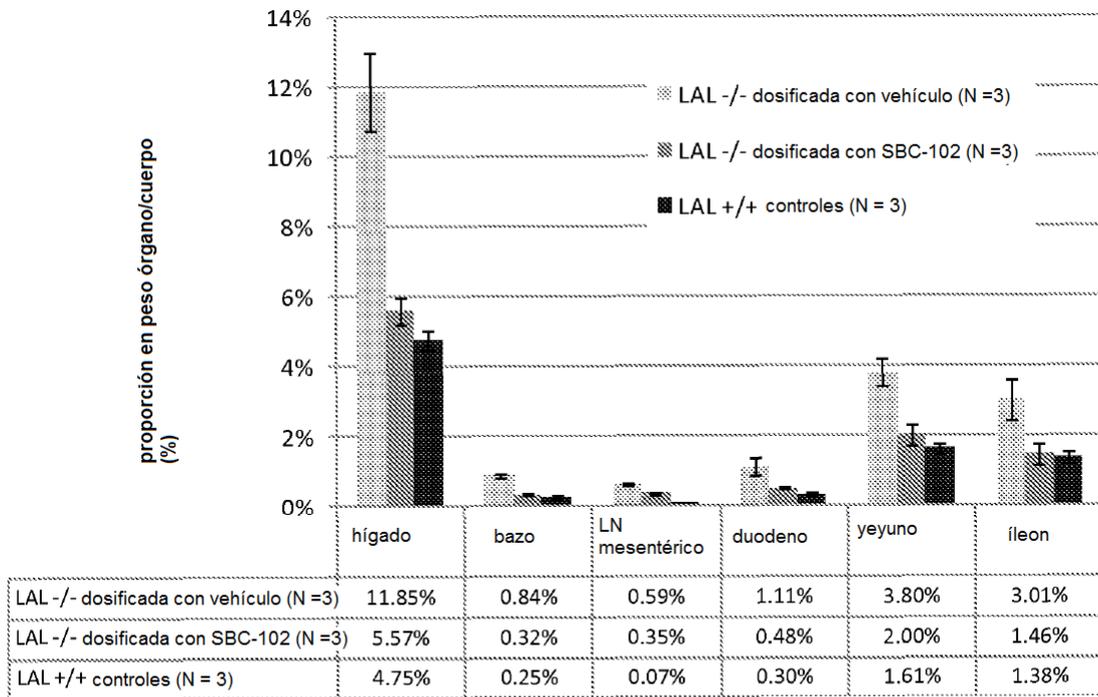
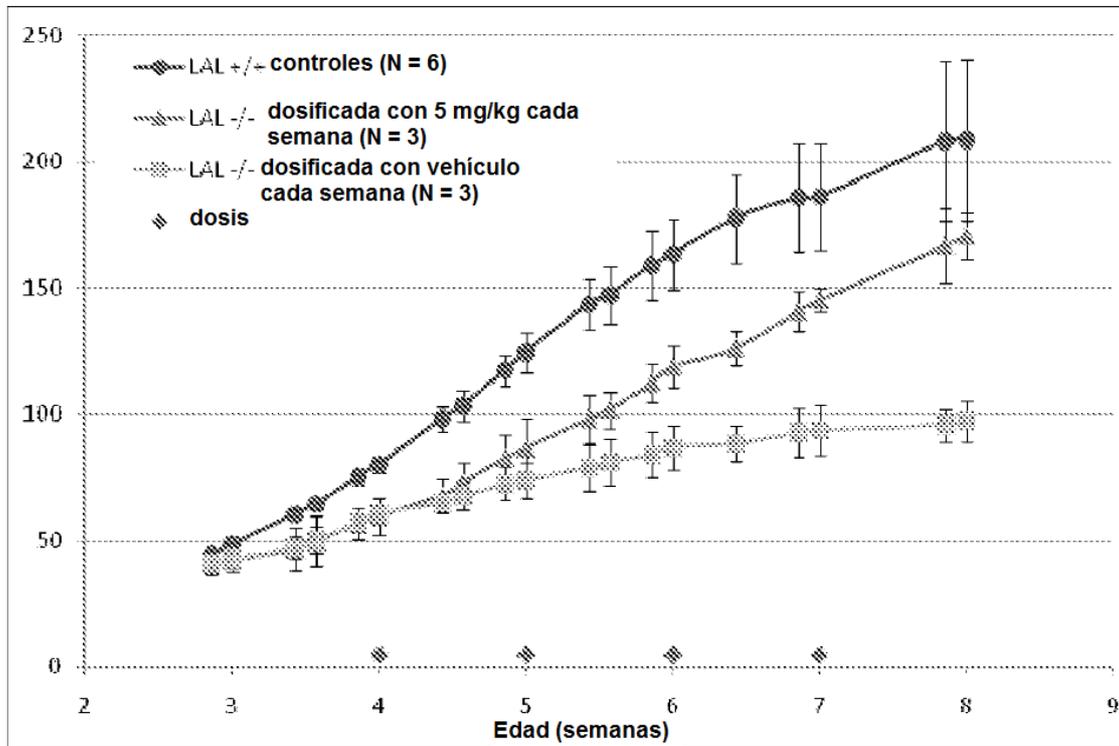


Figura 23



**Figura 24**

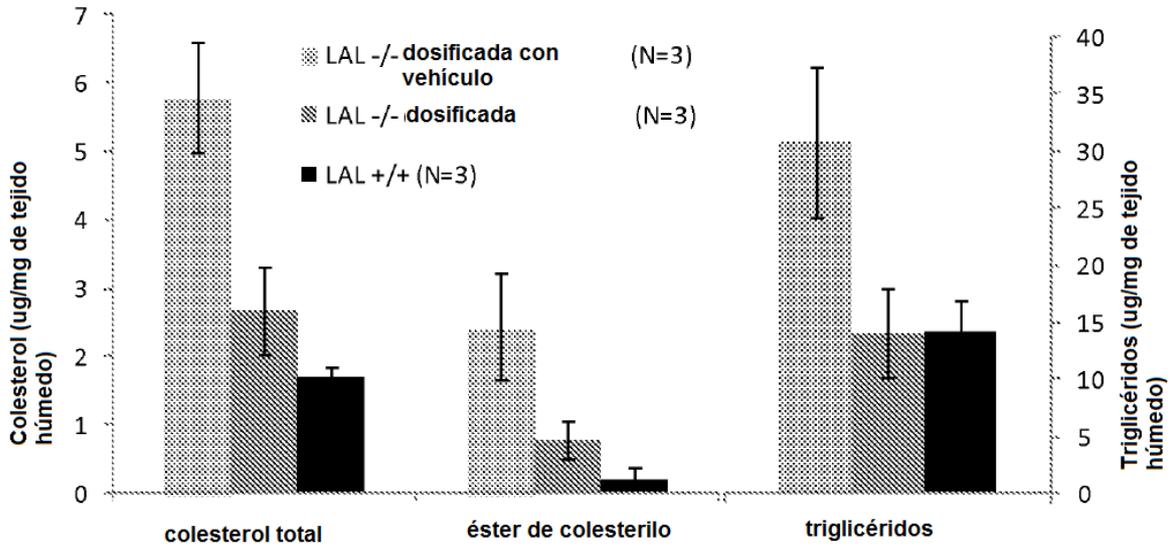
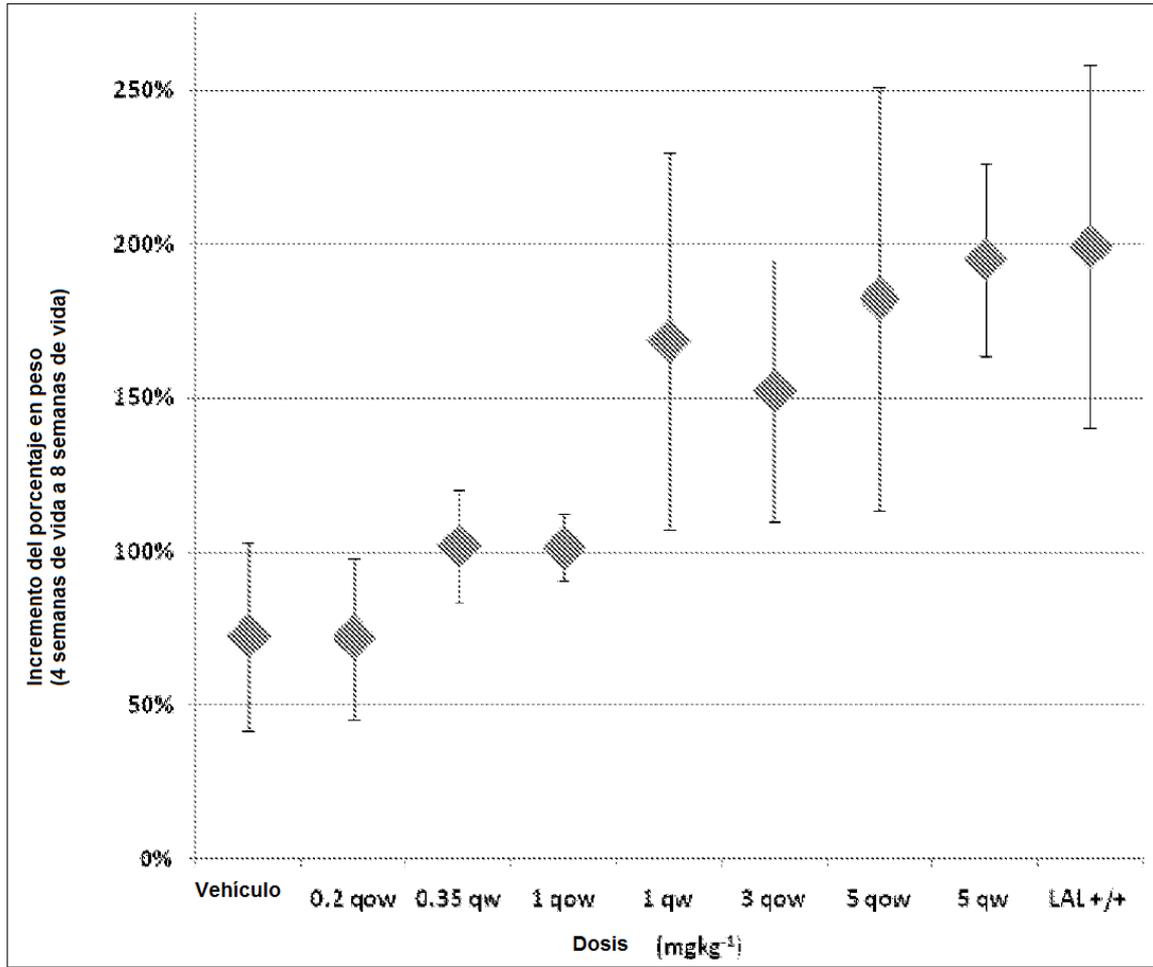
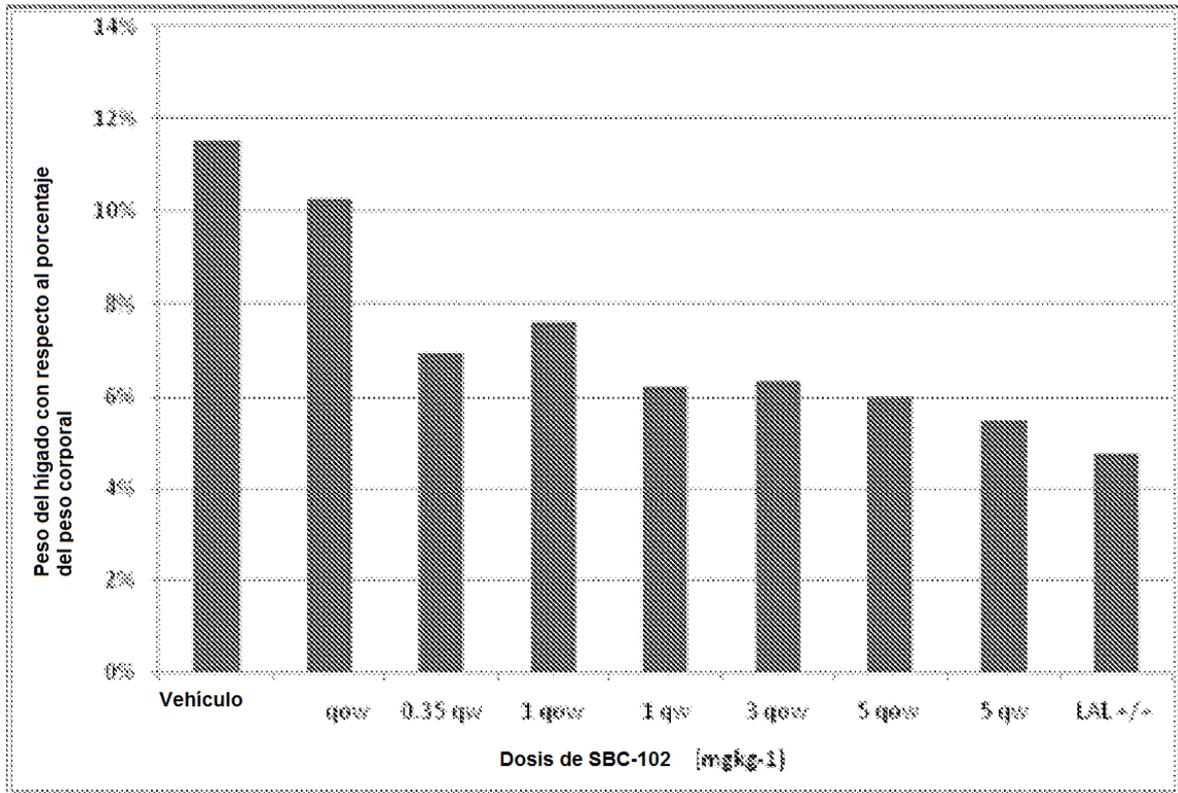


Figura 25



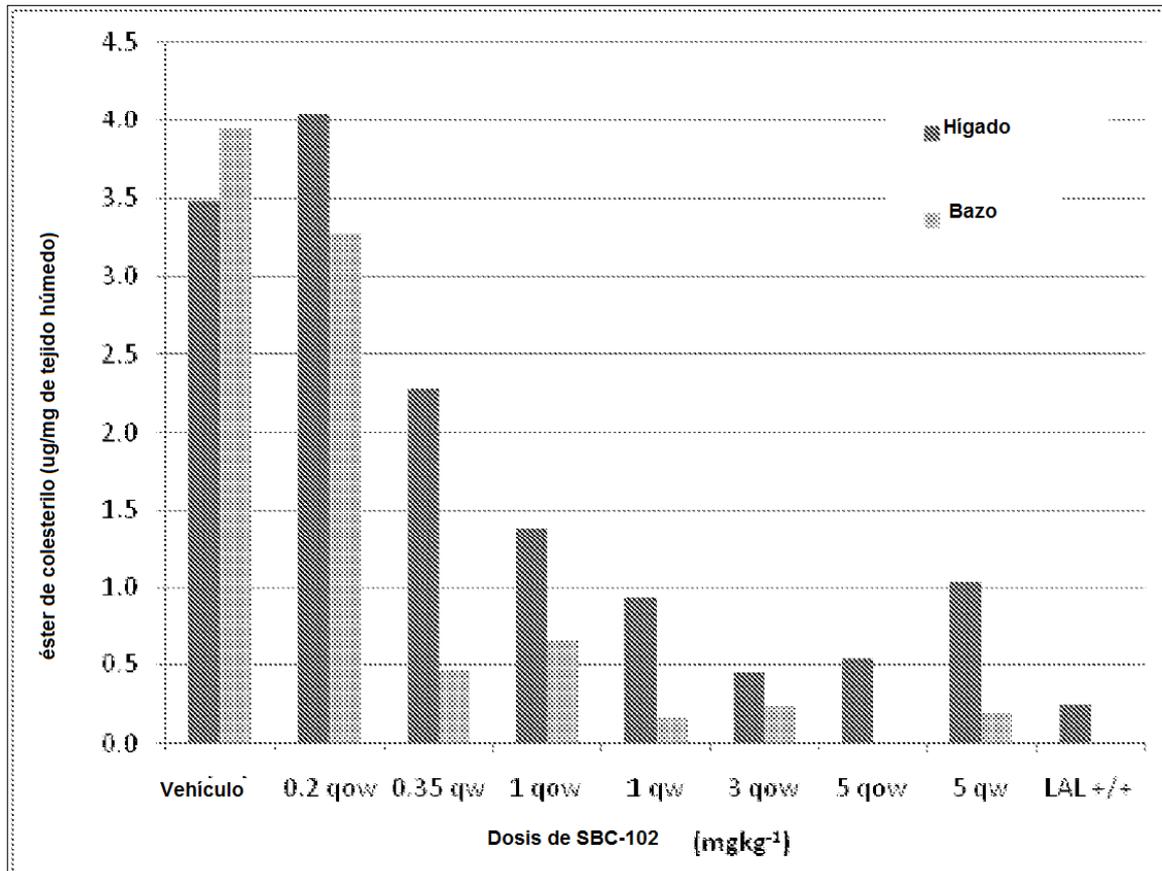
qow: cada dos semanas  
qw: cada semana

Figura 26



qw: cada semana  
 qow: cada dos  
 semanas

**Figura 27**



qow: cada dos  
semanas  
qw: cada semana

Figura 28

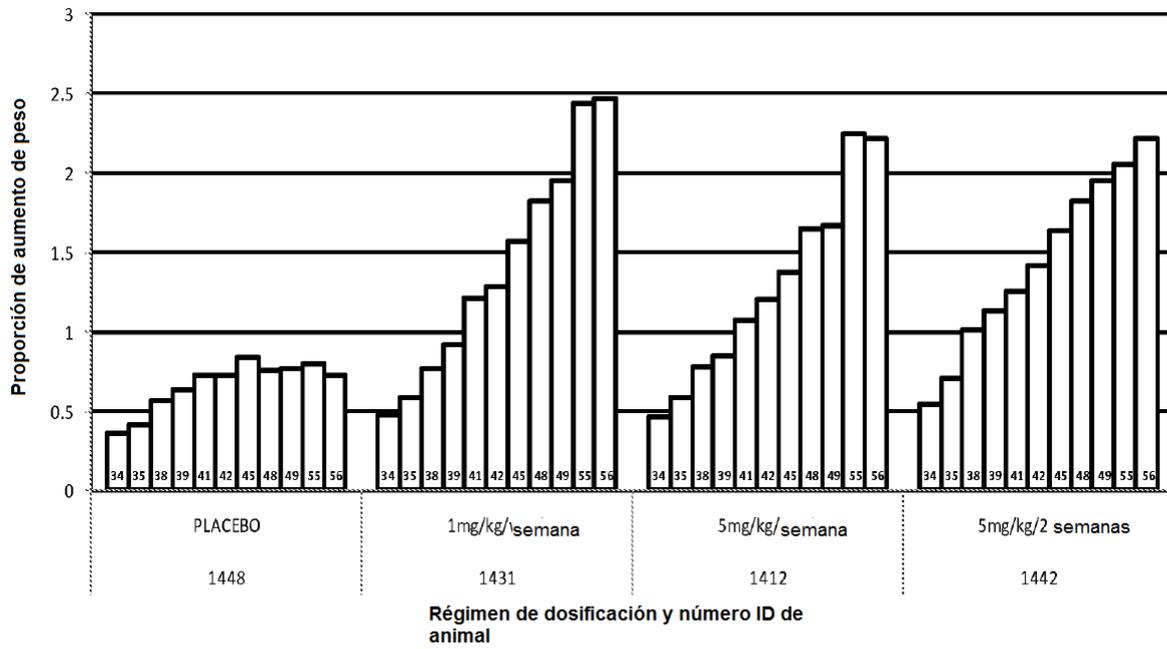


Figura 29

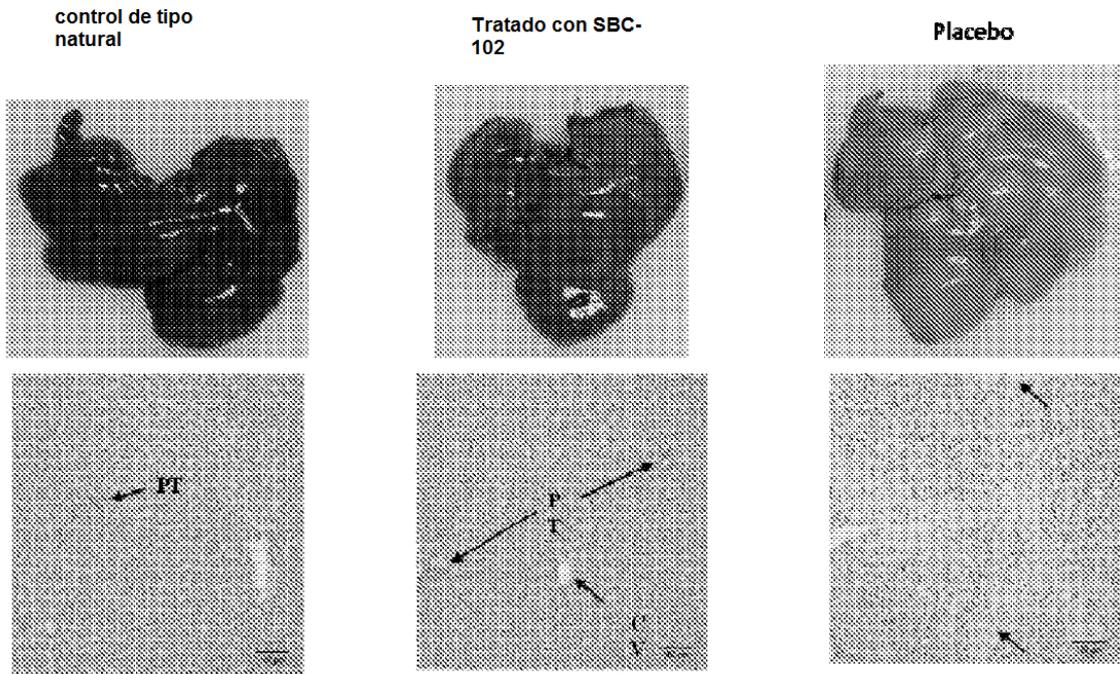


Figura 30