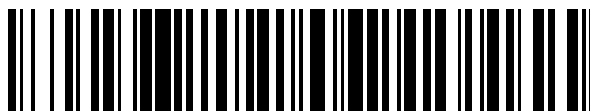


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 853**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2009** **PCT/US2009/043207**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2009** **WO09137721**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2009** **E 09743707 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017** **EP 2279210**

54 Título: **Péptidos de dirección lisosómica y usos de los mismos**

30 Prioridad:

12.01.2009 US 144106 P
07.05.2008 US 51336 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
16.08.2017

73 Titular/es:

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
105 Digital Drive
Novato, CA 94949, US

72 Inventor/es:

LEBOWITZ, JONATHAN, H. y
MAGA, JOHN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 629 853 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

Péptidos de dirección lisosómica y usos de los mismos

5 Antecedentes

10 Normalmente, las enzimas lisosómicas de mamífero se sintetizan en el citosol y atraviesan el RE donde se glucosilan con un carbohidrato ligado a N de tipo manosa elevado. En el Golgi, el carbohidrato de alto contenido de manosa se modifica en proteínas lisosómicas por la adición de manosa-6-fosfato (M6P) que dirige estas proteínas al lisosoma. Las proteínas modificadas con M6P se suministran al lisosoma a través de la interacción con cualquiera de los dos receptores de M6P. La forma más favorable de modificación es cuando se añaden dos M6P a un carbohidrato de alto contenido de manosa.

15 Más de 40 enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD) están causadas, directa o indirectamente, por la ausencia de una o más enzimas lisosómicas en el lisosoma. La terapia de remplazo enzimático para LSD se está persiguiendo activamente. La terapia generalmente requiere que se capten proteínas LSD y se suministren a los lisosomas de una diversidad de tipos celulares de un modo dependiente de M6P. Una estrategia posible implica purificar una proteína LSD y modificarla para que incorpore un resto de carbohidrato con M6P. Este material modificado puede captarse por las células de forma más eficaz que las proteínas LSD sin modificar debido a la interacción con receptores de M6P sobre la superficie celular.

20 Los inventores de la presente solicitud han desarrollado previamente una tecnología de dirección basada en péptidos que permite un suministro más eficaz de enzimas terapéuticas a los lisosomas. Esta tecnología patentada se llama Dirección Lisosómica Independiente de Glucosilación (GILT) porque una marca peptídica reemplaza M6P como el resto de dirección a los lisosomas. Los detalles de la tecnología GILT se describen en las publicaciones de solicitud de Estados Unidos n.º 2003-0082176, 2004-0006008, 2003-0072761, 2005-0281805, 2005-0244400 y las publicaciones internacionales WO 03/032913, WO 03/032727, WO 02/087510, WO 03/102583, WO 2005/078077.

30 Sumario de la invención

La presente invención proporciona composiciones mejoradas adicionales y métodos para la dirección lisosómica eficaz basada en la tecnología GILT. Entre otras cosas, la presente invención proporciona métodos y composiciones para dirigir enzimas lisosómicas a los lisosomas usando péptidos de dirección lisosómica resistentes a furina. La presente invención también proporciona métodos y composiciones para dirigir enzimas lisosómicas a los lisosomas usando un péptido de dirección lisosómica que tiene afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina. La presente invención abarca el descubrimiento inesperado de que péptidos de dirección lisosómica resistentes a furina de acuerdo con la invención tienen afinidad de unión reducida por el receptor de insulina.

40 Por tanto, la presente invención proporciona una proteína de fusión terapéutica dirigida que comprende:

una enzima lisosómica; y
una muteína IGF-II que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 1),
y que comprende una mutación dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 de la SEQ ID NO: 1 de modo que la mutación anule al menos un sitio de escisión por proteasa furina, donde la muteína IGF-II (a) se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes humano de una manera independiente de manosa-6-fosfato; (b) es resistente a la escisión con furina y (c) tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de insulina respecto a la afinidad de IGF-II humana de origen natural por el receptor de insulina.

50 Una muteína IGF-II adecuada para la invención incluye una mutación dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II adecuada para la invención incluye una mutación dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 de la SEQ ID NO: 1 de modo que la mutación anula al menos un sitio de escisión por proteasa furina. En algunas realizaciones, una mutación adecuada es una sustitución, delección y/o inserción de aminoácido. En algunas realizaciones, la mutación es una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a Arg37 o Arg40 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es una sustitución de Lys o Ala.

60 En algunas realizaciones, una mutación adecuada es una delección o remplazo de restos de aminoácido correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40, 34-40 de la SEQ ID NO: 1 y combinaciones de las mismas.

65 En algunas realizaciones, una muteína IGF-II de acuerdo con la invención contiene adicionalmente una delección o un remplazo de aminoácidos correspondientes a las posiciones 2-7 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II de acuerdo con la invención incluye adicionalmente una delección o un remplazo de aminoácidos correspondientes a las posiciones 1-7 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II de acuerdo

con la invención contiene adicionalmente una delección o un remplazo de aminoácidos correspondientes a las posiciones 62-67 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II de acuerdo con la invención contiene adicionalmente una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a Tyr27, Leu43, o Ser26 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II de acuerdo con la invención contiene al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Tyr27Leu, Leu43Val, Ser26Phe y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II de acuerdo con la invención contiene aminoácidos correspondientes a las posiciones 48-55 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II de acuerdo con la invención contiene al menos tres aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos correspondientes a las posiciones 8, 48, 49, 50, 54 y 55 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones una muteína IGF-II de la invención contiene, en las posiciones correspondientes a las posiciones 54 y 55 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos cada uno de los cuales está sin cargar a cargado negativamente a pH 7,4. En algunas realizaciones, la muteína IGF-II tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de IGF-I respecto a la afinidad de IGF-II humana de origen natural por el receptor de IGF-I.

En algunas realizaciones, una enzima lisosómica adecuada para la invención es alfa-glucosidasa ácida (GAA) humana o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, una enzima lisosómica adecuada para la invención incluye los aminoácidos 70-952 de GAA humana.

En algunas realizaciones, una proteína de fusión terapéutica dirigida de la invención incluye adicionalmente un espaciador entre la enzima lisosómica y la muteína IGF-II resistente a furina. En algunas realizaciones, el espaciador contiene una secuencia de aminoácidos Gly-Ala-Pro.

La presente invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican la muteína IGF-II o la proteína de fusión terapéutica dirigida como se describe en diversas realizaciones anteriormente. La presente invención proporciona adicionalmente diversas células que contienen el ácido nucleico de la invención.

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas adecuadas para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico, que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión terapéutica dirigida de la invención. La invención proporciona adicionalmente proteínas de fusión terapéuticas dirigidas de la invención para su uso en métodos de tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico, que comprenden administrar a un sujeto que necesita tratamiento una proteína de fusión terapéutica dirigida de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, la enfermedad de almacenamiento lisosómico es enfermedad de Pompe. En algunas realizaciones, la enfermedad de almacenamiento lisosómico es enfermedad de Fabry. En algunas realizaciones, la enfermedad de almacenamiento lisosómico es enfermedad de Gaucher.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de producción de una proteína de fusión terapéutica dirigida, que incluye una etapa de cultivo de células de mamífero en un medio de cultivo celular, donde las células de mamífero portan el ácido nucleico de la invención, en particular, como se describe en diversas realizaciones en este documento; y el cultivo se realiza en condiciones que permitan la expresión de la proteína de fusión terapéutica dirigida.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método de producción de una proteína de fusión terapéutica dirigida, que incluye una etapa de cultivo de células deficientes de furina (por ejemplo, células de mamífero deficientes de furina) en un medio de cultivo celular, donde las células deficientes de furina portan un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una enzima lisosómica y una muteína IGF-II que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 1), donde la muteína IGF-II se une al receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes de una manera independiente de manosa-6-fosfato; y donde el cultivo se realiza en condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión terapéutica dirigida.

Otras características, objetivos y ventajas de la presente invención serán evidentes en la descripción detallada a continuación. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, aunque indica realizaciones de la presente invención, se da a modo de ilustración solamente, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención llegarán a ser evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos son con motivos de ilustración solamente, no para su limitación.

La fig. 1 ilustra un mapa del extremo N-terminal de ZC-701. Dos restos de aminoácido en recuadro son sitios de eventos de escisión. El primero es el sitio de la escisión del péptido señal, el segundo es el sitio de escisión con furina.

La fig. 2 ilustra un análisis SDS-PAGE ejemplar de ZC-701 después de tratamiento con PNGasa F. El carril en la derecha se ha tratado adicionalmente con furina.

Fig. 3 Izquierda: Ilustración esquemática de mutantes ZC-701 ejemplares en que el sitio de escisión con furina está modificado. Centro: Análisis SDS-PAGE ejemplar de mutantes tratados con PNGasa después de 3-7 días de cultivo celular. Derecha: Análisis SDS-PAGE ejemplar de mutantes tratados con PNGasa tratados con furina.

La fig. 4 ilustra los resultados de unión al receptor de IGF-II competitivo ejemplar.

La fig. 5 ilustra los resultados de unión al receptor de IGF-II competitivo ejemplar adicional.

La fig. 6 ilustra los resultados del ensayo de competición con el receptor de insulina ejemplar.

La fig. 7 ilustra los resultados del ensayo de competición con el receptor de IGF-I ejemplar.

La fig. 8 ilustra los resultados ejemplares de cierto ensayo de unión al receptor de insulina.

La fig. 9 ilustra los resultados ejemplares de cierto ensayo de unión al receptor de insulina.

La fig. 10 ilustra el análisis ejemplar de GAA marcada con GILT parcialmente purificada de transfecciones transitorias. Se transfectaron células HEK293 con las construcciones 1479, 1487 o ZC-701. Después de la recolección, los sobrenadantes de cultivo se purificaron parcialmente por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Todas las muestras se trataron con PNGasa antes de la electroforesis. Paneles de la izquierda: SDS-PAGE de proteínas purificadas parcialmente. ZC-701 B12 purificada se muestra como control. Paneles de la derecha: Análisis de inmunotransferencia de las proteínas purificadas parcialmente. Se usó el anticuerpo primario indicado. Los paneles inferiores se trataron adicionalmente con furina exógena. La proteína codificada por la construcción 1487 es idéntica en secuencia a la codificada por la construcción 1461 (R37A). La proteína codificada por la construcción 1479 es idéntica a la codificada por la construcción 1459 (R37K).

La fig. 11 ilustra los resultados ejemplares de captación de la GAA marcada con GILT resistente a furina ejemplar en mioblastos de rata L6. Las $K_{\text{captación}}$ para la proteína 1479, 1487, ZC-701 y ZC-701 purificada con 4,5 nM, 4,4 nM, 5,0 nM y 2,6 nM, respectivamente. La proteína codificada por la construcción 1487 es idéntica en secuencia a la codificada por la construcción 1461 en la figura 3 (R37A). La proteína codificada por la construcción 1479 es idéntica a la codificada por la construcción 1459 en la figura 3 (R37K).

Definiciones

Mejora: Como se usa en este documento, el término "mejora" significa la prevención, reducción o paliación de un estado, o la mejora del estado de un sujeto. Mejora incluye, aunque no requiere, recuperación completa o prevención completa de una afección patológica. En algunas realizaciones, mejora incluye la reducción de materiales acumulados dentro de los lisosomas de tejidos enfermos relevantes.

Mutina IGF-II resistente a furina: Como en este documento, la expresión "mutina IGF-II resistente a furina" se refiere a un péptido basado en IGF-II que contiene una secuencia alterada de aminoácidos que anula al menos un sitio de escisión proteasa furina nativo o cambia una secuencia cerca o adyacente de un sitio de escisión con proteasa furina nativo de modo que se evita, inhibe, reduce o ralentiza la escisión con furina en comparación con un péptido IGF-II humano de tipo silvestre. Como se usa en este documento, una mutina IGF-II resistente a furina también se menciona como una mutina IGF-II que es resistente a furina.

Sitio de escisión con proteasa furina: Como se usa en este documento, la expresión "sitio de escisión con proteasa furina" (también mencionado como "sitio de escisión con furina" o "secuencia de escisión con furina") se refiere a la secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína que sirve como secuencia de reconocimiento para la escisión con proteasa enzimática por furina o proteasas de tipo furina. Típicamente, un sitio de escisión con proteasa furina tiene una secuencia consenso Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 2), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión está situado después del resto de arginina (Arg) carboxiterminal en la secuencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión con furina puede tener una secuencia consenso Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 3), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión está situado después del resto de arginina (Arg) carboxiterminal en la secuencia.

Furina: Como se usa en este documento, el término "furina" se refiere a cualquier proteasa que puede reconocer y escindir el sitio de escisión con proteasa furina como se define en este documento, incluyendo furina o proteasa de tipo furina. Furina también se conoce como enzima de escisión de aminoácido básico emparejado (PACE). La furina pertenece a la familia de proproteína convertasa de tipo subtilisina. El gen que codifica la furina se conoció como FUR (región en dirección 5' de FES).

Células deficientes de furina: Como se usa en este documento, la expresión "células deficientes de furina" se refiere a cualquier célula cuya actividad proteasa furina está inhibida, reducida o eliminada. Las células deficientes de furina incluyen tanto células de mamífero como células que no son de mamífero que no producen furina o producen una cantidad reducida de furina o proteasa furina defectuosa.

Dirección lisosómica independiente de glucosilación: Como se usa en este documento, la expresión "dirección lisosómica independiente de glucosilación" (también mencionada como "GILT") se refiere a dirección lisosómica que es independiente de manosa-6-fosfato.

5 *Alfa-glucosidasa ácida humana:* Como se usa en este documento, la expresión "alfa-glucosidasa ácida humana" (también mencionada como "GAA") se refiere a la forma de tipo silvestre precursora de GAA humana o una variante funcional que es capaz de reducir los niveles de glucógeno en lisosomas de mamífero o que puede reducir o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de Pompe.

10 *Mejorar, aumentar o reducir:* Como se usan en este documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición basal, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en ese documento, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en ese documento. Un "individuo de control" es un individuo afectado con la misma forma de enfermedad de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, la enfermedad de Pompe) que el individuo que se está tratando, que es aproximadamente de la misma edad que el individuo que se está tratando (para asegurar que las fases de la enfermedad en el individuo tratado y el individuo o individuos de control son comparables).

20 *Individuo, sujeto, paciente:* Como se usan en este documento, los términos "individuo", "sujeto, o "paciente" se refieren a un ser humano o un sujeto mamífero no humano. El individuo (también mencionado como "paciente" o "sujeto") que se está tratando es un individuo (feto, lactante, niño, adolescente o ser humano adulto) que padece una enfermedad de almacenamiento lisosómico, por ejemplo, enfermedad de Pompe (es decir, enfermedad de Pompe de aparición infantil, juvenil o en el adulto) o que tiene el potencial de desarrollar una enfermedad de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, enfermedad de Pompe).

25 *Enfermedades de almacenamiento lisosómico:* Como se usa en este documento, "enfermedades de almacenamiento lisosómico" se refiere a un grupo de trastornos genéticos que resultan de la deficiencia de al menos una de las enzimas (por ejemplo, hidrolasas ácidas) que son necesarias para descomponer las macromoléculas en péptidos, aminoácidos, monosacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos en los lisosomas. Como resultado, los individuos que padecen enfermedades de almacenamiento lisosómico tienen materiales acumulados en los lisosomas. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico ejemplares se enumeran en la tabla 1.

30 *Enzima lisosómica:* Como se usa en este documento, la expresión "enzima lisosómica" se refiere a cualquier enzima que es capaz de reducir los materiales acumulados en lisosomas de mamífero o que puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enzimas lisosómicas adecuadas para la invención incluyen enzimas lisosómicas tanto de tipo silvestre como modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes y sintéticos o purificarse de fuentes naturales. Las enzimas lisosómicas ejemplares se enumeran en la tabla 1.

40 *Espaciador:* Como se usa en este documento, el término "espaciador" (también mencionado como "enlazador") se refiere a una secuencia peptídica entre dos restos de proteína en una proteína de fusión. Un espaciador generalmente se diseña para que sea flexible o para interponer una estructura, tal como una hélice alfa, entre los dos restos de proteína. Un espaciador puede ser relativamente corto tal como la secuencia Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 4) o Gly-Gly-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 5), o puede ser más largo tal como, por ejemplo, 10-25 aminoácidos de longitud.

45 *Cantidad terapéuticamente eficaz:* Como se usa en este documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína de fusión terapéutica dirigida que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado, a una relación razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por algún ensayo o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). En particular, la "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína de fusión terapéutica o composición eficaz para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable, tal como mejorando los síntomas asociados con la enfermedad, previniendo o retardando la aparición de la enfermedad y/o también disminuyendo la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz habitualmente se administra en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína de fusión terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una dosis unitaria apropiada en un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. Además, la cantidad terapéuticamente eficaz específica (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente particular puede depender de una diversidad de factores, incluyendo el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, género y dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración y/o la tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares que son bien conocidos en las técnicas médicas.

65

Tratamiento: Como se usa en este documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "tratando") se refiere a cualquiera administración de una proteína de fusión terapéutica que alivia, mejora, mitiga, inhibe, retrasa la aparición de, reduce la gravedad de y/o reduce la incidencia parcial o completamente de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. Dicho tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o de un sujeto que muestra solamente signos prematuros de la enfermedad, trastorno y/o afección. Como alternativa o adicionalmente, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que muestra uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. Por ejemplo, el tratamiento puede referirse a mejora del estado cardíaco (por ejemplo, aumento del volumen final diastólico y/o el volumen final sistólico, o reducción, mejora o prevención de la cardiomiopatía progresiva que se encuentra típicamente en enfermedad de Pompe) o de la función pulmonar (por ejemplo, aumento en la capacidad vital de llorar sobre la capacidad basal, y/o normalización de la desaturación de oxígeno durante el llanto); mejora en el neurodesarrollo y/o las habilidades motoras (por ejemplo, aumento en el valor AIMS); reducción de los niveles de glucógeno en tejido del individuo afectado por la enfermedad; o cualquier combinación de estos efectos. En algunas realizaciones, el tratamiento incluye mejora de la eliminación de glucógeno, particularmente en la reducción o prevención de la cardiomiopatía asociada con la enfermedad de Pompe.

Los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se usan como equivalentes. Cualquier número usado en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente se entiende cubriendo cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la materia relevante.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos y composiciones para dirigir enzimas lisosómicas basándose en la tecnología de dirección lisosómica independiente de glucosilación (GILT). Entre otras cosas, la presente invención proporciona muteínas IGF-II que son resistentes a furina y/o tienen afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina y proteínas de fusión terapéuticas dirigidas que contienen una muteína IGF-II de la invención. La presente invención también proporciona métodos de preparación y uso de las mismas.

Se describen en detalle diversos aspectos de la invención en las siguientes secciones. El uso de las secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" salvo que se indique lo contrario.

Enzimas lisosómicas

Una enzima lisosómica adecuada para la invención incluye cualquier enzima que sea capaz de reducir los materiales acumulados en lisosomas de mamífero o que pueda rescatar o mejorar uno o más síntomas de enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enzimas lisosómicas adecuadas incluyen enzimas lisosómicas tanto de tipo silvestre como modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes o sintéticos o pueden purificarse de fuentes naturales. Las enzimas lisosómicas ejemplares se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1. Enfermedades de almacenamiento lisosómico y defectos enzimáticos asociados

A. Trastornos de glucogenosis		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Enfermedad de Pompe	Ácido- α 1,4-glucosidasa	Oligosacáridos ligados a glucógeno α 1-4
B. Trastornos de glucolipidosis		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Gangliosidosis GM1	β -galactosidasa	Gangliósidos GM ₁
Enfermedad de Tay-Sachs	β -hexosaminidasa A	Gangliósidos GM ₂
Gangliosidosis GM2: variante AB	Proteína activadora GM ₂	Gangliósidos GM ₂
Enfermedad de Sandhoff	β -hexosaminidasa A y B	Gangliósidos GM ₂
Enfermedad de Fabry	α -galactosidasa A	Globósidos
Enfermedad Gaucher	Glucocerebrosidasa	Glucosilceramida
Leucodistrofia metacromática	Arlsulfatasa A	Sulfátidos
Enfermedad de Krabbe	Galactosilceramidasa	Galactocerebrósido
Niemann-Pick, tipos A y B	Ácido esfingomielinasa	Esfingomielina
Niemann-Pick, tipo C	Defecto de esterificación del colesterol	Esfingomielina
Niemann-Pick, tipo D	Desconocido	Esfingomielina
Enfermedad de Farber	Ácido ceramidasa	Ceramida
Enfermedad de Wolman	Ácido lipasa	Ésteres de colesterol

C. Trastornos de mucopolisacárido		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Síndrome de Hurler (MPS IH)	α -L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Síndrome de Scheie (MPS IS)	α -L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Hurler-Scheie (MPS IH/S)	α -L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Síndrome de Hunter (MPS II)	Iduronato sulfatasa	Heparán y dermatán sulfatos
Sanfilippo A (MPS IIIA)	Heparán N-sulfatasa	Heparán sulfato
Sanfilippo B (MPS IIIB)	α -N-acetilglucosaminidasa	Heparán sulfato
Sanfilippo C (MPS IIIC)	Acetil-CoA-glucosaminido acetiltransferasa	Heparán sulfato
Sanfilippo D (MPS IIID)	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparán sulfato
Morquio A (MPS IVA)	Galactosamina-6-sulfatasa	Queratán sulfato
Morquio B (MPS IVB)	β -galactosidasa	Queratán sulfato
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arlsulfatasa B	Dermatán sulfato
Síndrome de Sly (MPS VII)	β -glucuronidasa	
D. Trastornos de oligosacárido/glicoproteína		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
α -manosidosis	α -manosidasa	Manosa/oligosacáridos
β -manosidosis	β -manosidasa	Manosa/oligosacáridos
Fucosidosis	α -L-fucosidasa	Oligosacáridos de fucosilo
Aspartilglucosaminuria	N-aspartil- β -glucosaminidasa	Aspartilglucosamina asparaginas
Sialidosis (Mucopolisidosis I)	α -neuraminidasa	Sialiloligosacáridos
Galactosialidosis (Síndrome de Goldberg)	Deficiencia de proteína protectora lisosómica	Sialiloligosacáridos
Enfermedad de Schindler	α -N-acetil-galactosaminidasa	
E. Trastornos de transporte de enzimas lisosómicas		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Mucopolisidosis II (Enfermedad de células i)	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	Heparán sulfato
Mucopolisidosis III (Pseudopolisidrosis de Hurler)	Igual que ML II	
F. Trastornos del transporte de membrana lisosómica		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Cistinosis	Proteína de transporte de cistina	Cistina libre
Enfermedad de Salla	Proteína de transporte de ácido siálico	Ácido siálico y ácido glucurónico libre
Enfermedad infantil de almacenamiento de ácido siálico	Proteína de transporte de ácido siálico	Ácido siálico y ácido glucurónico libre
G. Otros		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Enfermedad de Batten (Lipofuscinosis cerioide neuronal juvenil)	Desconocido	Lipofuscinas
Lipofuscinosis cerioide neuronal infantil	Palmitoil-proteína tioesterasa	Lipofuscinas
Mucopolisidosis IV	desconocido	Gangliósidos y ácido hialurónico
Prosaposina	Saposinas A, B, C o D	

En algunas realizaciones, una enzima lisosómica adecuada para la invención incluye una secuencia polipeptídica que tiene un 50-100 %, incluyendo un 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de origen natural de una enzima humana mostrada en la tabla 1, que codifica aún al mismo tiempo una proteína que es capaz de reducir los materiales acumulados en lisosomas de mamífero o que puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de enfermedad de almacenamiento lisosómico.

- El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a la secuencia de la enzima lisosómica se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia de la enzima humana de origen natural, después de alinear las secuencias e introducir

huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que pertenecen a las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando un software informático disponible al público tal como el software BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se está comparando. Preferiblemente, se usa el software WU-BLAST-2 para determinar la identidad de secuencia de aminoácidos (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se configuran a los valores por defecto. Los parámetros ajustables se configuran con los siguientes valores: tramo de solapamiento=1, fracción de solapamiento=0,125, umbral mundial (T)=11. El valor HSP (S) y los parámetros HSP S2 son valores dinámicos y se establecen por el propio programa, dependiendo de la composición de la secuencia particular, sin embargo, los valores mínimos pueden ajustarse y se configuran como se indica anteriormente.

Enfermedad de Pompe

Una enfermedad de almacenamiento lisosómico ejemplar es la enfermedad de Pompe. La enfermedad de Pompe es un trastorno genético poco común causado por una deficiencia en la enzima alfa-glucosidasa ácida (GAA), que es necesaria para descomponer el glucógeno, una forma almacenada de azúcar usada para la energía. La enfermedad de Pompe también se conoce como enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II, GSD II, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II, glucogenosis de tipo II, deficiencia de maltasa ácida, deficiencia de alfa-1,4-glucosidasa, cardiomegalia glucogénica difusa y forma cardíaca de glucogenosis generalizada. La acumulación del glucógeno causa debilidad muscular progresiva (miopatía) en todo el organismo y afecta a diversos tejidos corporales, particularmente en el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado, el sistema respiratorio y nervioso.

Las manifestaciones clínicas que se presentan de la enfermedad de Pompe pueden variar ampliamente dependiendo de la edad de aparición de la enfermedad y la actividad GAA residual. La actividad GAA residual se correlaciona tanto con la cantidad como con la distribución tisular de la acumulación de glucógeno, así como la gravedad de la enfermedad. La enfermedad de Pompe de aparición infantil menos del 1 % de la actividad GAA normal) es la forma más grave y se caracteriza por hipotonía, debilidad muscular generalizada y cardiomiopatía hipertrófica, y acumulación masiva de glucógeno en el tejido cardíaco y otros tejidos musculares. Habitualmente se produce muerte al año del nacimiento debido a insuficiencia cardiorrespiratoria. Hirschhorn *et al.* (2001) "Glycogen Storage Disease Type II: Acid Alpha-glucosidase (Acid Maltase) Deficiency," en Scriver *et al.*, eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8.^a ed., Nueva York: McGraw-Hill, 3389-3420. La enfermedad de Pompe de aparición juvenil (un 1-10 % de actividad GAA normal) y de aparición en el adulto (un 10-40 % de actividad GAA normal) es clínicamente más heterogénea, con una variación mayor en la edad de aparición, la presentación clínica y la progresión de la enfermedad. La enfermedad de Pompe de aparición juvenil y en el adulto generalmente se caracteriza por ausencia de afectación cardíaca grave, edad tardía de aparición y progresión más lenta de la enfermedad, pero la afectación final de músculos respiratorios o de las extremidades provoca morbilidad y mortalidad significativas. Aunque la esperanza de vida puede variar, la muerte generalmente se produce debido a insuficiencia respiratoria. Hirschhorn *et al.* (2001) "Glycogen Storage Disease Type II: Acid Alpha-glucosidase (Acid Maltase) Deficiency," en Scriver *et al.*, eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8.^a ed., Nueva York: McGraw-Hill, 3389-3420.

Una enzima GAA adecuada para tratar la enfermedad de Pompe incluye una GAA humana de tipo silvestre o un fragmento o variante de secuencia de la misma que retiene la capacidad de escindir los enlaces α -1-4 en oligosacáridos lineales.

Terapia de remplazo enzimático

La terapia de remplazo enzimático (ERT) es una estrategia terapéutica para corregir una deficiencia enzimática infundiendo la enzima ausente en el torrente sanguíneo. Según la sangre perfunde los tejidos del paciente, la enzima se capta por las células y se transporta al lisosoma, donde la enzima actúa eliminando el material que se ha acumulado en los lisosomas debido a la deficiencia enzimática. Para que la terapia de remplazo de enzimas lisosómicas sea eficaz, la enzima terapéutica debe suministrarse a los lisosomas en las células apropiadas en los tejidos donde se manifiesta el defecto de almacenamiento. Los agentes terapéuticos convencionales de remplazo de enzimas lisosómicas se suministran usando carbohidratos unidos de forma natural a la proteína para acoplarse con receptores específicos en la superficie de las células diana. Un receptor, el receptor de M6P independiente de cationes (CI-MPR), es particularmente útil para dirigir enzimas lisosómicas de remplazo porque el CI-MPR está presente en la superficie de la mayoría de tipos celulares.

Las expresiones "receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR)", "receptor de M6P/IGF-II", "receptor de CI-MPR/IGF-II", "receptor de IGF-II" o "receptor de IGF2", o abreviaturas de las mismas se usan de forma intercambiable en este documento, que hacen referencia al receptor celular que se une a M6P e IGF-II.

Dirección lisosómica independiente de glucosilación

Se ha desarrollado una tecnología de dirección lisosómica independiente de glucosilación (GILT) para dirigir enzimas terapéuticas a los lisosomas. Específicamente, la tecnología GILT usa una marca peptídica en lugar de M6P para acoplarse con el CI-MPR para dirección lisosómica. Típicamente, una marca GILT es una proteína, péptido u otro resto que se une al CI-MPR de una manera independiente de manosa-6-fosfato. De forma ventajosa, esta tecnología imita el mecanismo biológico normal para captar enzimas lisosómicas, aunque haciéndolo de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

Una marca GILT preferida se obtiene del factor II de crecimiento de tipo insulina humano (IGF-II). El IGF-II humano es un ligando de afinidad para el CI-MPR, que también se menciona como receptor de IGF-II. La unión de las enzimas terapéuticas marcadas con GILT al receptor de M6P/IGF-II dirige la proteína al lisosoma a través de la ruta endocítica. Este método tiene numerosas ventajas sobre los métodos que implican la glucosilación, incluyendo simplicidad y rentabilidad, porque una vez la proteína se ha aislado no es necesario hacer modificaciones adicionales.

Puede encontrarse una descripción detallada de la tecnología GILT y la marcar GILT en las publicaciones de Estados Unidos n.º 20030082176, 20040006008, 20040005309, y 20050281805.

Marca GILT resistente a furina

Durante el curso del desarrollo de enzimas lisosómicas marcadas con GILT para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico, ha llegado a ser evidente que la marca GILT derivada de IGF-II puede someterse a escisión proteolítica por furina durante la producción en células de mamífero (véase la sección de ejemplos). La proteasa furina típicamente reconoce y escinde un sitio de escisión que tiene una secuencia consenso Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 2), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión está colocado después del resto de arginina (Arg) carboxiterminal en la secuencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión por furina tiene una secuencia consenso Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 3), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión está colocado después del resto de arginina (Arg) carboxiterminal en la secuencia. Como se usa en este documento, el término "furina" se refiere a cualquier proteasa que pueda reconocer y escindir el sitio de escisión por proteasa furina como se define en este documento, incluyendo furina o proteasa de tipo furina. La furina también se conoce como enzima de escisión de aminoácido básico emparejado (PACE). La furina pertenece a la familia de proproteína convertasa de tipo subtilisina que incluye PC3, una proteasa responsable de la maduración de la proinsulina en células de los islotes pancreáticos. El gen que codifica la furina se conoce como FUR (región en dirección 5' de FES).

La secuencia peptídica de IGF-II humana madura se muestra a continuación.



AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPAS**RVSRRSR**GIVEECCFRSCDLALLETYC

ATPAKSE (SEQ ID NO:1)

Como puede observarse, el IGF-II humano maduro contiene dos sitios potenciales de escisión con furina solapantes entre los restos 30-40 (en negrita y subrayados). Las flechas indican dos posiciones potenciales de escisión con furina.

Se han desarrollado marcas GILT modificadas que son resistentes a escisión por furina y aún retienen la capacidad de unirse al CI-MPR de una manera independiente de manosa-6-fosfato. Específicamente, las marcas GILT resistentes a furina pueden diseñarse por mutación de la secuencia de aminoácidos en uno o más sitios de escisión con furina de modo que la mutación anule al menos un sitio de escisión con furina. Por tanto, en algunas realizaciones, una marca GILT resistente a furina es una muteína IGF-II resistente a furina que contiene una mutación que anula al menos un sitio de escisión con proteasa furina o cambia una secuencia adyacente al sitio de escisión con proteasa furina de modo que se evite, inhiba, reduzca o ralentice la escisión con furina en comparación con un péptido IGF-II de tipo silvestre (por ejemplo, IGF-II maduro humano de tipo silvestre). Típicamente, una mutación adecuada no influye en la capacidad de la marca GILT resistente a furina de unirse al receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes. En particular, una muteína IGF-II resistente a furina adecuada para la invención se une al receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes de una manera independiente de manosa-6-fosfato con una constante de disociación de 10^{-7} M o menos (por ejemplo, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , o menos) a pH 7,4. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II resistente a furina contiene una mutación dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 (por ejemplo, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40, 34-40) de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una mutación adecuada anula al menos un sitio de escisión con proteasa furina. Una mutación puede ser sustituciones, delecciones, inserciones de aminoácidos. Por ejemplo, un aminoácido cualquiera dentro de la región correspondiente a los restos 30-40 (por ejemplo, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 33-39, 34-39, 35-39,

36-39, 37-40, 34-40) de la SEQ ID NO: 1 puede sustituirse con cualquier otro aminoácido o delecionarse. Por ejemplo, sustituciones en la posición 34 pueden afectar al reconocimiento por furina el primer sitio de escisión. La inserción de uno o más aminoácidos adicionales dentro de cada sitio de reconocimiento puede anular uno o ambos sitios de escisión con furina. La delección de uno o más de los restos en las posiciones degeneradas también puede anular ambos sitios de escisión con furina.

En algunas realizaciones, una muteína IGF-II resistente a furina contiene sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a Arg37 o Arg40 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II resistente a furina contiene una sustitución de Lys o Ala en las posiciones Arg37 o Arg40. Otras sustituciones son posibles, incluyendo combinaciones de mutaciones de Lys y/o Ala en ambas posiciones 37 y 40, o sustituciones de aminoácidos diferentes de Lys o Ala.

En algunas realizaciones, la muteína IGF-II resistente a furina adecuada para la invención puede codificar mutaciones adicionales. Por ejemplo, hasta un 30 % o más de los restos de la SEQ ID NO: 1 puede cambiarse (por ejemplo, hasta un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 % o más restos puede cambiarse). Por tanto, una muteína IGF-II resistente a furina adecuada para la invención puede tener una secuencia de aminoácidos al menos un 70 %, incluyendo al menos un 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, la muteína IGF-II resistente a furina adecuada para la invención se dirige específicamente al CI-MPR. Son particularmente útiles mutaciones en el polipéptido de IGF-II que producen una proteína que se une al CI-MPR con alta afinidad (por ejemplo, con una constante de disociación de 10^{-7} M o menos a pH 7,4) mientras que se unen a otros receptores que se sabe que están unidos a IGF-II con afinidad reducida respecto a IGF-II nativo. Por ejemplo, una muteína IGF-II resistente a furina adecuada para la invención puede modificarse para que tenga afinidad de unión disminuida por el receptor de IGF-I respecto a la afinidad del IGF-II humano de origen natural por el receptor de IGF-I. Por ejemplo, la sustitución en IGF-II de los restos Tyr 27 con Leu, Leu 43 con Val o Ser 26 con Phe disminuye la afinidad de IGF-II por el receptor de IGF-I en 94, 56, y 4 veces respectivamente (Torres *et al.* (1995) J. Mol. Biol. 248(2):385-401). La delección de los restos 1-7 de IGF-II humano produjo una disminución de 30 veces en la afinidad por el receptor de IGF-I humano y un aumento concomitante de 12 veces en la afinidad por el receptor de IGF-II de rata (Hashimoto *et al.* (1995) J. Biol. Chem. 270(30):18013-8). La estructura por RMN de IGF-II muestra que Thr 7 está localizada cerca de los restos 48 Phe y 50 Ser, así como cerca del puente disulfuro 9 Cys-47 Cys. Se cree que la interacción de Thr 7 con estos restos puede estabilizar el hexapéptido N-terminal flexible necesario para la unión al receptor de IGF-I (Terasawa *et al.* (1994) EMBO J. 13(23):5590-7). Al mismo tiempo, esta interacción puede modular la unión al receptor de IGF-II. El truncamiento del extremo C-terminal de IGF-II (restos 62-67) también parece disminuir la afinidad de IGF-II por el receptor de IGF-I en 5 veces (Roth *et al.* (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181(2):907-14).

Las superficies de unión para los receptores de IGF-I y M6P independiente de cationes están en caras diferentes de IGF-II. Basándose en los datos estructurales y mutacionales, pueden construirse dominios de unión a M6P independiente de cationes funcionales que son sustancialmente más pequeños que IGF-II humano. Por ejemplo, los aminoácidos amino terminales (por ejemplo, 1-7 o 2-7) y/o los restos carboxiterminales 62-67 pueden delecionarse o remplazarse. Adicionalmente, los aminoácidos 29-40 pueden eliminarse o remplazarse probablemente sin alterar el plegamiento del resto del polipéptido o la unión al receptor de M6P independiente de cationes. Por tanto, puede construirse un resto de dirección que incluya los aminoácidos 8-28 y 41-61. Estos tramos de aminoácidos quizás podrían unirse directamente o separados por un conector. Como alternativa, los aminoácidos 8-28 y 41-61 pueden proporcionarse en cadenas polipeptídicas diferentes. Dominios comparables de insulina, que es homóloga a IGF-II y tiene una estructura terciaria muy relacionada con la estructura de IGF-II, tienen suficiente información estructural para permitir un repliegamiento apropiado en la estructura terciaria apropiada, incluso cuando están presentes en cadenas polipeptídicas diferentes (Wang *et al.* (1991) Trends Biochem. Sci. 279-281). Por tanto, por ejemplo, los aminoácidos 8-28, o una variante de sustitución conservativa de los mismos, podría fusionarse a una enzima lisosómica; la proteína de fusión resultante podría mezclarse con los aminoácidos 41-61, o una variante de sustitución conservativa de los mismos, y administrarse a un paciente.

IGF-II también puede modificarse para minimizar la unión a proteínas de unión a IGF-II del suero (Baxter (2000) Am. J. Physiol Endocrinol Metab. 278(6):967-76) para evitar el secuestro de construcciones IGF-II/GILT. Varios estudios han localizado los restos en IGF-II necesarios para la unión a proteínas de unión a IGF. Las construcciones con mutaciones en estos restos pueden explorarse para la retención de la unión de alta afinidad al receptor de M6P/IGF-II y para una afinidad reducida por proteínas de unión a IGF. Por ejemplo, se informa que el remplazo de Phe 26 de IGF-II con Ser reduce la afinidad de IGF-II por IGFBP-1 y 6 sin efecto sobre la unión al receptor de M6P/IGF-II (Bach *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 268(13):9246-54). Otras sustituciones, tales como Lys por Glu 9, también pueden ser ventajosas. Las mutaciones análogas, por separado o en combinación, en una región de IGF-I que esté altamente conservada con IGF-II producen disminuciones grandes en la unión a IGF-BP (Magee *et al.* (1999) Biochemistry 38(48):15863-70).

Una estrategia alternativa es identificar regiones mínimas de IGF-II que puedan unirse con alta afinidad al receptor de M6P/IGF-II. Los restos que se han implicado en la unión de IGF-II al receptor de M6P/IGF-II se agrupan principalmente en una cara de IGF-II (Terasawa *et al.* (1994) EMBO J. 13(23):5590-7). Aunque la estructura terciaria de IGF-II normalmente se mantiene por tres enlaces disulfuro intramoleculares, puede diseñarse un péptido que incorpora la secuencia de aminoácidos en la superficie de unión al receptor de M6P/IGF-II de IGF-II para plegarse apropiadamente y tener actividad de unión. Dicho péptido mínimo de unión es un dominio de dirección lisosómica altamente preferido. Por ejemplo, un dominio de dirección lisosómica preferido es los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano. Los péptidos diseñados, basados en la región alrededor de los aminoácidos 48-55, que se une al receptor de M6P/IGF-II, también son dominios de dirección lisosómica deseables. Como alternativa, puede explorarse una biblioteca aleatoria de péptidos para la capacidad de unirse al receptor de M6P/IGF-II a través de un ensayo de doble híbrido de levaduras o a través de un ensayo de tipo presentación en fagos.

Afinidad de unión por el receptor de insulina

Los inventores de la presente solicitud descubrieron inesperadamente que muchas muteínas IGF-II resistentes a furina descritas en este documento tienen afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina. Por tanto, en algunas realizaciones, una marca peptídica adecuada para la invención tiene afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina respecto a la afinidad del IGF-II humano de origen natural por el receptor de insulina. En algunas realizaciones, las marcas peptídicas con afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina adecuadas para la invención incluyen marcas peptídicas que tienen una afinidad de unión por el receptor de insulina que es más de 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 12 veces, 14 veces, 16 veces, 18 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces menor que la del IGF-II humano maduro de tipo silvestre. La afinidad de unión por el receptor de insulina puede medirse usando diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica. Los ensayos de unión ejemplares se describen en la sección de Ejemplos.

Mutagénesis

Las muteínas IGF-II pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de IGF-II o por síntesis del polipéptido IGF-II deseado. Pueden hacerse variaciones en la secuencia de IGF-II, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican IGF-II que provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos de IGF-II en comparación con una secuencia de origen natural de IGF-II humano maduro. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de remplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como el remplazo de una leucina con una serina, es decir, remplazos conservativos de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos también pueden ser el resultado de remplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas distintas, es decir, remplazos no conservativos de aminoácidos. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y ensayando las variantes resultantes para la actividad en los ensayos *in vivo* o *in vitro* conocidos en la técnica (tales como ensayos de unión al CI-MPR o ensayos de escisión con furina).

También puede emplearse análisis de aminoácidos por exploración para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de exploración preferidos están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de exploración preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono-β y es menos probable que altere la conformación de cadena principal de la variante. La alanina también se prefiere típicamente porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto enterradas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W. H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. *Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución con alanina no produce cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido esotérico.

Las variaciones pueden hacerse usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótido (dirigida al sitio), exploración con alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], la mutagénesis por casete [Wells *et al.*, *Gene*, 34:315 (1985)], la mutagénesis por selección de restricción [Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse sobre el ADN clonado para producir muteínas IGF-II.

Espaciador

Una marca GILT resistente a furina puede fusionarse al extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido que codifica una enzima lisosómica. La marca GILT puede fusionarse directamente al polipéptido enzimático lisosómico o puede separarse del polipéptido enzimático lisosómico por un conector o un espaciador. Un conector o espaciador de aminoácidos generalmente se diseña para que sea flexible o para interponer una estructura, tal como una hélice-alfa, entre los dos restos proteicos. Un conector o espaciador puede ser relativamente corto, tal como la secuencia

Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 4) o Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 5), o puede ser más largo, tal como, por ejemplo, de 10-25 aminoácidos de longitud. El sitio de una unión de fusión debe seleccionarse con cuidado para promover el plegamiento apropiado y la actividad de ambos compañeros de fusión y para evitar la separación prematura de una marca peptídica de un polipéptido GAA. En una realización preferida, la secuencia conectora es Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 4).

Se describieron en detalle construcciones adicionales de proteínas GAA marcadas con GILT que pueden usarse en los métodos y composiciones de la presente invención en la publicación de Estados Unidos n.º 2005 0244400.

Células

Puede utilizarse cualquier célula o tipo celular de mamífero susceptible a cultivo celular, y a expresión de polipéptidos, de acuerdo con la presente invención, tales como, por ejemplo, células de riñón embrionario humano (HEK) 293, células de ovario de hámster chino (CHO), células renales de mono (COS), células HT1080, células C10, células HeLa, células renales de cría de hámster (BHK), células 3T3, células C127, células CV-1, células HaK, células NS/O y células L-929. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC n.º: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). En algunas realizaciones la proteína de fusión de la presente invención se produce a partir de líneas celulares CHO.

La proteína de fusión de la invención también puede expresarse en una diversidad de células hospedadoras que no son de mamífero tales como, por ejemplo, de insecto ((por ejemplo, Sf-9, Sf-21, Hi5), de plantas (por ejemplo, *Leguminosa*, cereal, o tabaco), de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*), procariotas (por ejemplo, *E. Coli*, *B. subtilis* u otros *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptomyces spp.*), o de hongos.

En algunas realizaciones, una proteína de fusión con o sin una marca GILT resistente a furina puede producirse en células deficientes de furina. Como se usa en este documento, la expresión "células deficientes de furina" se refiere a cualquier célula cuya actividad proteasa furina está inhibida, reducida o eliminada. Las células deficientes de furina incluyen tanto células de mamífero como células que no son de mamífero que no producen furina o producen una cantidad reducida o proteasa furina defectuosa. Las células deficientes de furina ejemplares que son conocidas y están disponibles para los expertos en la materia incluyen, aunque sin limitación, células FD11 (Gordon *et al.* (1997) Infection and Immunity 65(8):3370 3375), y aquellas células mutantes descritas en Moebring y Moehring (1983) Infection and Immunity 41(3):998 1009. Como alternativa, una célula deficiente de furina puede obtenerse exponiendo las células de mamífero y que no son de mamífero descritas anteriormente a tratamiento de mutagénesis, por ejemplo, irradiación, bromuro de etidio, uridina bromada (BrdU) y otros, preferiblemente mutagénesis química, y más preferiblemente mutagénesis con sulfonato de etilmetano, recuperando las células que sobreviven al tratamiento y seleccionando aquellas células que se encuentra que son resistentes a la toxicidad de la exotoxina A de *Pseudomonas* (véase, Moehring y Moehrin (1983) Infection and Immunity 41(3):998 1009).

Hipoglucosilación

Las proteínas terapéuticas dirigidas de la invención pueden estar hipoglucosiladas es decir, una o más estructuras de carbohidrato que estarían normalmente presentes en una proteína humana de origen natural, preferiblemente se omite, elimina o modifica u oculta. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se contempla que una proteína hipoglucosilada puede prolongar la semivida de la proteína en un mamífero. La hipoglucosilación puede conseguirse de muchas maneras. En algunas realizaciones, la proteína de fusión dirigida de la invención puede producirse usando un péptido señal de secreción para facilitar la secreción de la proteína de fusión. Por ejemplo, la proteína de fusión puede producirse usando una péptida señal de IGF-II. En general, la proteína de fusión producida usando un péptido señal de IGF-II tiene un nivel reducido de manosa-6-fosfato (M6P) sobre la superficie de la proteína en comparación con la enzima de tipo silvestre. En algunas realizaciones, una proteína puede estar completamente hipoglucosilada (como cuando se sintetiza en *E. coli*), parcialmente no glucosilada (como cuando se sintetiza en un sistema de mamífero después de la alteración de uno o más sitios de glucosilación por mutagénesis dirigida al sitio) o puede tener un patrón de glucosilación que no es de mamífero. Por ejemplo, las proteínas de fusión hipoglucosiladas pueden generarse modificando, sustituyendo o eliminando uno o más sitios de glucosilación por mutagénesis dirigida al sitio. Por ejemplo, la GAA de tipo silvestre típicamente tiene siete sitios que coinciden con la secuencia de reconocimiento canónica para la glucosilación ligada a N, Asn-Xaa-Thr/Ser (SEQ ID NO: 7) (Xaa puede ser cualquier resto excepto Pro), concretamente, Asn-140, -233, -390, -470, -652, -882 y -925 (Hoefsloot *et*

al., 1988; Martiniuk *et al.*, 1990b). Puede cambiarse una o más Asn en las posiciones descritas anteriores o puede eliminarse para generar GAA hipoglucosilada. En algunas realizaciones, puede cambiar Asn a Gln.

En algunas realizaciones, una proteína de fusión terapéutica puede desglucosilarse después de la síntesis. Por ejemplo, la desglucosilación puede ser a través de tratamientos químicos o enzimáticos, y puede dar lugar a desglucosilación completa o, si se elimina solamente una parte de la estructura de carbohidrato, desglucosilación parcial.

En algunas realizaciones, la glucosilación de una enzima lisosómica se modifica, por ejemplo, por oxidación y reducción, para reducir la eliminación de la proteína terapéutica de la sangre. Por ejemplo, puede desglucosilarse una enzima lisosómica por tratamiento con peryodato. En particular, el tratamiento con peryodato y un agente reductor tal como borohidruro sódico es eficaz para modificar la estructura de carbohidrato de la mayoría de las glucoproteínas. El tratamiento con peryodato oxida dioles vecinales, escindiendo el enlace carbono-carbono y remplazando los grupos hidroxilo con grupos aldehído; el borohidruro reduce los aldehídos en hidroxilos. Por ejemplo, a concentración 1 mM, el peryodato oxida exclusivamente los grupos de ácido siálico y a o por encima de 10 mM todos los dioles vecinales disponibles se convierten en aldehídos (Hermanson, G.T. 1996, Bioconjugate techniques. Academic press). Una vez formados, los grupos aldehídos son altamente reactivos y pueden formar enlaces de bases de Schiff con grupos amino primarios en la proteína, produciendo enlaces intramoleculares. Por lo tanto, los grupos aldehído formados tienen que reducirse en grupos alcohol. Un agente reductor habitualmente usado es NaBH₄ y la reacción se ejecuta mejor en condiciones alcalinas. Muchos restos de azúcar, incluyendo dioles vecinales, por lo tanto, se escinden por este tratamiento. No obstante, aunque este tratamiento convierte los carbohidratos cíclicos en carbohidratos lineales, no elimina completamente el carbohidrato, minimizando los riesgos de exposición de sitios polipeptídicos potencialmente sensibles a proteasa o antigénicos.

Grubb, J.H., *et al.* (Grubb *et al.*, 2008, PNAS 105:2616) informan del tratamiento de β -glucuronidasa humana con metaperyodato sódico seguido por reducción con borohidruro sódico. La beta-glucuronidasa modificada retenía un 90 % de la actividad, pero perdía la actividad de captación del receptor tanto dependiente de manosa como dependiente de manosa-6-fosfato. La condición de pH alcalino usada en la reducción debido al reactivo de borohidruro sódico como se describe por Grubb *et al.*, no es adecuada para todas las enzimas lisosómicas, muchas de las cuales son inestables en condiciones alcalinas.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, se usa cianoborohidruro sódico como agente reductor. Aunque la tasa de reducción de los aldehídos por cianoborohidruro es insignificante a pH neutro, y superiores, la tasa de reacción llega a ser rápida a pH ácido (Borch, *et al.* 1971, JACS 93:2897). Por ejemplo, pueden usarse regímenes que usan metaperyodato sódico y cianoborohidruro a pH 3,5-4.

Por ejemplo, el tratamiento de GAA o alfa-galactosidasa A, las enzimas deficientes en las enfermedades de Pompe y Fabry respectivamente, con peryodato y cianoborohidruro a pH 5,6 produjo una buena recuperación de la actividad enzimática. La enzima se incubó con una mezcla de volumen igual que contenía metaperyodato sódico 20 mM y cianoborohidruro sódico 40 mM en acetato de Na 0,1 M, pH 5,6 durante 60 min en hielo. El peryodato sin reaccionar se inactivó con glicerol (concentración final al 10 %) durante 15 min en hielo. Las proteínas se intercambiaron finalmente en solución salina tamponada con fosfato, pH 6,2 por diafiltración usando dispositivos de filtro de centrifugación Amicon. Otros agentes reductores, por ejemplo, borano de dimetilamina, también pueden ser útiles para reducir los aldehídos generados por oxidación con metaperyodato sódico de glucoproteínas tales como GAA en condiciones ácidas.

Por tanto, en algunas realizaciones, la reducción de GAA tratada con metaperyodato sódico implica el uso de cianoborohidruro sódico a pH ácido de pH 3,0 a pH 6. Las condiciones óptimas para la modificación química pueden determinarse fácilmente usando dos ensayos: pérdida de unión a ConA sepharose y captación disminuida en macrófagos J774E.

Por ejemplo, la capacidad de la β -glucuronidasa modificada con peryodato/borohidruro de unirse a ConA sepharose se comparó con la de β -glucuronidasa no tratada. Las enzimas se incubaron con 50 μ l de perlas ConA en Tris-HCl 20 mM, pH 6,8, NaCl 0,5 M durante 15 min a temperatura ambiente. Las perlas se centrifugaron a velocidad máxima durante 15 s. El sobrenadante (flujo directo) se extrajo cuidadosamente, se ensayó para la actividad GUS y se analizó por SDS/PAGE. Cuando se trató GUS exactamente como se presenta en Grubb *et al.*, se perdió un 60 % de la actividad de unión a ConA y estaba presente GUS sin unir solamente en el flujo directo de la muestra tratada con peryodato y posteriormente reducida con borohidruro sódico.

Administración de proteínas terapéuticas

De acuerdo con la invención, una proteína terapéutica de la invención típicamente se administra al individuo en solitario, o en composiciones y medicamentos que comprenden la proteína terapéutica (por ejemplo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad), como se describe en este documento. Las composiciones pueden formularse con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable para preparar una

composición farmacéutica. El vehículo y la composición pueden ser estériles. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, aunque sin limitación, agua, soluciones salinas (por ejemplo, NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábica, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, azúcares tales como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite esencial, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Las preparaciones farmacéuticas pueden mezclarse, si se desea, con agentes auxiliares (por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectante, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares) que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos o impiden su actividad. En una realización preferida, se usa un vehículo soluble en agua adecuado para administración intravenosa.

La composición o medicamento, si se desea, también puede contener cantidades mínimas de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. La composición también puede formularse como un supositorio, con aglutinantes tradicionales y vehículos tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

La composición o medicamento puede formularse de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para su administración a seres humanos. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición para administración intravenosa típicamente es una solución en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados juntos en una forma monodosis, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito, que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición tiene que administrarse por infusión, puede distribuirse con un frasco de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica, solución salina o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

La proteína terapéutica puede formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Una proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene una proteína terapéutica) se administra por cualquier vía apropiada. En una realización preferida, una proteína terapéutica se administra por vía intravenosa. En otras realizaciones, una proteína terapéutica se administra por administración directa a un tejido diana, tal como el corazón o el músculo (por ejemplo, intramuscular) o sistema nervioso (por ejemplo, inyección directa en el cerebro; por vía intraventricular; por vía intratecal). Como alternativa, una proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene una proteína terapéutica) puede administrarse por vía parenteral, por vía transdérmica o por vía transmucosa (por ejemplo, por vía oral o por vía nasal). Puede usarse de forma simultánea más de una vía, si se desea.

Una proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene una proteína terapéutica) puede administrarse en solitario o junto con otros agentes, tales como antihistaminas (por ejemplo, difenhidramina) o inmunosupresores u otros agentes inmunoterapéuticos que contrarrestan los anticuerpos antienzima lisosómica marcada con GILT. La expresión "junto con" indica que el agente se administra antes de, o aproximadamente al mismo tiempo que o después de la proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene la proteína terapéutica). Por ejemplo, el agente puede mezclarse en una composición que contiene la proteína terapéutica y de ese modo se administra de forma contemporánea con la proteína terapéutica; como alternativa, el agente puede administrarse de forma contemporánea, sin mezcla (por ejemplo, por suministro "combinado" del agente en la vía intravenosa por la cual también se administra la proteína terapéutica, o viceversa). En otro ejemplo, el agente puede administrarse por separado (por ejemplo, sin mezclarse), pero en un corto marco de tiempo (por ejemplo, en 24 horas) de administración de la proteína terapéutica.

La proteína terapéutica (o composición o medicamento que contiene la proteína terapéutica) se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz (es decir, una cantidad de dosificación que, cuando se administra a intervalos regulares, es suficiente para tratar la enfermedad, tal como mejorando los síntomas asociados con la enfermedad, previniendo o retardando la aparición de la enfermedad y/o también disminuyendo la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad, como se describe anteriormente). La dosis que será terapéuticamente eficaz para el tratamiento de la enfermedad dependerá de la naturaleza y grado de los efectos de la enfermedad, y se puede determinar por técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* o *in*

vivo para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos usando métodos conocidos en la técnica. La dosis precisa a emplear también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad, y debe decidirse de acuerdo con los criterios de un facultativo y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelo animal. La cantidad de dosificación terapéuticamente eficaz puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,1-1 mg/kg, aproximadamente 1-5 mg/kg, aproximadamente 5-20 mg/kg, aproximadamente 20-50 mg/kg, o 20-100 mg/kg. La dosis eficaz para un individuo particular puede variarse (por ejemplo, aumentarse o disminuirse) en el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad física o estrés, o si empeora los síntomas de la enfermedad, la cantidad de dosificación puede aumentarse.

La cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína terapéutica (o composición o medicamento que contiene la proteína terapéutica) se administra a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza y grado de los efectos de la enfermedad, y en una base continua. La administración a un "intervalo", como se usa en este documento, indica que la cantidad terapéuticamente eficaz se administra periódicamente (que se distingue de una dosis de una vez). El intervalo puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica se administra bimensualmente, mensualmente, dos veces al mes, cada tres semanas, bisemanalmente, semanalmente, dos veces a la semana, tres veces a la semana o diariamente. El intervalo de administración para un único individuo no tiene que ser un intervalo fijo, sino que puede variarse en el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad física o estrés, o si empeoran los síntomas de la enfermedad, el intervalo entre dosis puede disminuirse.

Como se usa en este documento el término "bimensualmente" significa administración una vez en dos meses (es decir, una vez cada dos meses); el término "mensualmente" significa administración una vez al mes; el término "cada tres semanas" significa administración una vez en tres semanas (es decir, una vez cada tres semanas); el término "bisemanalmente" significa administración una vez en dos semanas (es decir, una vez cada dos semanas); el término "semanalmente" significa administración una vez a la semana; y el término "diariamente" significa administración una vez al día.

La invención se refiere adicionalmente a una composición farmacéutica que comprende una proteína terapéutica, como se describe en este documento en un recipiente (por ejemplo, un vial, frasco, bolsa para administración intravenosa, jeringa, etc.) con una etiqueta que contiene instrucciones para la administración de la composición para el tratamiento de la enfermedad de Pompe, tal como por los métodos descritos en este documento.

La invención se describirá adicionalmente y más específicamente por los siguientes ejemplos. Los ejemplos, sin embargo, se incluyen con fines de ilustración, no de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Escisión con furina de marca GILT basada en IGF-II

ZC-701 se ha desarrollado para el tratamiento de la enfermedad de Pompe. ZC-701 es una proteína quimérica que contiene una marca GILT basada en IGF-II N-terminal fusionada con un espaciador de tres aminoácidos a los restos 70-952 de la α -glucosidasa ácida humana (hGAA). Específicamente, ZC-701 incluye los aminoácidos 1 y 8-67 de IGF-II humano (es decir, Δ 2-7 de IGF-II humano maduro), la secuencia espaciadora Gly-Ala-Pro, y los aminoácidos 70-952 de GAA humana. La secuencia de aminoácidos de longitud completa se muestra a continuación. La secuencia espaciadora está en negrita. La secuencia N-terminal a la secuencia espaciadora refleja los aminoácidos 1 y 8-67 de IGF-II humano y la secuencia C-terminal a la secuencia espaciadora refleja los aminoácidos 70-952 de GAA humana. Los dos sitios potenciales de escisión con furina solapantes dentro de la secuencia de marca IGF-II está en negrita, y subrayada. Las flechas indican las dos posiciones potenciales de escisión con furina.

↓ ↓

AALCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPAS**RVSRRSR**GIVEECCFRSCDLALLETYCATPA
 KSEGAPAHPRPRAVPTQCDVPPNSRFDCA~~PD~~KAITQE~~Q~~CEARGCCYIPAKQGLQGAQ
 MGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGYTATL~~TR~~TTPTFFPKDIL~~TL~~RLDVM~~ME~~TENRLHF
 TIKDPANRRYEVPLET~~PR~~VHSRAP~~S~~PLYSVEFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLNTTVAPLFFA
 DQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALE
 DGSSAHGVLLNSNAMDVVLQSPALS~~WR~~STGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGY
 PFMPYWG~~L~~GFHL~~CR~~WGYSSAITRQVVENMTRAHFPLDVQW~~ND~~LDYMD~~S~~RRDFTFN
 KDGRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYR~~P~~YDEGLRRGVFITNETGQPL
 IGKVWPGSTA~~FP~~DFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCP
 NNELENPPYVPGVVG~~GT~~LQAATICASSHQFLSTHYNLHNL~~Y~~GLTEAIA~~SH~~RALVKARGT
 RPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLG
 NTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHN~~SL~~SLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRYALLPHLY
 TLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPL
 GTWYDLQTVPIEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTL~~P~~APLDTINVHLRAGYIIP~~L~~QGP
 LTTTESRQQPMALAV~~AL~~TKGGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLAR~~N~~NTIVNEL
 V~~RV~~TSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFL
 VSWC (SEQ ID NO: 8)

5 Durante el curso de desarrollo de ZC-701, ha llegado a ser evidente que la marca GILT derivada de IGF-II en una fracción de las moléculas ZC-701 está sometida a escisión proteolítica por furina durante la producción en células CHO. El análisis N-terminal del lote de ZC-701 10-2-F45-54 reveló la presencia de dos secuencias N-terminal. Una se conformó al extremo N-terminal predicho de ZC-701 que indica la presencia de la proteína ZC-701 predicha. La otra secuencia N-terminal se alineaba con la secuencia dentro de la parte de marca de ZC-701, que indica la presencia de un derivado de ZC-701 coherente con una escisión endoproteolítica en el resto del aminoácido 34 de ZC-701. Basándose en las relaciones molares estimadas de los dos extremos N-terminales, se descubrió que este lote de ZC-701 tenía una relación de aproximadamente 1:1 de especies intactas y escindidas.

10 Tras recibir este resultado, cada uno de los otros lotes de ZC-701 se sometió a secuenciación N-terminal. Todos los lotes presentaban los mismos extremos N-terminales con las especies escindidas variando de un 20-50 % del compuesto total. Un lote, que previamente ha demostrado tener baja actividad de captación, presentaba un conjunto de extremos N-terminales indicativos de proteólisis adicional. Se concluyó que el evento proteolítico responsable de la segunda especie en todos los lotes de ZC-701 se perpetraba por furina o una proteasa de tipo furina.

15 La figura 1 muestra un mapa del extremo amino terminal de ZC-701. Los dos restos de aminoácidos en un recuadro son los sitios de los extremos N-terminales identificados en todos los lotes de ZC-701. El primero de los extremos N-terminales es el sitio de escisión del péptido señal, que produce el extremo N-terminal predicho de ZC-701. El segundo resto en un recuadro es el sitio de un evento de escisión proteolítica indeseado. La secuencia de aminoácidos proximal al sitio de escisión es Arg-Arg-Ser-Arg (SEQ ID NO: 9). Esto coincide con el sitio de escisión canónico de una proteasa presente en células CHO llamada furina, que escinde después de Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 10). La furina es un miembro de una familia de convertasas de prohormonas que incluye PC3, una proteasa responsable de la maduración de proinsulina en células de los islotes pancreáticos. De hecho, el sitio de escisión de PC3 en la proinsulina está conservado y es idéntico al sitio en que la furina escinde la marca IGF-II.

20 ZC-701 escindido con furina difiere en su peso molecular de ZC-701 intacto en aproximadamente 3000 Dalton, que representa menos de un 3 % de diferencia en el peso molecular. Debido a la heterogeneidad del oligosacárido en la proteína, la presencia de ZC-701 escindido no se detectó previamente por SDS-PAGE. Sin embargo, si ZC-701 se desglucosila primero por tratamiento con péptido N-glucosidasa F (PNGasa F), entonces la proteína escindida puede resolverse de ZC-701 intacto por SDS-PAGE.

25 Como se muestra en la figura 2, el carril 1 del gel de SDS-PAGE muestra el patrón electroforético de ZC-701 purificado desglucosilado. Son evidentes dos bandas. Se cree que la banda superior es ZC-701 intacto y se cree que la banda inferior es ZC-701 escindido con furina. Para demostrar que la banda inferior es de hecho ZC-701 escindido con furina, primero se trataron las mismas proteínas cargadas en el carril 1 con furina y después se cargaron en el carril 2. Como se muestra en la figura 2, todas las proteínas en el carril 1 comigran con la banda inferior en el carril 1, lo que indica que la banda inferior es de hecho ZC-701 escindido con furina.

30 Se ha estimado la proporción de ZC-701 que se ha escindido con furina en varios lotes de ZC-701 por cuantificación de la intensidad de banda en SDS-PAGE y por cuantificación de aminoácidos liberados en experimentos de

secuenciación N-terminal. Como se analiza anteriormente, la fracción de ZC-701 escindido ha variado de un 20 % a un 50 % en diferentes lotes.

Ejemplo 2: Proteínas de fusión dirigidas que contienen una marca GILT basada en IGF-II resistente a furina

Se puede hacer un diseño respecto al problema de escisión con furina alterando la secuencia de aminoácidos de IGF-II de modo que la alteración de aminoácidos anule al menos un sitio de escisión con furina. Se generó una serie de versiones mutantes de ZC-701 y se ensayó para la resistencia a escisión por furina. Las versiones mutantes ejemplares de ZC-701 se generaron como se describe a continuación.

ZC-701

El casete GILTA2-7-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7-GAA70-952 (plásmido p701). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA.

ggtaaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGAGCCGTGCGAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTTCCGCAGCTGTGA
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgca
caccggcggtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtcccccaacagccgttcgattgcgccctgacaaggccatcaccca
ggaacagtgcgagggccggtgctgctacatccctgcaaagcaggggtgcagggagcccagatggggcagccctgtgtcttctcc
caccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccacctgacctgaccacccccacctctt
cccaaggacatcctgacctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccactcacgatcaaagatccagctaacaggcg
ctacgaggtgcccttgagaccccgcgtgtccacagccgggcacctccccactctacagcgtggagtctctgaggagcccttcgggggt
gatcgtgcacgggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacgggtggcggccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacc
tcgctgccctgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaacc
gggacctgcgcccacgcccgtgcgaacctctacgggtctcaccctttctacctggcgctggaggacggcggtgcgacacgggggtg
ttcctgctaaacagcaatgccatggatgtgtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacat
cttctggggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagctacctggacgttggtgggatacccggtcatgccgccatactggggcctgggcttc
cacctgtgccgtggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggccacttccccctggacgtccaa
tggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcagttcaacaaggatggcttccgggacttccggccatggtgcaggagctg
caccagggcgccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgcgggagctacaggccctacgacgagg
gtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgatgggaaggtatggccgggtccactgccttccccgacttca
ccaacccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttcatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacg
agccttcaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccacaatgagctggagaaccaccctacgtgcctgggggtggtgggggga
ccctccaggcggaacatctgtgctccagccaccagtttctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatc
gcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccattgtgatctccgctcagctttgctggccacggccgatacggcg
cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctgcctcctcctgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctgcggcttctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcctggaccagctgggggccttctacccctcatgc
ggaaccacaacagcctgctcagctgtccccaggagccgtacagcttcagcgagccggccagcaggccatgaggaaggccctcacct

gcgctacgcactcctccccacctctacacgtgttccaccaggcccacgtcgcggggggagaccgtggcccgccctcttctggagtt
cccaaggactctagcactggactgtggaccaccagctcctgtggggggaggccctgctcatccccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggtacttccccctggggacatggtacgacctgcagacggtccaatagaggcccttggcagcctccccccccacctg
cagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggacgtgggtgacgctgcggccccctggacacatcaacgtccacctccgggc
tgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagctcccgccagcagccatggccctggctgtggccctgaccaagg
gtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctgggaagtgtggagcgaggggcctacacaggtcatcttct
ggccaggaataacacgatctgaatgagctggttacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg
tggccacggcgccccagcaggtcctctcaacggtgtccctgtctcaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc
tcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttctagcgggccgc (SEQ ID NO: 11)

Construcción 1459

El casete GILTΔ2-7/K37-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7/K37-GAA70-952 (plásmido p1459). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTΔ2-7/K37 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7/K37 contiene una sustitución de Arg a Lys en el aminoácido 37 de la secuencia de IGF-II humano (mayúscula negrita).

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGAGCAAGCGCAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgca
cacccggcgctccagagcagtgcccacacagtgccgagctcccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaagggccatcaccca
ggaacagtgccgagggcgcggtgctgctacatccctgcaaagcaggggtgcagggagccagatggggcagccctggtgcttctcc
caccagctacccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccacctgacctaccacccaccttctt
cccaaggacatctgacctgcccgtggagctgatgatggagactgagaaccgctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcg
ctacgaggtgcccttgagaccccgctgtccacagccggcgaccgtccccactctacagctggagttctctgaggagcccttcggggt
gatctgacccggcagctggacggcgcggtgctgctgaacacgacgggtggcgcccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacc
tcgctgccctgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaacc
gggacctgcccacgcccgggtgcgaacctctacgggtctcacctttctacctggcgctggaggacggcgggctggcacacggggtg
ttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggacccctggatgtctacat
cttctggggccagagcccaagagcgtgtgtgcagcagctacctggacgttggtgggatacccgttcatgccgccatactggggcctgggcttc
cacctgtgccgtggggctactctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggccacttccccctggacgtccaa
tggaaacgacctggactacatggactcccggaggggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttccggccatggtgcaggagctg
caccagggcgccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggcccctgccgggagctacaggccctacgacagg
gtctgcggaggggggttttcatccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttca
ccaacccacagccctggcctggtgggaggacatggtgctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacg
agccttcaacttcacaggggctctgaggacggctgccccaaacatgagctggagaaccacccctacgtgccctgggggtggttgggggga
ccctccaggcggaacacatctgtgcctccagccaccagtttcttccacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatc
gcctccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtatctcccgtcgaccttctggtggccacggccgatacgcggc

cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctgcggttctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggccccttacccttcacgt
ggaaccacaacagcctgtcagctgtccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaagggccctcacct
gcgctacgcactcctccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggccccttctcctggagt
cccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtggggggagggccctgctcatccccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttcccccttggcacatggtacgacctgcagacgggtccaatagaggcccttggcagcctccccccccacctg
cagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtggtgacgctgcggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggc
tgggtacatcatccccctgcaggggccctggcctcacaaccacagagtcggccagcagccatggccctggctgtggccctgaccaagg
gtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgtggagcgaggggctacacaggtcatcttct
ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg
tggccacggcgccccagcaggtccttccaacggtgtccctgttccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc
tcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagctgtcagggcgc (SEQ ID NO: 12)

Construcción 1460

El casete GILTΔ2-7/K40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7/K40-GAA70-952 (plásmido p1460). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTΔ2-7/K40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7/K40 contiene una sustitución de Arg a Lys en el aminoácido 40 de la secuencia de IGF-II humano (mayúscula negrita).

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGAGCCGTCGCAGCAAGGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgca
caccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtcccccaacagccgcttcgattgcgccctgacaagccatcaccca
ggaacagtgcgaggcccggtgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttctcc
caccagctacccagctacaagctggagaacctgagctccttgaaatgggctacacggccacctgacctgaccacccacacattctt
ccccaggacatcctgacctgcccgtggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcg
ctacgaggtgcccttgagaccccgctgtccacagccgggcacctgccccactctacagcgtggagtctctgaggagcccttcgggggt
gatcgtgcaccggcagctggacggccgctgctgctgaacacgacgggtggcgccctgttcttgcggaccagttcctcagctgtccacc
tcgctgccctgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaacc
gggacctgcgcccacgcccgtgcgaacctctacgggtctcaccctttctacctggcgctggaggacggcggggtcggcacacgggggtg
ttcctgctaaacagcaatgccatggatgtgtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacat
cttctggggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagctacgtggacgtgtgggatacccggtcatgccgccatactggggcctgggcttc
cacctgtgccgtgggggtactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggccacttccccctggacgtccaa
tggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctg
caccagggcgccggcgctacatgatgatcgtgacgtcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacagg
gtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggccgggtccactgccttcccgcacttca
ccaacccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttcatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacg
agccttccaacttcacaggggctctgaggacggctgccccaaacaatgagctggagaacccacctacgtgcctgggggtggtgggggga
ccctccaggcggaacatctgtgcctccagccaccagttctctccacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatc
gcctccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgatctccgctcgacctttgctggccacggccgatacgcggc
cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctgcctcctccgtgccagaaatcctgcagttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctcgggcttctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggcttctaccttcatgc
ggaaccacaacagcctgctcagctcgtcccaggagccgtacagcttcagcgagccggccagcaggccatgagggaagccctcacct
gcgtacgcactcctccccacctctacacgtgttccaccagggccacgtcgcgggggagaccgtggccgggcccccttcttctggagtt
ccccaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtggggggaggccctgctcatcacccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacgggtgccaatagaggcccttggcagcctcccaccccccacctg
cagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggacgtgggtgacgctgcgggccccctggacaccatcaactccacctccgggc
tgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcggccagcagccatggcctggtgtggccctgaccaagg
gtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgtggagcgagggcctacacaggtcatcttct
ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgaggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg
tggccacggcgccccagcaggtcctcctcaacggtgtccctgtctcaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc
tcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcagggccgc (SEQ ID NO: 13)

5 Construcción 1461

El casete GILTΔ2-7/A37-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7/A37-GAA70-952 (plásmido p1461). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTΔ2-7/A37 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7/A37 contiene una sustitución de Arg a Ala en el aminoácido 37 de la secuencia de IGF-II humano (mayúscula negrita).

10

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGAGCGCTCGCAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCG**gca**
caccccgccggtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattgcgccctgacaaggccatcaccca
ggaacagtgcgaggccccgcggtgctgctacatccctgcaaagcaggggtgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttctcc
caccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccacctgacctgaccacccccaccttctt
ccccaaggacatcctgacctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgectccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcg
ctacgaggtgcccttgagacccccgctgtccacagccgggcacctgcccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggt
gatctgacccggcagctggacggccgctgctgctgaacacgacgggtggcggccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacc
tcgctgcccctgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcacctgatgtcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaacc
gggaccttgcccacgccccggtgcgaacctctacgggtctcaccttctacctggcgctggaggacggcggtgcgcacacggggtg
ttcctgtaaacagcaatgccatggatgtgtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggacctggtgtctacat
cttctggggccagagcccaagagcgtggtgcagcagctacgtggacgtgtgggataccggttcagccgatactggggcctgggcttc
cacctgtgccgtggggctactctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggccacctccccctggacgtccaa
tggaacgacctggactacatggactcccggagggtacagttcaacaaggatggctccgggacttccggccatggtgcaggagctg
caccagggcgccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggcccctgcccggagctacaggccctacgacgagg
gtctgcggaggggggtttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggatggcccgggtccactgccttcccgcacttca
ccaacccacagccctggcctggtgggaggacatggtgctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaac
agccttcaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaaacatgagctggagaacccacctacgtgcttggggtggtgggggga
ccctccaggcggaacatctgtgcctccagccaccagtttctctccacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatc
gcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgatctccgctcgaccttctggtggccacggccgatacggcgcc
cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctgcctcctccgtgccagaaatcctgcagttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctcgggcttctgggaacacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggcttctaccttctatgc
ggaaccacaacagcctgctcagctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggccagcaggccatgaggaaggccctcacct
gcgtacgcactcctccccacctctacacgtgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccttctctgtagtt
cccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtggggggaggccctgctcatcacccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacgggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctg
cagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtggtgacgctgccggccccctggacaccatcaactccacctccgggc
tgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcgccagcagccatggccctggctgtggccctgaccaagg
gtggagagggccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgtggagcgaggggcctacacaggtcatcttct
ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg
tggccacggcgccccagcaggtcctctcaacggtgtccctgttccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc
tcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttctagcgggcgc (SEQ ID NO: 14)

5 Construcción 1463

El casete GILTΔ2-7/A40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7/A40-GAA70-952 (plásmido p1463). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTΔ2-7/A40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7/A40 contiene una sustitución de Arg a Ala en el aminoácido 40 de la secuencia de IGF2 humano (mayúscula negrita).

10

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCCGCAAG
CCGTGTGAGCCGTGCGACGCTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgca
caccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtcccccaacagccgcttcgattgcgccctgacaaggccatcaccca
ggaacagtgcgaggcccgccgtgctgctacatccctgcaaagcaggggtgcagggagcccagatggggcagccctgtgtctctcc
caccagctacccagctacaagctggagaacctgagctccttgaaatgggctacacggccacctgacctaccacccccaccttctt
cccaaggacatcctgacctgcccgtggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcg
ctacgaggtgcccttgagaccccgctgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagtctctgaggagcccttcggggt
gatctgacccggcagctggacggccgctgtgctgacacagacgggtggcgccctgttcttgcggaccagtcttcagctgtccacc
tcgtgccctgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcacctgatgtcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaacc
gggaccttgccccacgcccgtgcgaacctctacgggtctcaccttctacctggcgctggaggacggcggggtcggcacacgggggtg
ttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacat
cttctggggccagagcccaagagcgtggtgcagcagctacctggacgttggtgggatacccggttcagcccgccatactggggcctgggcttc
cacctgtgccgtggggctactcctccaccgtatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggccacttccccctggacgtccaa
tggaacgacctggactacatggactcccggaggagcttcacgttcaacaagatggcttccgggacttccggccatggtgcaggagctg
caccagggcgccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggacctgcccgggagctacaggccctacgacagg
gtctgcggaggggggtttcatcaccaacgagaccggccagccgtgattgggaaggtatggccgggtccactgccttccccgacttca
ccaacccacagccctggcctggtgggaggacatggtggtgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacg
agccttcaacttcacaggggctctgaggacggctgccccaaacaatgagctggagaaccaccctacgtgccctgggggtggttgggggga
ccctccaggcgccaacatctgtgcctccagccaccagtttcttccacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatc
gcctccacagggcgctggtgaaggtcgggggacacgcccatttggatctcccgctcgaccttctggtggccacggccgatacgcggc
cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctgcggcttctgggaacacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggccttctaccccttcacgc
ggaaccacaacagcctgctcagctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggccagcaggccatgagggaagggccctcacct
gcgtacgcactcctccccacctctacacgtgttccaccagggccacgtcgcgggggagaccgtggcccgggcccttctcctggagt
cccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtggggggaggccctgctcatcacccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttcccttgggcacatggtacgacctgcagacgggtgccaatagaggcccttggcagcctccccccccacctg
cagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggagctgggtgacgctgccggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggc
tgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcgccagcagcccatggcctggtgtggcctgaccaagg
gtggagagggccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgtggagcgaggggcctacacaggtcatcttct
ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg
tggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacgccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc
tcgtgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcagggccgc (SEQ ID NO: 15)

5 Construcción 1479

10 El casete GILTA2-7M1/K37-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7M1/K37-GAA70-952 (plásmido p1479). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7M1/K37 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTA2-7M1/K37 contiene una sustitución de Arg a Lys en el aminoácido 37 de la secuencia de IGF-II humano (mayúscula negrita).

ggtaccaagcttgccATGGGAATCCCAATGGGCAAGTCGATGCTGGTGCTGCTCACCTTCTT
GGCCTTTGCCTCGTGCTGCATTGCCGCTCTGTGCGGCGGGGAACTGGTGGACACCCCT
CCAATTCGTCTGTGGGGACCGGGGCTTCTACTTCAGCAGACCCGCAAGCCGTGTGAG
TAAGCGCAGCCGTGGCATTGTTGAGGAGTGCTGTTTTTCGCAGCTGTGACCTGGCTCT
CCTGGAGACGTACTGCGCTACCCCCGCCAAGTCTGAGGGCGCGCCCGgcacaccccgccgctc
 ccagagcagtgccacacagtgcgacgtccccccaacagccgttcgattgcgccctgacaaggccatcaccaggaacagtgcga
 ggcccgcggtgctgtacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttctccaccagctacc
 ccagctacaagctggagaacctgagctccttgaaatgggtacacggccacctgacctgaccacccccaccttcttcccaaggacat
 cctgacctgcggttgacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcc
 ctggagaccccgctgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagtctctgaggagcccttcgggggtatcgtgcaccg
 gcagctggacggcgcggtgctgtaacacgacgggtggcgccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacctgctgccctcg
 cagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaaccgggacctgcg
 cccacgcccgggtgcgaacctctacgggtctcaccctttctacctggcgctggaggacggcggggtcgccacacggggtgttctgctaaac
 agcaatgccatggtgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtggggtcctggtgctacatcttctggccc
 agagcccaagagcgtggtgcagcagtaacctggacgttgggatacccggttcacgccatactggggcctggggttccacctgtgccg
 ctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggagctcaatggaacacct
 ggactacatggactcccgaggaggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttccggccatggtgcaggagctgcaccagggcg
 gccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctggcgggagctacaggccctacgagaggggtctgcggagg
 ggggtttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggccgggtccactgccttccccgacttcaccaacccaca
 gccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttcatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaact
 tcatcaggggctctgaggacggctgcccccaacaatgagctggagaacccaccttacgtgcctgggggtggttggggggacctccaggcg
 gcaacctctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctccacag
 ggcgctggtgaaggctcgggggacacgccatttgtgatctccgctcgaccttctgtggccacggccgatacggccgacctggacgg
 gggagctgtggagctcctgggagcagctcgccctcctcgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcgggggcg
 acgtctgcggcttctgggcaacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggccttctacccttcatcggaaccacaa
 cagcctgctcagctgtccccaggagccgtacagcttcagcgagccggccagcaggccatgaggaaggccctcacctgcgctacgca
 ctctccccacctctacacgctgttccaccaggccacgtcggggggagaccgtggcccgccctcttctggagttcccaaggact
 ctgacacctggactgtggaccaccagctcctgtggggggaggccctgctcatcacccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgact
 ggctacttccccctgggcacatggtacgacctgcagacgggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgt
 gagccagccatccacagcgaggggagtggtgacgtgcggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggtgggtacatca
 tccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggc
 ccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgtggagcgaggggacctacacacaggtcatcttctggccaggaata
 acacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgaggagctggcctgcagctgcagaagggtgactgtcctgggcgtggccacggcg
 cccagcaggtcctctcaacgggtgtccctgtctcaacttcacctacagccccgacaccaaggctctggacatctgtgtcgtgtgtgatg
 ggagagcagtttctgtcagctggtgttagtctagagctgttagcggccgc (SEQ ID NO: 16)

5 Construcción 1487

El casete GILTΔ2-7M1/A37-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7M1/A37-GAA70-952 (plásmido p1487). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTΔ2-7M1/A37 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7M1/A37 contiene una sustitución de Arg a Ala en el aminoácido 37 de la secuencia de IGF-II humano (mayúscula negrita).

ggtaccaagcttgccATGGGAATCCCAATGGGCAAGTCGATGCTGGTGCTGCTCACCTTCTT
GGCCTTTGCCTCGTGCTGCATTGCCGCTCTGTGCGGCGGGGAACTGGTGGACACCCCT
CCAATTCGTCTGTGGGGACCGGGGCTTCTACTTCAGCAGACCCGCAAGCCGTGTGAG
TGCTCGCAGCCGTGGCATTGTTGAGGAGTGCTGTTTTTCGAGCTGTGACCTGGCTCT
CCTGGAGACGTACTGCGCTACCCCCGCCAAGTCTGAGGGCGCGCCGgcacaccccgccg
 ccagagcagtgccacacagtgcgacgtccccccaacagccgttcgattgcgccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcga
 ggcccgcggtgctgtacatccctgcaaagcagggggtgcagggagcccagatggggcagccctggtgttcttcccacccagctacc
 ccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggtacacggccacctgacctaccacccccaccttcttcccaggacat

cctgacctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgctccacttcacgatcaaatccagctaacaggcgctacgagtgcc
 ctggagaccccgctgtccacagccgggacccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccg
 gcagctggacggccgctgtgtgaacacgacgggtggcgccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgtgcctcg
 cagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcacctgatgtcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaacgggaccttgcg
 cccacgcccgggtgcgaacctctacgggtctcacctttctacctggcgctggaggacggcggggtcgccacacggggtgttctgctaaac
 agcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtgcagaggtgggacctggtgtctacatcttctgggccc
 agagcccaagagcgtggtgcagcagtagctggacgttgggataccggttcacgcccatactggggcctgggcttccacctgtgccg
 ctggggtactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggagctcaatggaacgacct
 ggactacatggactcccggagggtacgttcaacaaggatggcttccgggacttccggccatggtgcaggagctgcaccagggcg
 gccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggcccctgccgggagctacaggccctacgacgaggggtctgcggagg
 ggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggccgggtccactgccttcccgaactcaccaacccaca
 gccctggcctggtgggaggacatggtggtgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttcaact
 tcatcaggggctctgaggacggctgcccccaacaatgagctggagaacccacctacgtgcctgggggtggttggggggaccctccaggcg
 gcaacctctgtgctccagccaccagtttcttccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctcccacag
 ggcgctggtgaaggctcgggggacacgccatttgtgatctccgctcgaccttctgtggccacggccgatacggccgactggaggg
 gggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccg
 acgtctgcggcttctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggccccttacccttcatgcggaaccacaa
 cagcctgtcagcttgcaccaggagccgtacagcttcagcagccggccagcagggccatgagggaaggccctcacctgcgctacgca
 ctctccccccacctctacacgtgttccaccaggccacgtcgcgggggagaccgtggcccgccccttctctgaggttccccaaaggact
 ctacgacctggactgtggaccaccagctcctgtggggggaggccctgctcatcacccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgact
 ggctacttcccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgt
 gagccagccatccacagcagggggcagtggtgacgtgcggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatca
 tccccctgcagggccctggcctcacacacagagttccggcagcagccatggccctggtgtggccctgaccaagggtggagaggc
 ccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgtggagcgaggggacctacacacaggtcatcttctggccaggaata
 acacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgaggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcg
 cccagcaggtccttccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgtgttgatg
 ggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgtagcgggcgc (SEQ ID NO:17)

- 5 Como se muestra en la figura 3, tres mutantes ejemplares (es decir, construcciones 1459, 1460 y 1461) en que la alanina o la lisina se ha sustituido por uno de los restos de arginina canónicos se expresaron sin escisión detectable por furina. También se muestra en la figura 3 (panel de la derecha), la construcción 1461 que contiene una sustitución R37A que es adicionalmente resistente a adición de furina exógena.

10 *Construcción 1726*

- 15 El casete GILTA2-7A30-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7A30-39-GAA70-952 (plásmido p1726). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca Gilt30-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTA2-7A30-39 contiene una delección de los restos de aminoácido 30-39 (Arg-Pro-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCCGTGGCATCGT
TGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTAC
CCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGGgcacacccccggcgtcccagagcagtgccacacagtcgcacgtcccc
 cccaacagccgcttcgattgcgccccgacaaggccatcaccaggaacagtgcgaggcccgcggtgctgctacatccctgcaaagca
 ggggctgcaggagcccagatggggcagccctggtgcttctccaccagctacccagctacaagctggagaacctgagctcctctga
 aatgggctacacggccaccctgaccctgaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgacctgcggtggagctgatgatggagact
 gagaaccgctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagacccccgctgtccacagccgggcacc
 gtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcgggggtatcgtgcaccggcagctggacggccgctgctgctgaacacgac
 ggtggcgccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgtgccctcgcagtatatcacaggcctcgcgagcacctcagtc
 cctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaaccgggaccttgcgccacgccccggtgcgaacctctacgggtctcacc
 ttctacctggcgctggaggacggcggtggtggcacacggggtgttctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccct
 gcccttagctggaggtgcagaggtgggacccctggatgtctacatcttctgggccagagcccaagagcgtggtgcagcagctacctggac
 gttgtgggatacccggttcacgcccatactggggcctgggcttccacctgtgccgtggggctactcctccaccgctatcaccggccaggt
 ggtggagaacatgaccagggccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactccccggagggacttcacgttcaa
 caaggtatggctccgggacttccccggccatggtgcaggagctgcaccagggcgccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatca
 gcagctcgggcccctgcggggagctacagggccctacgacgagggctgcggaggggggtttctacccaacgagaccggccagccgt
 gattgggaaggtatggccgggtccactgccttccccgacttcaccaacccccacagccctggcctggtggggagacatggtggctgagtt
 ccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcacaggggctctgaggacggctgccccacaat
 gagctggagaacccacctacgtgcctgggtggtgggggacccctcaggcggaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctcc
 acacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatt
 tgtgatctcccgctcgaccttctggtggccacggcgatacggcgccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgctc
 ctccgtgccagaaatctgcagtttaacctgtgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttctgggcaacacctcagaggag
 ctgtgtgtgcgtggaccagctgggggcttctacccctcatgcggaaccacaacagcctgtcagctgtccccagggagccgtacagct
 tcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcacctgcgtacgcactctccccacctctacacgtgttccaccaggcc
 cacgtcgcgggggagaccgtggcccgcccccttctctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgg
 ggggaggccctgctcatcaccacagtgctccaggccgggaaggccgaagtactggctacttcccccttgggcacatggtacgacctgca
 gacggtgccaatagaggcccttggcagcctccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtggtg
 acgtgccggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggtgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacaga
 gtcccgccagcagccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagag
 cctggaaagtgtggagcgaggggctacacacagggtcatcttctgcccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccag
 tgaggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctc
 caacttcactacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgtgtgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctaga
 gcttgctagcggccgc (SEQ ID NO:18)

Construcción 1749

- 5 El casete GILTA2-7Δ31-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7Δ31-39-GAA70-952 (plásmido p1749). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7Δ31-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTA2-7Δ31-39 contiene una delección de los
- 10 restos de aminoácido 31-39 (Pro-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCGTGCCAT
CGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGC
TACCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGGgcacacccccggcgtcccagagcagtgccccacacagtgcgacgt
ccccccaaacagccgcttcgattgcgccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggtgctgctacatccctgcaa
agcaggggctgcaggagcccagatggggcagccctggtgcttctccacccagctacccagctacaagctggagaacctgagctcc
tctgaaatgggtacacggccaccctgacctaccacccccaccttcttcccaaggacatcctgacctgcccgtggagctgatgatgg
agactgagaaccgcctccactcacgatcaaagatccagtaacaggcgctacgaggtgcccttgagacccccgctgtccacagccgg
gcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcgggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgctgtgctgaac
acgacggtggcgccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgtgcccctgcagtatatcacaggcctcggcagcacct
cagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaacggggaccttgcgccacgccccgggtcggaacctctacgggt
ctcaccttctacctggcgctggaggacggcggggtcggcacacgggggtgttctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagcc
gagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggacccctgagtgctacatcttctggggccagagcccaagagcgtggtgcagcagta
cctggacgttgggataaccggttcacggccatactggggcctgggcttccacctgtgccgtggggctactcctccaccgctatcaccc
gccaggtgggtggagaacatgaccagggccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactccccggaggggacttc
acgttcaacaaggatggcttccgggacttccggccatgggtgcaggagctgcaccagggcgccggcgctacatgatgatcgtggatcct
gccatcagcagctcgggcccctgcggggagctacagggccctacgacgaggggtcgcggaggggggttctacccaacgagaccggcc
agccgctgattgggaaggtatggccgggtccactgccttccccgacttcaccaacccacagccctggcctggtgggagacatggtgg
ctgagttcatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcacaggggctctgaggacgggtgcccc
aacaatgagctggagaacccacctacgtgcctgggtggttggggggaccctccaggcggaacctatctgtcctccagccaccagttt
ctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacg
cccatttgtgatctcccgtcgaccttctggtggccacggcgatacgcggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagct
cgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctcgggcttctgggcaacacctca
gaggagctgtgtgctgctggaccagctgggggccccttctaccccttcacgtcgggaaccacaacagcctgctcagttcgtcccagagccg
tacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcacctgcgtacgcactcctccccacctctacacgtgttccac
caggccacgtcgcgggggagaccgtggcccgcccttctcctggagttcccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagct
cctgtgggggggaggccctgctatcacccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccctgggcacatggtacga
cctgcagacgggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccacactgcagctccccgtgagccagccatccacagcgagggggcag
tgggtgacgctgcgggccccctggacaccatcaacgtccacctcggggtgggtacatcatccccctgcaggggccctggcctcacaacc
acagagctccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagagggccgaggggagctgttctgggacgatgga
gagagcctggaagtgtgagcagggggcctacacacaggtcatcttctggccaggaataacacgacgtgaatgagctggtacgtgtg
accagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtccttccaacggtgtccc
tgttccaacttcactacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtcgtgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttag
tctagagcttgctagcgccgc (SEQ ID NO:19)

Construcción 1746

- 5 El casete GILTA2-7Δ32-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7Δ32-39-GAA70-952 (plásmido p1746). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7Δ32-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTA2-7Δ32-39 contiene una delección de los
- 10 restos de aminoácido 32-39 (Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCCGTGG
CATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTG
TGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGGgcacacccccggcgtccagagcagtgccccacacagtg
gacgtccccccaacagccgttcgattgcgccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggccccggctgctgctacatccc
tgcaaagcaggggctgcaggagcccagatggggcagccctgggtcttctccaccagctacccagctacaagctggagaacctga
gctctctgaaatgggctacacggccacctgacctaccacccccaccttcttcccaaggacatctgacctgaggctggacgtgat
gatggagactgagaaccgctccactcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttgagacccccgctgtccacag
ccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttcttgaggagcccttcgggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgctgctgt
gaacacgacgggtggcgccctgttcttgcggaccagttcttcagctgtccacctgctgccctgcagtatatcacaggcctgcggagc
acctcagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaaccgggaccttgccccacggccgggtgcgaacctctacg
ggtctcacctttctacctggcgctggaggacggcggtcgggcacacgggggtgttctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgca
gccgagccctgcccttagctggaggtgcacaggtggggtcctggatgtctacatcttctggggccagagcccaagagcgtggtgcagca
gtacctggacgttgggataccggtcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtccgctgggggctactctccaccgctatca
cccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactccccggaggga
cttcacgttcaacaaggatggcttcgggacttccccggccatgggtgcaggagctgcaccagggcgccggcgctacatgatgctgga
tctgccatcagcagctcgccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggtttcatcaccaacgagaccg
gccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaacccccacagccctggcctggtgggaggacatg
gtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccctccaacttcatcaggggctctgaggacggctg
ccccaaatgagctggagaaccacccctacgtgccttgggtggttggggggacctccaggcggaacctctgtgcctccagccacc
agtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctccacagggcgctggtgaaggctcggggga
cacgcccatttgtatctcccgtcgaccttctgtggccacggcgatacggcgccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagc
agctcgctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcgggggcgacgtctgcggcttctgggcaacac
ctcagaggagctgtgtgcgctggaccagctgggggccttctacccctcatcggaaccacaacagcctgctcagctgtccccagga
ggcgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcacctgcgtacgcactcctccccacctctacacgtgtt
ccaccaggcccacgtcgcggggggagaccgtggccccggcccttcttctggagttcccaaggactctagcacctggactgtggaccacc
agctcctgtggggggagggcctgctcatcacccagtgctccaggccgggaaggccgaagtactggacttcccttgggacacatggt
acgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggg
gcagtggtgacgtgcgggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctggcctca
caaccacagagtcccggcagcagccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacg
atggagagagcctggaagtgtggagcgaggggctacacacaggtcatcttctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtac
gtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaagggtgactgtcctggcgctggccacggcgccccagcaggtccttccaacggt

gtccctgtctcaacttcacctacagccccgacaccaaggctcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggt
gttagtctagagcttgctagcggegc (SEQ ID NO:20)

5 Construcción 1747

10 El casete GILTA2-7Δ33-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7Δ33-39-GAA70-952 (plásmido p1747). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7Δ33-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala de GAA. El casete GILTA2-7Δ33-39 contiene una delección de los restos de aminoácido 33-39 (Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCCGCACG
TGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTA
CTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCG*Ggcacacccccggcgtcccagagcagtgccccacaca*
gtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggtgctgtacata
tccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctgggtcttctccaccagctacccagctacaagtggagaac
ctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgaccgtaccacccccaccttcttcccaaggacatcctgaccctgcggtggacg
tgatgatggagactgagaaccgctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttgagagaccccgctgtcc
acagccgggcaccgtcccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcgggggtatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtg
ctgctgaacacgacgggtggcgcccctgttcttgcggaccagttcttcagctgtccacctcgtgccctgcagtatatcacaggcctcgcc
gagcacctcagtgcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaaccgggaccttgcggccacggccgggtgcgaacct
ctacgggtctcaccttctacctggcgctggaggacggcggggtcgccacacgggggtgtcctgctaaacagcaatgccatggatgtgtc
ctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggacccctggatgtctacatcttctgggccagagcccaagagcgtgtg
cagcagtagctggagttgtgggataccggttcacgccatactggggcctgggcttccacctgtgcgctggggctactctccaccg
ctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggccaccttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccgga
gggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttccggccatggtgcaggagctgcaccagggcgccggcgctacatgatgatc
gtggatcctgccatcagcagctcgggcccctgcggggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggtttcatcaccaacga
gaccggccagccgctgattgggaaggtatggccgggtccactgcttccccgacttcaccaacccccacgcccctggcctggtggagg
acatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccitccaacttcacaggggctctgaggac
ggctgccccacaatgagctggagaacccacctacgtgcctgggggtggttggggggaccctccaggcggaacctctgtgcctccag
ccaccagttctctccacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctccacagggcgctggtgaaggctcgg
gggacacgcccatttgtatctccgctcagccttctgtggccacggcgatacggcgccactggacgggggacgtgtggagctcctgg
gagcagctcgcctcctcctgctccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctcgggcttctgggca
acacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggccttctaccccttcacggaaccacaacagcctgctcagctgtcccca
ggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcagccatgaggaaaggccctcacctgcgtacgcactctccccacctctacacgc
tgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggccggccccttctctggagttcccaaggactctagcactggactgtggacc
accagctcctgtggggggaggccctgctcatcacccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccccttgggcacat
ggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgag
gggcagtggtgacgtgccggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctggcct

cacaaccacagagtgccgcccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccagggggagctgttctgggac
gatggagagagcctggaaagtgtggagcgaggggcctacacaggtcatcttctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggt
acgtgtgaccagtgaggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctggcggtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacg
gtgtccctgttccaacttcacctacagccccgacaccaaggctcctggacatctgtgtctcgtgttgatgggagagcagtttctcgtcagctg
gtgttagtctagagcttgctagcggccgc (SEQ ID NO:21)

5 *Construcción 1758*

- 10 El casete GILTΔ2-7Δ34-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ34-39-GAA70-952 (plásmido p1758). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTΔ2-7Δ34-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ34-39 contiene una delección de los restos de aminoácido 34-39 (Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCCGCAAG
CCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGAC
GTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGGgcacacccccggcgtcccagagcagtgccc
 acacagtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattgccccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggccccgcgctgct
 gctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctgggtgcttcttcccaccagctacccagctacaagctg
 gagaacctgagctcctctgaaatgggtacacgcccacctgacctgaccacccccaccttcttccccaaaggacatcctgacctgcggc
 tggacgtgatgatggagactgagaaccgctccacttcacgatcaaatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttgagacccccgc
 gtgtccacagccgggacccgtccccactctacagcgtggagtctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggcc
 gcggtgctgctgaacacgacgggtggcgccccctgttcttggcgaccagttccttcagctgtccacctcgtgccttcgcagtatatcacaggcc
 tcggcgagcacctcagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctctggaacccgggaccttgcgcccacgcccgggtgcg
 aacctctacgggtctcaccttctacctggcgctggaggacggcggggtcggcacacgggggtgttctgttaaacagcaatgcatggtatg
 tggctctgcagccgagccctgcccttagctggaggtgcacaggtgggacccctggatgtctacatcttctgggcccagagcccaagagcgt
 ggtgcagcagtagctggacgttgggatacccggtcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgtggggctactctcca
 ccgctatcacccgccaggtgggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactccc
 ggaggggacttcacgttcaacaaggtggctccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcgccggcgctacatgatg
 atcgtggatcctgccatcagcagctcgggccccctgccgggagctacaggccctacgacgaggggtctcggagggggggtttcatcaccaac
 gagaccggccagccgctgattgggaaggtatggccccgggtccactgccttccccgacttcaccaacccccacagccctggcctggtggga
 ggacatggtgggtgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcacaggggctctgagg
 acggctgccccaaatgagctggagaaccacccctacgtgcctgggggtggtggggggaccctccaggcggaaccatctgtgcctcc
 agccaccagtttcttccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctcccacagggcgctggtgaaggctc
 ggggggacacgcccatttctgatctcccgtcgaccttctgtggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcct
 gggagcagctcgcctcctcctgcccagaaatctgcagtttaacctgtgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttctggg
 caaacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctggggggccttctacccctcatgcggaaccacaacagcctgtcagctgtccc
 caggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcagcccatgaggaaggccctcacctcgcgtacgcactcctccccacctctacac
 gctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggccccggccccttctctggagttccccaaggactctagcacctggactgtgga
 ccaccagctcctgtggggggaggccctgctcatcacccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccctgggca
 catggtacgacctgcagacgggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagc
 gagggggcagtggtgacgtgcggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctgg
 cctcacaaccacagagtcggccagcagcccatggcctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgg
 gacgatggagagagcctggaagtgtgagcggaggggctacacacaggtcatcttctggccagggaataaacacgatcgtgaatgagct
 ggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctcca
 acggtgtccctgtctcaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgtgttgatgggagagcagtttctcgtca
 gctggtgttagctagagcttgtagcggegc (SEQ ID NO:22)

5 Construcción 1750

El casete GILTA2-7Δ35-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7Δ35-39-GAA70-952 (plásmido p1750). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7Δ35-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTA2-7Δ35-39 contiene una delección de los restos de aminoácido 35-39 (Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

10

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTCTGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGA
GACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGGgcacaccccgccgctccagagcag
 tccccacacagtgcgacgtccccccaacagccgttcgattgcgcccctgacaaggccatcaccaggaacagtgcgaggcccgagg
 ctgctgtacatccctgcaaagcaggggctgcaggagcccagatggggcagccctggtgcttcttccaccagctacccagctacaa
 gctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccacctgaccgtaccaccccccaccttcttccccaaggacatcctgacctg
 cggctggacgtgatgatggagactgagaaccgctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttgagacc
 ccgctgttccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagtctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggac
 ggccgctgctgctgaacacgacgggtggcgccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgtgccctcgcagtatatcaca
 ggctcgcgagcacctcagctccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccgg
 tgcgaacctctacgggtctcaccctttctacctggcgctggaggacggcggggtcggcacacggggtgttctgctaaacagcaatgccatg
 gatgtggctctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttctgggcccagagcccaaga
 gcgtggtgcagcagctacgtggacgttgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgtggggctactc
 ctccaccgtatcaccggccaggtgggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatgga
 ctcccgaggggacttcacgttcaacaaggtggcttccgggacttcccgccatggtgcagagctgcaccagggcgccggcgctaca
 tgatgatcgtgatcctgccatcagcagctcgggcccctgccgggagctacaggccctacgacagggtctcggagggggggtttcatca
 ccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccggtccactgccttccccgacttcaccaacccacagccctggcctggt
 gggaggacatggtggtgagttcatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcacaggggctct
 gaggacggctgccccaaacatgagctggagaacccacctacgtgcctggggtggttggggggaccctccaggcggaaccatctgtg
 cctccagccaccagtttctctccacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgctcccacagggcgctggtgaa
 ggctcgggggacacgccatttgtgatctcccgtcgcaccttctgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtgga
 gctcctgggagcagctcgcctcctcgtgccagaaatctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctcgggctt
 cctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccacagctgggggcttctacccctcatcggaaccacaacagcctgctcag
 tctgccccaggagcgtacagcttcagcgagccggcccagcagggccatgaggaaggccctcacctgcgctacgcactcctccccacc
 tctacacgtgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggccccttctctgagttccccaaggactctagcacctgga
 ctgtggaccaccagctcctgtggggggaggccctgctcatcaccacagtgctccaggccgggaaggccgaagtactggtacttccct
 tgggacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatc
 cacagcgagggggcagtggtgacgctgccggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagg
 gccctggcctcacaaccacagagtcggccagcagccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagagggccgaggggagc
 tgtctgggacgatggagagagcctggaagtgtggagcgaggggctacacacaggtcatcttctggccaggaataaacgacgtgga
 atgagctggtagctgtgaccagtggggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgcccagcaggtc
 ctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtctggacatctgtgtcgtgttgatgggagagcagttt
 tcgtcagctggtgttagctagagcttctagcgccgc (SEQ ID NO:23)

5 Construcción 1748

- El casete GILTΔ2-7Δ36-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ36-39-GAA70-952 (plásmido p1748). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTΔ2-7Δ36-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ36-39 contiene una delección de los restos de aminoácido 36-39 (Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCTCGTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCT
GGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccgccgtccag
agcagtccccacacagtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattgcgccctgacaaggccatcacccaggaaacagtgcgaggcc
cgcggctgctgctacatccctgcaaaagcaggggctgcagggagccagatggggcagccctggtgcttctccacccagctacccag
ctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccacettctcccaaggacatcctg
accctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttg
gagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcgggggtgatcgtgcaccggca
gctggacggccgcgtgctgctgaacacgacgggtggcgccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgtgccctcgagt
atatcacaggccctcgccgagcacctcagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctctggaacgggaccttgcgcca
cgcccggtgcgaacctctacgggtctcacctttctacctggcgctggaggacggcggggtcggcacacgggggttctctgtaaacagca
atgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggctgcacaggtgggacccctggatgtctacatcttctgggcccaga
gcccgaagagcgtggtgcagcagctacctggacgttggggataccggtcatccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctgg
ggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccaggggccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggac
tacatggactcccgaggaggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccgccatggtgcaggagctgcaccaggcgggccg
gcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggcccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggg
gtttcatcacaacgagaccggccagccgctgattgggaaggatggccggggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccc
tggcctgggtgggagacatggtggtgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttcaacttcac
aggggctctgaggacggctgccccaaatgagctggagaacccaccctacgtgcctgggggtggttggggggaccctccaggcgga
ccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctcccacagggc
gctgtgtaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctccgctcgcaccttctgtggccacggccgatacggcgccactggacggggg
acgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgt
ctgcggcttctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggaccagctgggggccttctacccttcatgcggaaccacaacag
cctgctcagctgccccaggagccgtacagcttcagcagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcacctgcgctacgcactcc
tccccacctctacagctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggccccttctctggagtccccaaggactcta
gcactggactgtggaccaccagctcctgtggggggaggccctgctcatcacccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgtactgg
ctacttccccctggggacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgag
ccagccatccacagcgaggggacgtgggtgacgctccggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccc
cctgcagggccctggcctcacaaccacagatcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaaggggtggagaggccga
ggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgtggagcgaggggcctacacacaggtcatcttctggccaggaataaac
gatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgggggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgcccc
agcaggtcctctcaacggtgtccctgtctcaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgtgttgatgggag
agcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgctagcgccgc (SEQ ID NO:24)

5 Construcción 1751

- El casete GILTA2-7Δ29-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7Δ29-40-GAA70-952 (plásmido p1751). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7Δ29-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTA2-7Δ29-40 contiene una delección de los restos de aminoácido 29-40 (Ser-Arg-Pro-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCGGCATCGTTGAGGA
GTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTA**CTGTGCTACCCCCGC**
CAAGTCCGAGGGCGCGCCCGGgcacaccccgccgtcccagagcagtgcccacacagtcgcacgtccccccaacage
cgttcgattgcgccccgacaaggccatcacccaggaacagtcgcaggcccgccgtgctgctacatccctgcaaagcaggggctgca
gggagcccagatggggcagccctggtgcttctccacccagctacccagctacaagctggagaacctgagtcctctgaaatgggcta
cacggccacctgaccgtaccacccccaccttcttcccaaggacatcctgacctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccg
cctccacttcacgatcaaatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttgagaccccgctgtccacagccgggcaccgtcccact
ctacacgctggagttctctgaggagcccttcgggggtgatcgtgcacgggcagctggacggccgctgctgctgaacacgacggtggcgc
ccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgtgccctcgcagtatatcacaggcctcgcgagcacctcagtcacctgatgct
cagcaccagctggaccaggatcacctgtggaaccgggaccttgcccccagcccggtgcgaacctctacgggtctcacctttctacct
ggcgctggaggacggcggtgcgcacacggggtgttctgctaaacagcaatgccatggatgtggctctgcagccgagccctgccctta
gctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttctgggccagagcccaagagcgtggtgcagcagctacgtggacgtgtgg
gataccggttcacgtccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgtggggctactcctccaccgtatcacccgccaggtgtggga
gaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccgaggggacttcacgttcaacaagga
tggcttccgggacttcccgccatggtgcaggagctgcaccaggcgccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctc
gggcccctgcggggagctacaggccctacgacgaggggtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattggg
aaggtatggccgggtccactgccttccccgacttcaccaacccacagccctggcctggtgggagggacatggtggctgagttccatgac
caggtgcccttcgacggcatgtgattgacatgaacgagccttccaaattcatcaggggctctgaggacggctgccccacaatgagctgg
agaacccaccttacgtgcttgggtggtggggggacctccaggcggaacatctgtgctccagccaccagtttcttccacacacta
caacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgccctcccacaggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtatctc
ccgctcgacctttgtgtgccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgc
cagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgctctgtgcggggccgacgtctgcggcttctgggcaacacctcagaggagctgtgtgt
gcgctggacccagctgggggcttctaccccttcatgcggaaccacaacagcctgtcagctcgtccccaggagccgtacagcttcagcga
gccggcccagcaggccatgaggaaggccctcacctgcgctacgcactcctccccacctctacacgtgttccaccaggccacgtcg
cgggggagaccgtggcccgccctcttctggagttcccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtggggggag
gccctgctatcacccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggttacacctgcagacggtg
ccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggacagtggtgacgctgc
cggcccccttgacaccatcaacgtccacctccgggtgggtacatcatccccctgcaggggccctggcctcacacacagagtccgc
cagcagcccattggcctgtgtggcctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaa
gtgctggagcgaggggacctacacaggtcatcttctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtggaggga
gctggcctgcagctgcagaagggtgactgtcctggcggtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacgggtgtccctgtctccaactca
cctacagccccgacaccaaggctcctggacatctgtgtctcgtgtgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta
gcggcgc (SEQ ID NO:25)

5 Construcción 1752

El casete GILTA2-7Δ30-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7Δ30-40-GAA70-952 (plásmido p1752). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7Δ30-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTA2-7Δ30-40 contiene una delección de los restos de aminoácido 30-40 (Arg-Pro-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCGGCATCGTTGA
GGAGTGCTGTTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCC
CGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGGgcacacccccggcgtccagagcagtgccccacagtgcgacgtccccccaa
 cagccgcttcgattgcgccctgacaaggccatcaccaggaacagtgcgaggcccgcggtgctgtcatcctgcaaagcaggggc

tgcaggagcccagatggggcagccctggtgcttctccaccagctacccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgg
 gctacacggccaccctgacctgaccacccccaccttcttcccaaggacatcctgacctgcggctggacgtgatgagactgaga
 accgctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgccctggagaccccgctgtccacagccggcaccgtcc
 ccactctacagcgtggagtctctgaggagcccttcggggtgctgacacggcgagctggacggccgcgtgctgtgaacacgaggtg
 gcgcccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccactcgtgccttcgagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcctg
 atgtcagcaccagctggaccagatcacctgtggaacggggacctgcgccacgcccgggtgcgaacctctacgggtctcaccttct
 acctggcgtgaggagcggcggtcggcacacggggtgttctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcc
 cttagctggaggtgcacaggtgggacctggtgtctacatcttctgggccagagcccaagagcgtggtgcagcagctacctggacgtg
 tgggatacccgcttcatgcgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgtggggctactcctccaccgctatcaccgccaggtggt
 ggagaacatgaccagggccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccgaggggacttcacgttaacaa
 ggatggcttccgggacttcccgccatggtgcaggagctgcaccagggcgccggcgctacatgatgacgtggtacctgccatcagca
 gctcggggcctgcgggagctacagccctacgacgaggggtctgcggaggggggtttcatcacaacgagaccggccagccgtgatt
 gggaaggtatggccggggtccactgccttccccgacttccaacccccagccctggcctggtgggaggacatggtggtgagttccat
 gaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaaacatgag
 ctggagaacccacctacgtgcctggggtggttggggggaccctccaggcgcccaacctctgtgcctccagccaccagtttcttccacac
 actacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgccatttga
 tctcccgctcgaccttctggtggccacggccgatacggcgccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgctcctccg
 tggcagaatctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggcgacgtctgcggcttctgggcaacacctcagaggagctgtg
 tgtgcgtggaccagctgggggccttctaccccttcatgcggaaccacaacagcctgtcagctgtccccaggagccgtacagcttcagc
 gagccggcccagcaggccatgaggaaggccctaccctgcgtacgactcctccccacctctacagctgttccaccaggcccacgt
 cgcgggggagaccgtggcccgcccttcttctggagtccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggg
 aggcctgtctatcaccacagtgctccaggccgggaaggccgaagtgtggtacttcccttgggcacatggtacgacctgcagacgg
 tggcaatagaggcccttggcagcctccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggacgtgggtgacgtg
 ccggccccctggacacatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcaggggcctggcctcacaaccacagagtcgg
 ccagcagcccatggcctgggtgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctgga
 agtgctggagcgaggggctacacaggtcatcttctggccaggaataacacgacgtgtaatgagctggtacgtgtgaccagtgaggg
 agctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtccttccaacgggtgtcctgttccaacttc
 acctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgtgtgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagctgct
agcgggcgc (SEQ ID NO:26)

5

Construcción 1753

10 El casete GILTA2-7Δ31-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el
 vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7Δ31-40-GAA70-952 (plásmido p1753). Los sitios de restricción para la
 clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia
 subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7Δ31-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca
 están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTA2-7Δ31-40 contiene una delección de los
 15 restos de aminoácido 31-40 (Pro-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

15

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGGGCATCGT
TGAGGAGTGCTGTTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTAC
CCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccgccgtcccagagcagtcccacacagtgcgacgtccc
cccaacagccgcttcgattgcgccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgccgctgctgctacatccctgcaaagca
ggggctgcaggagcccagatggggcagccctggtgcttctccacccagctacccagctacaagctggagaacctgagtcctctga
aatgggctacacggccacccgtaccacccccaccttctcccaaggacatcctgacctgcggctggacgtgatgatggagact
gagaaccgctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttgagacccccggtgtccacagccgggcacc
gtccccactctacagcgtggagtctctgaggagcccttgggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgctgctgctgaacacgac
ggtggcgccctgttcttgcggaccagttcctcagctgtccacctgctgccctcgagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtc
cctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaaccgggacctgcgccacgcccgggtgcgaacctctacgggtctcacc
ttctacctggcgtggaggacggcggtcgccacacggggtgttctgctaacagcaatgccatggatgtgtcctgcagccgagccct
gcccttagctggaggtgcaggtgggatcctggatgtctacatcttctggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagctacgtggac
gttggtgggataccgttcagtcgccatactggggcctggggttccacctgtgccgctggggctactctccaccgctatcacccgccaggt
ggtggagaacatgaccagggccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggagggaacttcacgttcaa
caaggtatggcttccgggacttccggccatggtgcaggagctgcaccagggcgccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatca
gcagctcgggcccgtccgggagctacaggccctacgacgaggtctgcggagggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgt
gattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaacccccagccctggcctgggtgggaggacatggtggtgagtt
ccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcacaggggctctgaggacggctgccccaaacat
gagctggagaaccaccctacgtgcctgggggtggtggggggaccctccaggcggaacctctgtgcctccagccaccagtttctctcc
acacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgctccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgccatt
tgtgatctccgctcgaccttctgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgctc
ctccgtgccagaatctgcagtttaacctgctgggggtgcctctgctggggccgacgtctgcggcttctgggcaacacctcagaggag
ctgtgtgtgcgctggaccagctgggggccccttctacccctcatgcggaaccacaacagcctgctcagctgccccaggagccgtacagct
tcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcacctcgctacgcactcctccccacctctacacgctgttccaccaggcc
cacgtcgccgggggagaccgtggcccggccccttctcagggttcccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgg
ggggaggccctgctcatccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtactggctacttccccctgggacatggtacgacctgca
gacggtgccaatagaggcccttggcagcctccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggagtggtg
acgctgccggccccctggacacatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcaggggccctggcctcacaaccacaga
gtcccgcagcagccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagag
cctggaaagtgtggagcgaggggcctacacacaggtcatcttctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctgggtacgtgtgaccag
tgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctggcgctggccacggcgccccagcaggtccttccaacggtgtccctgtctc
caacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtctcgtgtgtatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctaga
gcttgctagcggcgc (SEQ ID NO:27)

Construcción 1754

- 5 El casete GILTA2-7Δ32-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7Δ32-40-GAA70-952 (plásmido p1754). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7Δ32-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTA2-7Δ32-40 contiene una delección de los
- 10 restos de aminoácido 32-40 (Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGGCAT
CGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGC
TACCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGGgcacacccccggcgtccagagcagtgccccacagtgcgacgt
ccccccaacagccgcttcgattgcgccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggtgctgctacatccctgcaa
agcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttctccaccagctacccagctacaagctggagaacctgagctcc
tctgaaatgggtacacggccaccctgaccgtaccacccccaccttcttcccaaggacatcctgacctgcggtggagctgatgatgg
agactgagaaccgcctccactcacgatcaaagatccagtaacaggcgctacgaggtgcccttgagaccccgctgtccacagccgg
gcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggatcgtgcaccggcagctggacggccgctgctgctgaac
acgacggtggcgccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgtgccctgcagtatatcacaggcctcggcagcacct
cagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggtaccctgtggaaccgggacctgcgccacgccccgggtgcgaacctctacgggt
ctcacctttctacctggcgctggaggacggcggggtcggcacacgggggtgtctgctaaacagcaatgccatggatgtgtcctgcagcc
gagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggacctggtgtctacatcttctggggccagagcccaagagcgtgtgcagcagta
cctggacgttgggatacccggttcacgccatactggggcctgggcttcacctgtgccgtggggctactcctccaccgctatcccc
gccaggtggtggagaacatgaccagggccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactccccggagggacttc
acgttcaacaaggatggcttcgggacttccggccatggtgcaggagctgcaccagggcgccggcgctacatgatgatcgtggatcct
gccatcagcagctcgggacctcggggagctacagggccctacgacgaggggtcgcggaggggggtttctacccaacgagaccggcc
agccgctgattgggaaggtatggccgggtccactgccttccccgacttcaccaacccccacagccctggcctggtgggagagacatggtgg
ctgagttcatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcacaggggctctgaggacgggtcccc
aacaatgagctggagaacccacctacgtgcctgggggtggtggggggaccctccaggcggaacctatgtgcctccagccaccagttt
ctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacg
cccatttgtgatctccgctcgaccttctggtggccacggccgatacggcgccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagct
cgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttctgggcaacacctca
gaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggccttctaccccttcacgtcgggaaccacaacagcctgctcagctgccccaggagccg
tacagcttcagcgagccggccagcagggccatgaggaaggccctcacctgcgtacgcactcctccccacctctacacgtgttccac
caggccacgctcgggggggagaccgtggcccgcccttcttctggagttcccaaggactctagcactggactgtggaccaccagct
cctgtggggggaggccctgctcatccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtactggctacttcccccttgggcacatggtacga
cctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggacag
tgggtgacgtgccggccccctggacaccatcaacgtccacctcgggctgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaacc
acagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagagggccgaggggagctgttctgggacgatgga
gagagcctggaagtgtgagcgaggggcctacacaggtcatcttctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtg
accagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacgggtgtccc
tgtctcaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgtgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttag
tctagagcttgctagcggegcg (SEQ ID NO:28)

Construcción 1755

- 5 El casete GILTΔ2-7Δ33-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ33-40-GAA70-952 (plásmido p1755). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTΔ2-7Δ33-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ33-40 contiene una delección de los
- 10 restos de aminoácido 33-40 (Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCTCTGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAGG
CATCGTTGAGGAGTGCTGTTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTG
TGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGGgcacaccccgccgtcccagagcagtgcccacacagtgc
gacgtccccccaacagccgttcgattgcgccctgacaaggccatcaccaggaacagtgcgagggcccgccgtgctgtacatccc
tgcaaacgaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttctccaccagctacccagctacaagctggagaacctga
gctcctctgaaatgggctacacggccacctgacctgaccacccccaccttcttcccaaggacatcctgacctgcggctggacgtgat
gatggagactgagaaccgctccacttcacgatcaaatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttgagaccccgctgtccacag
ccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcgggggtatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgt
gaacacgacgggtggcgccctgttcttcgggaccagttccttcagctgtccacctcgtgccctcgagtatatcacaggcctcgccgagc
acctcagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggtaccctgtggaacggggacctgcgccacgcccgggtgcgaacctctacg
ggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcggggtcggcacacgggggtgttctgctaacagcaatgccatggatgtggtcctgca
gccgagccctgcccttagctggaggtgcacaggtgggatcctggatgtctacatcttctggggccagagcccaagagcgtggtgcagca
gtacctggacgttgtgggataccggtcatgccccatactggggcctgggcttccacctgtccgctggggctactcctccaccgctatca
cccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggagctcaatggaacgacctggactacatggactcccgaggga
cttcacgttcaacaaggatggcttcgggacttccggccatggtgcaggagctgcaccagggcgccggcgctacatgatgatctgga
tcctgccatcagcagctcgggcccctgccgggagctacaggccctacgacgaggggtctgcggaggggggttttcatccaacgagaccg
gccagccgtgattgggaaggtatggccgggtccactgccttccccgacttcaccaacccacagccctggcctggtgggagacatg
gtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccctccaacttcacaggggctctgaggacggctg
ccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctgggggtggtggggggacccctccaggcgccaacctctgtgcctccagccacc
agtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgccctccacagggcgctggtgaaggctcggggga
cacgcccatttgtgatctcccgctcgaaccttctgtggccacggccgatacggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagc
agctcgctcctcctgctccagaaatcctgcagtttaacctgtgggggtgctctggtcggggccgacgtctcgggcttctgggcaacac
ctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggcttctacccttcatcggaaccacaacagcctgctcagctgtccccagga
gccgtacagcttcagcgagccggcccagcagggcatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctccccacctctacacgtgtt
ccaccagggccacgtcgcgggggagaccgtggcccggccccttctctggagtcccaaggactctagacctggactgtggaccacc
agctcctgtggggggagggcctgctcatccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccctgggcacatggt
acgacctgcagacgggtgcaatagaggcccttgccagcctccccccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggg
gcagtgggtgacgtgcggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctggcctca
caaccacagagtcccgccagcagccatggccctggctgtggccctgaccaaggggtggagaggcccaggggagctgttctgggacg
atggagagagcctggaagtgtggagcgaggggcctacacaggtcatcttctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtac
gtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtccttccaacggt
gtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgtgtgatgggagagcagtttctcgtcagctggt
gttagtctagagcttgctagcgccgc (SEQ ID NO:29)

5 Construcción 1756

- El casete GILTA2-7Δ34-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTA2-7Δ34-40-GAA70-952 (plásmido p1756). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTA2-7Δ34-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTA2-7Δ34-40 contiene una delección de los restos de aminoácido 34-40 (Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTA
CTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGGcacacccccggcgtccagagcagtgccacaca
gtgcgacgtcccccaacagccgttcgattgcgccctgacaaggccatcacccagggaacagtgcgagggcccgcggtgctgtaca
tccctgcaaagcaggggtgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttctccacccagctacccagctacaagctggagaac
ctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgaccgtaccacccccaccttcttcccaaggacatcctgaccctgcggctggacg
tgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttgagaccccgctgtcc
acagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctgaggagcccttcgggggtatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtg
ctgctgaacacgacgggtggcgccctgttcttcgggaccagttccttcagctgtccacctcgtgccctcgcagtatatcacaggcctcgcc
gagcacctcagtcacctgatgctcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaacggggaccttgcgcccacgcccgggtgcgaacct
ctacgggtctcaccttctacctggcgctggaggacggcggtcggcacacgggggtgttctgctaacagcaatgccatggatgtgtc
ctgcagccgagccctgcccttagctggaggtgcacaggtgggacctggtatgtctacatcttctggggccagagcccaagagcgtgtg
cagcagttacctggacgttgggatacccggttcacgtccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgtggggctactcctccaccg
ctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccaggggccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccga
gggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttccggccatgggtgcaggagctgcaccaggggcgccggcgctacatgatgatc
gtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggctgcggaggggggtttcatcaccaacga
gaccggccagccgctgattgggaaggtatggccgggtccactgccttccccgacttcaccaacccccacagccctggcctggtgggagg
acatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcacaggggctctgaggac
ggctgccccacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctgggtggttggggggaccctccaggcggaacctatgtgcctccag
ccaccagtttctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgg
gggacacgcccatttgtatctcccgtcgcaccttctggtggccacggccgatacggccgactggacgggggacgtgtggagctcctgg
gagcagctcgcctcctccgtgccagaaatctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttctgggca
acacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggccttctaccccttcacgcggaaccacaacagcctgtcagctgtcccc
ggagccgtacagctcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcacctgcgtacgcactcctccccacctctacacgc
tgttcaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggccggccctcttctggagttccccaaggacttagcacctggactgtggacc
accagctcctgtggggggaggccctgctcatccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggacat

ggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgag
gggcagtggtgacgtgccggccccctggacacatcaacgtccacctccgggtgggtacatcatccccctgcaggggccctggcct
cacaaccacagagtcgccgagcagccatggcctggctgtggcctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggac
gatggagagagcctggaagtgtggagcgaggggctacacaggtcatcttctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggt
acgtgtgaccagtggggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctcaacg
gtgtccctgttccaacttcacacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgtgtgtgatgggagagcagtttctcgtcagctg
gtgttagcttagagcttctagcggccgc (SEQ ID NO:30)

5 Construcción 1763

- 10 El casete GILTΔ2-7M1/L27A37-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7M1/L27A37-GAA70-952 (plásmido p1763). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la marca GILTΔ2-7M1/L27A37 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la marca están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7M1/L27A37 contiene las sustituciones Y27L y R37A en la secuencia de IGF-II humano. La secuencia de ADN del casete GILT difiere de la secuencia de ADN humano en cada 6.º codón.

ggtaccaaagcttgccATGGGAATCCCAATGGGCAAGTCGATGCTGGTGCTGCTCACCTTCTT
GGCCTTTGCCTCGTGCTGCATTGCCGCTCTGTGCGGCGGGGAAGTGGTGGACACCCT
CCAATTCGTCTGTGGGGACCGGGGCTTCCTGTTACGACAGACCCGCAAGCCGTGTGAG
TGCTCGCAGCCGTGGCATTGTTGAGGAGTGCTGTTTTTCGCAGCTGTGACCTGGCTCT
CCTGGAGACGTACTGCGCTACCCCCGCCAAGTCTGAGGGCGCGCCGGgcacaccccgccgctc
ccagagcagtgccacacagtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattcgccccctgacaaggccatcaccaggaacagtgcgag
ggccccgggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcgagccctggtgcttctccaccagctacc
ccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccacctgacctgtaccacccccaccttcttcccaaggacat
cctgacctgcggtgagcgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcc
cttgagacccccgctgtccacagccgggcacctgccccactctacagcgtggagtctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccg
gcagctggacggccgctgctgctgaacacgacgggtggcgccccctgttcttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgtgccctcg
cagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagctcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcg
ccacgccccggtgcgaacctctacgggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcggggtcggcacacggggtgttctgctaaac
agcaatgccatggatgtgtcctgacggcagccctgcccttagctggaggctgcacaggtgggatcctggatgtctacatcttctgggcc
agagcccaagagcgtggtgcagcagtagctggacgttggggatacccgctcatgccgcatactggggcctggggttccacctgtgccg
ctgggggtactcctccaccgctatcaccgccagggtggtggagaacatgaccaggggcccacttccccctggagctccaatggaacgacct
ggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgaggaagctgcaccaggggcg
ggcgcgctacatgatgctgtggtacctgccatcagcagctcgggccctgcccggagctacaggccctacgacgaggggtctgcggagg
gggtgtttcatcacaacgagaccggccagccgctgattgggaaggatggccgggtccactgccttcccgacttcaccaacccaca
gcccctggcctggtgggaggacatggtgggtgagttcatgaccagggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaact
tcatcaggggctctgaggacggctgccccacaatgagctggagaacccacctacgtgcctgggggtggttgggggggacctccaggcg

gcaacctctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgctctccacag
ggcgctggtgaaggctcggggggacacgccatttgtgatctcccgtcgaccttctgtggccacggccgatacgccggccactggacgg
gggacgtgtggagctcctgggagcagctcgccctcctcgtgccagaatctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccg
acgtctgcggcttctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccagctgggggcttctacccttcatcggaaccacaa
cagcctgtcagctgtccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaaggccctcacctcgctacgca
ctctccccacctctacagctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccccttctcctggagttcccaaggact
ctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtggggggaggccctgctcatccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgact
ggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacgggtccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctcccgt
gagccagccatccacagcgagggggcagtggtgacgctgccggcccccttgacaccatcaacgtccacctccgggtgggtacatca
tccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagctcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggc
ccgagggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgtggagcgagggggcctacacacaggtcatcttctggccagggaata
acacgatcgtgaatgagctgtgactgtgaccagtgaggggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcg
ccccagcaggtccttccaacgggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtcgtgtgatg
ggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgctageggcg (SEO ID NO:31)

5 Ejemplo 3: Expresión y purificación de enzimas GAA marcadas con GILT

Cultivo tisular

10 Los plásmidos de GAA marcados con GILT se transfectaron cada uno en células FreeStyle 293-F en suspensión como se describe por el fabricante (Invitrogen). En resumen, las células se cultivaron en medio Opti-MEM I (Invitrogen) en matraces de agitación de policarbonato en un agitador orbital a 37 °C y CO₂ al 8 %. Las células se ajustaron hasta una concentración de 1x10⁶ células/ml, después se transfectaron con una relación 1:1:1 de ml de células:µg de ADN:µl de 293fectin. Se recogieron alícuotas del cultivo 5-7 días después de la transfección y se centrifugaron a 5.000 x g durante 5 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron congelados a -80 °C.

15 Purificación y concentración de proteínas

El material de partida fue sobrenadante de cultivo celular de mamífero, como se describe anteriormente, descongelado de su almacenamiento a -80 °C. Se añadió ácido cítrico hasta alcanzar pH 6,0, después se añadió sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración final de 1 M. El material se pasó a través de un filtro Supor-Mach de 0,2 µm (Nalgene).

El material filtrado se cargó en una columna de fenil-Sepharose™ 6 Low-Sub Fast-Flow (GE Healthcare) preparada con tampón de carga HIC (citrato 50 mM pH 6,0, AmSO₄ 1 M). La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado HIC (citrato 50 mM pH 6,0, AmSO₄ 0,8 M), y se eluyó con 5 volúmenes de columna de tampón de elución HIC (citrato 50 mM pH 6,0). Las muestras de cada pico de elución se combinaron y se intercambiaron el tampón a solución salina tamponada con fosfato (NaCl 145,15 mM, KCl 2,33 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 6,2) usando concentradores de centrifugación centricon (Amicon) y columnas de desalado Bio-Spin-6 (Bio-Rad).

Actividad enzimática

La expresión de GAA se determinó por un ensayo enzimático de para-nitrofenol (PNP). La enzima GAA se incubó en 50 µl de mezcla de reacción que contenía acetato sódico 100 mM pH 4,2 y sustrato de α-glucósido de para-nitrofenol (PNP) 10 mM (Sigma N1377). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 20 minutos y se detuvieron con 300 µl de carbonato sódico 100 mM. Se midió la absorbancia a 405 nm en placas de microtitulación de 96 pocillos y se compararon con curvas patrón derivadas de p-nitrofenol (Sigma N7660). 1 unidad PNP de GAA se define como 1 nM de PNP hidrolizado/hora.

Ejemplo 4: Ensayos competitivos de unión a receptor

Se examinó la afinidad de proteínas marcadas con GILT por el receptor de IGF2 (IGF2R), el receptor IGF1 (IGF1R) y el receptor de insulina (IR) en experimentos competitivos de unión realizados en un formato de placa de 96 pocillos. Los receptores se recubrieron a temperatura ambiente durante una noche sobre placas blancas Reacti-bind (Pierce, n.º Cat. 437111) en tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6) a una concentración de 0,5 µg/pocillos (IGF2R) o 1 µg/pocillo (IGF1R, IR). Las placas se lavaron con tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato más Tween-20 al 0,05 %), después se bloquearon en tampón de bloqueo Super (Pierce, n.º Cat. 37516) durante 1 hora. Después de otro lavado de la placa, se añadieron ligandos biotinilados (Cell Sciences) a los pocillos; los pocillos de IGF2R recibieron IGF2-biotina 8 nM, los pocillos de IGF1R recibieron IGF1-biotina 30 mM y los pocillos de IR recibieron insulina-biotina 20 nM. Junto con los ligandos biotinilados, los pocillos también contenían diluciones en serie de las muestras de proteína GAA marcada con GILT o ligandos de control no biotinilados que actúan como inhibidores de unión para los ligandos biotinilados. Después de una incubación con balanceo de 2 horas, las placas se lavaron y los ligandos biotinilados unidos se detectaron con una incubación con estreptavidina-HRP (R&D, n.º Cat. 890803, dilución 1:200 en tampón de bloqueo, 30 minutos), seguido por una incubación con sustrato quimioluminiscente Super Elisa Pico (Pierce, n.º Cat. 37070, 5 minutos). La señal quimioluminiscente se midió a 425 nm.

El porcentaje de ligando biotinilado unido se calculó para cada concentración de competidor en el ensayo de competición de unión a IGF2R y se determinaron los valores de CI₅₀ (figura 4). La proteína 1752 con una delección de los restos 30-40 de IGF2 presentaba un valor de CI₅₀ similar a ZC-701 marcado con GILT (figura 4), lo que indica que la delección de estos restos en la región del bucle de IGF2 no parece afectar a la unión a IGF2R. La proteína 1751 con una delección de los restos 29-40 de IGF2 presentaba un valor mayor de CI₅₀ (figura 4), lo que indica que no compete también por la unión al IGF2R.

En una placa de ensayo de IGF2R diferente, la comparación de ZC-701 y la proteína 1763 produjo valores de CI₅₀ que diferían en un 35 % (véase la figura 5).

En un ensayo que mide la competición de la unión de insulina biotinilada a insulina unida a placa, las proteínas 1751 y 1752 no fueron tan eficaces como inhibidores en comparación con 701 o IGF-II (véase la figura 6). Esto indica que las proteínas 1751 y 1752, con delecciones en la región de bucle correspondiente a los aminoácidos 30-40 de la marca GILT, tenían una afinidad reducida por el receptor de insulina en comparación con la marca GILT intacta en 701 o IGF-II.

En un ensayo que mide la competición de la unión de IGF-I biotinilado a IGF1R unido a placa, la proteína 1763 no fue tan eficaz como inhibidor en comparación con 701, IGF-II o IGF-I (véase la figura 7). Esto indica que la proteína 1763, con las mutaciones Δ2-7, Y27L y R37A en la marca GILT, tenía una afinidad reducida por el receptor de IGF1 en comparación con ZC-701 o IGF-II.

Ejemplo 4. Ensayo adicional de unión al receptor de insulina

La proteína ZC-1487 se ensayó para su afinidad de unión por el receptor de insulina. La proteína ZC-1487 contiene el casete GILTD2-7M1/A37 que contiene una sustitución de Arg a Ala en el aminoácido 37 de la secuencia de IGF2 humano y es resistente a proteólisis por furina. Se analizaron dos lotes diferentes de esta proteína purificada de células CHO, ZC-1487-B26 y ZC-1487-B28 en un ensayo que mide la competición de la unión de insulina biotinilada con insulina unida a placa.

Se realizó un ensayo de unión al receptor de insulina por competición de insulina, IGF-II, ZC710B20 y ZC1487B26 o ZC-1487-B28 con la unión de insulina biotinilada al receptor de insulina (insulina-R).

Específicamente, se recubrieron placas Reacti-Bind™ blancas con insulina-R a una concentración 1 ug/pocillo/100 ul (38,4 nM). Las placas recubiertas se incubaron durante una noche a temperatura ambiente, después se lavaron 3X con tampón de lavado (300 ul/pocillo). Las placas después se bloquearon con tampón de bloqueo (300 ul/pocillo) durante 1 hora. Las etapas de lavado se repitieron y se extrajo cualquier resto de solución en las placas.

La insulina biotinilada se mezcló a 20 nM con diferentes concentraciones de insulina, IGF-II, ZC701B20, B26 y B28 por diluciones en serie (las concentraciones finales se muestran en la tabla 2). Se añadieron 100 ul de insulina diluida, IGF-II, ZC710B20, ZC1487B26, y ZC1487B28 en insulina-biotina 20 nM en las placas recubiertas y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas después se lavaron 3 con tampón de lavado. Se añadieron 100 ul de solución de trabajo de estreptavidina-HRP (50 ul de estreptavidina-HRP en 10 ml de tampón de bloqueo) a las placas y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 ul de solución de trabajo Elisa-Pico que contenía sustrato quimioluminiscente Elisa-Pico y se midió la quimioluminiscencia a 425 nm. Los resultados ejemplares se muestran en la tabla 2, figura 8 y figura 9. Ambos lotes de ZC-1487 no fueron tan eficaces como inhibidores en comparación con ZC-701 o el control de insulina. Como puede observarse a partir de la tabla 2 y la figura 8, el péptido resistente a furina ZC-1487B26 se une al receptor de insulina con una avidez más de 10 veces inferior que ZC-701 y más de 20 veces menor que IGF-II de tipo silvestre.

Esto indica que la proteína 1487 tenía una afinidad reducida por el receptor de insulina en comparación con la mara GILT en ZC-701.

Tabla 2. Actividad de unión al receptor de insulina - intensidad de quimioluminiscencia

Insulina (nM)												
Insulina-B (nM)	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,90625	1,95313	0
20 nM	38,00	43,00	66,00	102,00	243,00	479,00	750,00	780,00	503	1175	1046	2180
20 nM	13,00	25,00	57,00	141,00	229,00	517,00	517,00	885,00	1003	1344	1462	1694
promedio	25,5	34,0	61,5	121,5	236,0	498,0	633,5	832,5	753,0	1259,5	1254,0	1937,0
IFG-II (nM)												
Insulina-B (nM)	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,90625	1,95313	0
20 nM	70,00	268,00	356,00	644,00	828,00	991,00	1189,00	1492,00	1478	1478	1410	1874
20 nM	140,00	176,00	379,00	566,00	919,00	1224,00	1447,00	1377,00	1483	1370	1249	1959
promedio	105,0	222,0	367,5	605,0	873,5	1107,5	1318,0	1434,5	1480,5	1424,0	1329,5	1916,5
ZC701B20 (nM)												
Insulina-B (nM)	4000	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,90625	0
20 nM	191,00	387,00	526,00	715,00	800,00	1284,00	1116,00	1248,00	1474	1241	1450	1790
20 nM	250,00	329,00	483,00	774,00	767,00	1071,00	1024,00	968,00	1471	1118	1234	1886
promedio	220,5	358,0	504,5	744,5	783,5	1177,5	1070,0	1108,0	1472,5	1179,5	1342,0	1838,0
ZC1487B26 (nM)												
Insulina-B (nM)	4000	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,90625	0
20 nM	967,00	1190,00	1334,00	1210,00	1294,00	1462,00	1402,00	1281,00	1323	1612	1173	1952
20 nM	962,00	1189,00	1395,00	1379,00	1612,00	1396,00	1221,00	1013,00	1326	1182	1102	2069
promedio	964,5	1189,5	1364,5	1294,5	1453,0	1429,0	1311,5	1147,0	1324,5	1397,0	1137,5	2010,5

ZC1487B26 (nM)												
Insulina-B (nM)	4000	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,625	7,8125	3,90625	0
	2000 (4000)	1000 (2000)	500 (1000)	250 (500)	125 (250)	62,5 (125)	31,25 (62,5)	5,625 (31,25)	7,8125 (15,625)	3,90625 (7,8125)	1,95313 (3,90625)	0

Ejemplo 5. Ensayos de captación

Algunos mutantes se ensayaron para la retención de la actividad de captación. Se transfectaron células HEK293 con las construcciones 1479 (R37K), 1487 (R37A) o ZC-701. Después de la recolección, los sobrenadantes de cultivo se purificaron parcialmente por cromatografía HIC. Todas las muestras se trataron con PNGasa antes de la electroforesis.

La figura 10 muestra las preparaciones parcialmente purificadas de las proteínas de fusión marcadas que contenían una marca de muteína IGF-II resistente a furina analizada por SDS-PAGE e inmunotransferencia. Como puede observarse, la proteína de fusión codificada por la construcción 1487 que contiene la mutación R37A es resistente a furina exógena.

La figura 11 ilustra los resultados ejemplares de captación de GAA marcada con GILT resistente a furina en mioblastos L6 de rata. Como se muestra en la figura 11, la $K_{\text{captación}}$ ejemplar para las proteínas 1479, 1487, ZC-701, y ZC-701 purificado son 4,5 nM, 4,4 nM, 5,0 nM y 2,6 nM, respectivamente, que indica que las proteínas codificadas por las construcciones 1487 (R37A) y 1479 (R37K) retienen la capacidad de captación eficaz en mioblastos L6 de rata. La captación eficaz de las proteínas de fusión que contienen una marca GILT resistente a furina también indica que la mara GILT resistente a furina retiene alta afinidad por el CI-MPR.

Equivalentes

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de averiguar, usando no más de la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en este documento. El alcance de la presente invención no pretende estar limitado por la descripción anterior, sino en su lugar está expuesto en las reivindicaciones adjuntas. Los artículos "uno", "una", y "el", "la", como se usan en este documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, salvo que se indique claramente lo contrario, deben entenderse incluyendo los referentes plurales. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechos si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en o relevantes de otro modo para un producto o proceso dado salvo que se indique lo contrario o sea evidente de otra forma a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en que exactamente un miembro del grupo está presente en, empleado en o relevante de otro modo para un producto o proceso dado. La invención también incluye realizaciones en que más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en o relevantes de otro modo para un producto o proceso dado. Además, tiene que entenderse que la invención abarca variaciones, combinaciones y permutaciones en que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones se introduce en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base (o, según lo relevante, cualquier otra reivindicación) salvo que se indique de otro modo o salvo que fuera evidente para un experto en la materia que pudiera surgir una contradicción o inconsistencia. Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en grupo de Markush o formato similar, tiene que entenderse que cada subgrupo de los elementos está también descrito, y cualquier elemento o elementos pueden retirarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención o aspectos de la invención se mencionan como comprendiendo elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten o consisten esencialmente en dichos elementos, características, etc. Con fines de simplicidad, esas realizaciones no se han expuesto específicamente en cada caso en este documento. También debe entenderse que cualquier realización de la invención, por ejemplo, cualquier realización encontrada dentro de la técnica anterior, puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica está indicada en la memoria descriptiva.

También debe entenderse que, salvo que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en este documento que incluya más de un acto, el orden de los actos del método no está necesariamente limitado al orden en que se indican los actos del método, pero la invención incluye realizaciones en que el orden está así limitado. Además, cuando las reivindicaciones indican una composición, la invención abarca métodos de uso de la composición y métodos de preparación de la composición. Cuando las reivindicaciones indican una composición, debe entenderse que la invención abarca métodos de uso de la composición y métodos de preparación de la composición.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión terapéutica dirigida que comprende:

5 una enzima lisosómica; y
una muteína IGF-II que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humano maduro (SEQ ID NO: 1) y que comprende una mutación dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 de la SEQ ID NO: 1 de modo que la mutación anula al menos un sitio de escisión con proteasa furina,

10 en la que la muteína IGF-II (a) se une al receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes de una manera independiente de manosa-6-fosfato; (b) es resistente a escisión por furina; y (c) tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de insulina respecto a la afinidad del IGF-II humano de origen natural por el receptor de insulina.

15 2. La proteína de fusión terapéutica dirigida de la reivindicación 1, en la que la muteína IGF-II comprende una delección de los aminoácidos 30-40 de la SEQ ID NO: 1.

3. La proteína de fusión terapéutica dirigida de la reivindicación 1, en la que la mutación es una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a Arg37 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente en la que la sustitución de aminoácido es una sustitución de Lys o Ala.

4. La proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la enzima lisosómica se selecciona de: α 1,4-glucosidasa ácida; β -galactosidasa; β -hexosaminidasa A; β -hexosaminidasa B; α -galactosidasa A; glucocerebrosidasa; arilsulfatasa A; galactosilceramidasa; esfingomielinasa ácida; ceramidasa ácida; lipasa ácida; α -L-iduronidasa; iduronato sulfatasa; heparán N-sulfatasa; α -N-acetilglucosaminidasa; acetil-CoA-glucosaminido acetiltransferasa; N-acetilglucosamina-6-sulfatasa; galactosamina-6-sulfatasa; β -galactosidasa; arilsulfatasa B; β -glucuronidasa; α -manosidasa; β -manosidasa; α -L-fucosidasa; N-aspartil- β -glucosaminidasa; α -neuraminidasa; proteína protectora lisosómica; α -N-acetil-galactosaminidasa; N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa; y palmitoil-proteína tioesterasa.

5. La proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la muteína IGF-II comprende:

(a) una delección o un remplazo de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 2-7 de la SEQ ID NO: 1; y/o
(b) una delección o un remplazo de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 1-7 de la SEQ ID NO: 1; y/o
(c) una delección o un remplazo de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 62-67 de la SEQ ID NO: 1; y/o
(d) una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a Tyr27, Leu43 o Ser26 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en Tyr27Leu, Leu43Val, Ser26Phe y combinaciones de las mismas; y/o
(e) aminoácidos correspondientes a las posiciones 48-55 de la SEQ ID NO: 1; y/o
(f) al menos tres aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos correspondientes a las posiciones 8, 48, 49, 50, 54 y 55 de la SEQ ID NO: 1; y/o
(g) en las posiciones correspondientes a las posiciones 54 y 55 de la SEQ ID NO: 1, estando cada uno de dichos aminoácidos sin carga o con carga negativa a pH 7,4.

6. La proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la muteína IGF-II tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de IGF-I respecto a la afinidad de IGF-II humano de origen natural por el receptor de IGF-I.

7. La proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la enzima lisosómica es alfa-glucosidasa ácida (GAA) humana o una variante funcional de la misma, opcionalmente en la que la enzima lisosómica comprende los aminoácidos 70-952 de GAA humana.

8. La proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proteína de fusión terapéutica dirigida comprende adicionalmente un espaciador entre la enzima lisosómica y la muteína IGF-II, opcionalmente en la que el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos Gly-Ala-Pro.

9. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

10. Una célula que contiene el ácido nucleico de la reivindicación 9.

11. Una composición farmacéutica adecuada para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico, que comprende una proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

5 12. La proteína de fusión terapéutica dirigida de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

10 13. La proteína de fusión terapéutica dirigida para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la enfermedad de almacenamiento lisosómico se selecciona de: enfermedad de Pompe; enfermedad de Wolman; y Sanfilippo B (MPS IIIB).

14. Un método de producción de una proteína de fusión terapéutica dirigida, que comprende una etapa de: cultivo de células de mamífero en un medio de cultivo celular, en el que las células de mamífero portan el ácido nucleico de la reivindicación 9; y el cultivo se realiza en condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión terapéutica dirigida.

15 15. Un método de producción de una proteína de fusión terapéutica dirigida de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una etapa de: cultivo de células deficientes de furina en un medio de cultivo celular, en el que las células deficientes de furina portan un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de las reivindicaciones 1 a 8 y en el que el cultivo se realiza en condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión terapéutica dirigida.

20

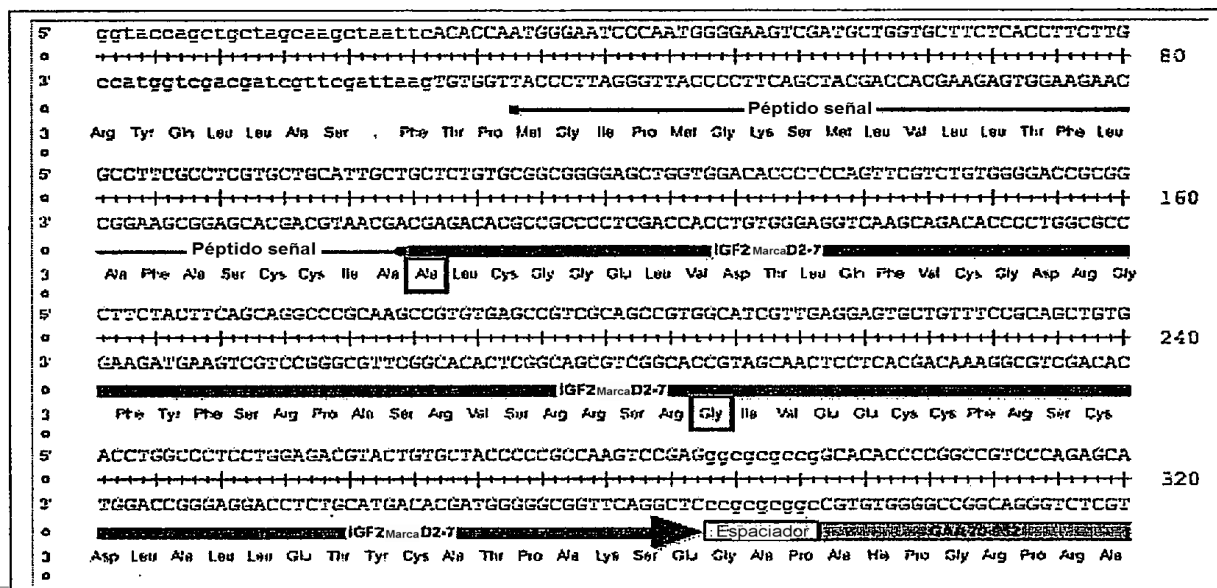


Figura 1. Mapa del extremo N-terminal de ZC-701. Los dos restos de aminoácido en recuadro en rojo son sitios de eventos de escisión. El primero es el sitio de escisión del péptido señal, el segundo es el sitio de una escisión con furina.

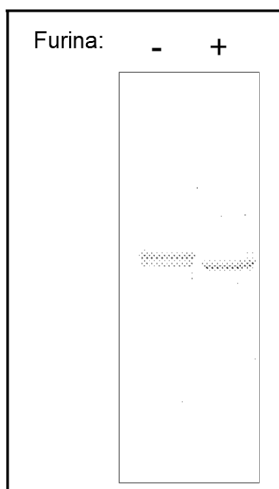


Figura 2. SDS-PAGE de ZC-701 después del tratamiento con PNGasa F. El carril en la derecha se ha tratado adicionalmente con furina.

FIGURA 2

Secuencia de reconocimiento de furina = R X X R

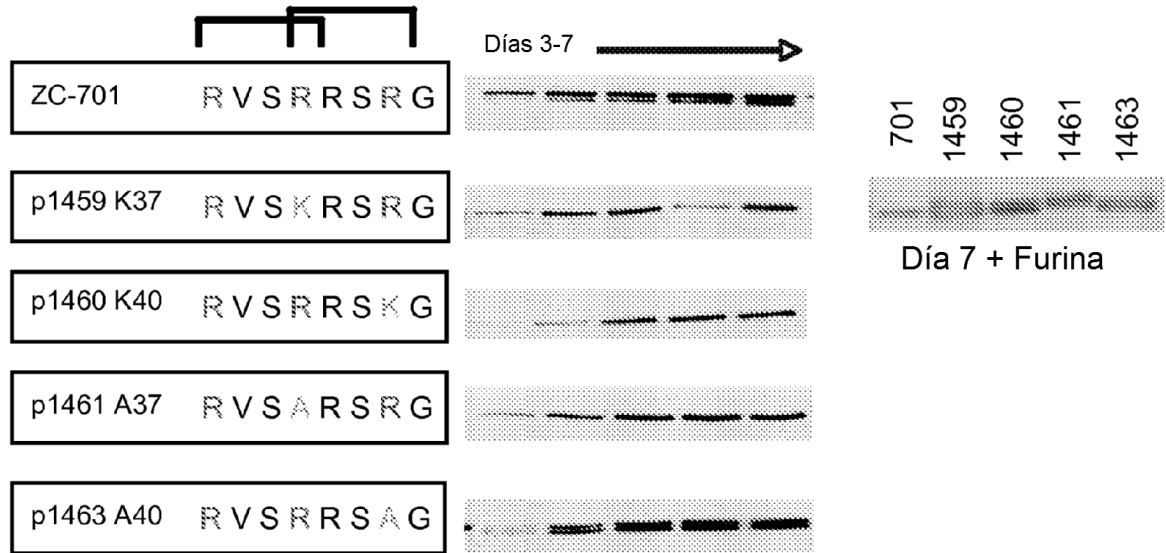
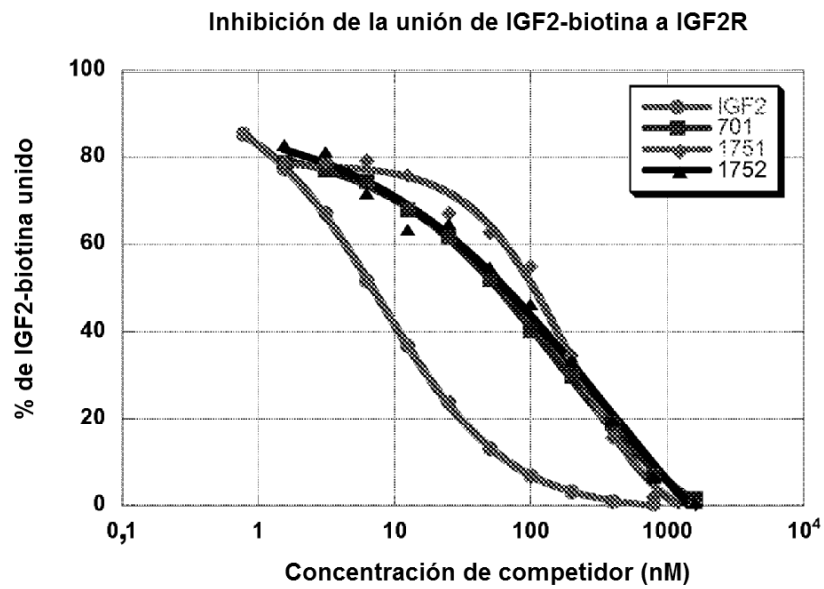
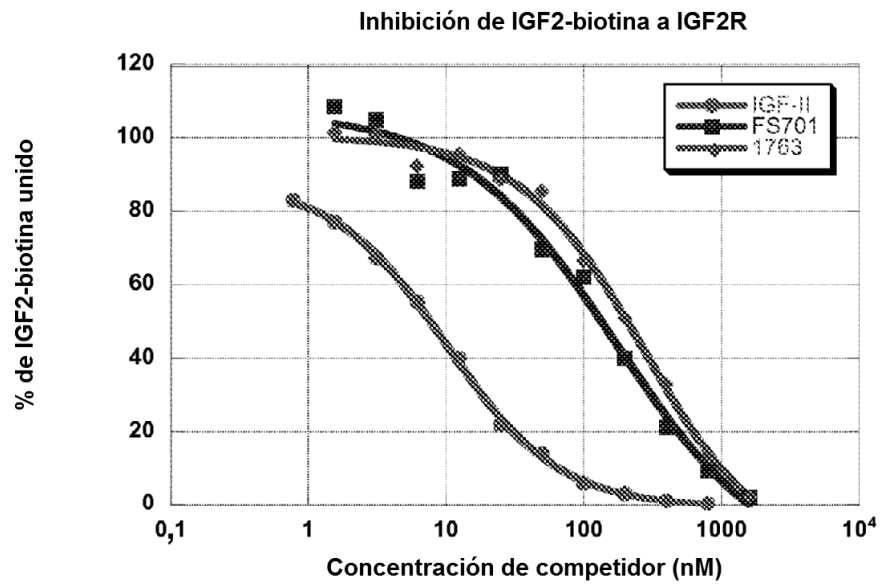


Figura 3. Izquierda. Esquema de mutantes ZC-701 en que el sitio de escisión con furina está modificado. Centro. Análisis de SDS-PAGE de mutantes tratados con PNGase después de 3-7 días de cultivo celular. Derecha. Análisis de SDS-PAGE de mutantes tratados con PNGase tratados con furina.



Competidor	IGF2	ZC-701	1751	1752
CI ₅₀	6,9	57,7	106,0	65,3

FIGURA 4



Competidor	IGF2	ZC-701	1763
CI ₅₀	7,7	135,4	207,9

FIGURA 5

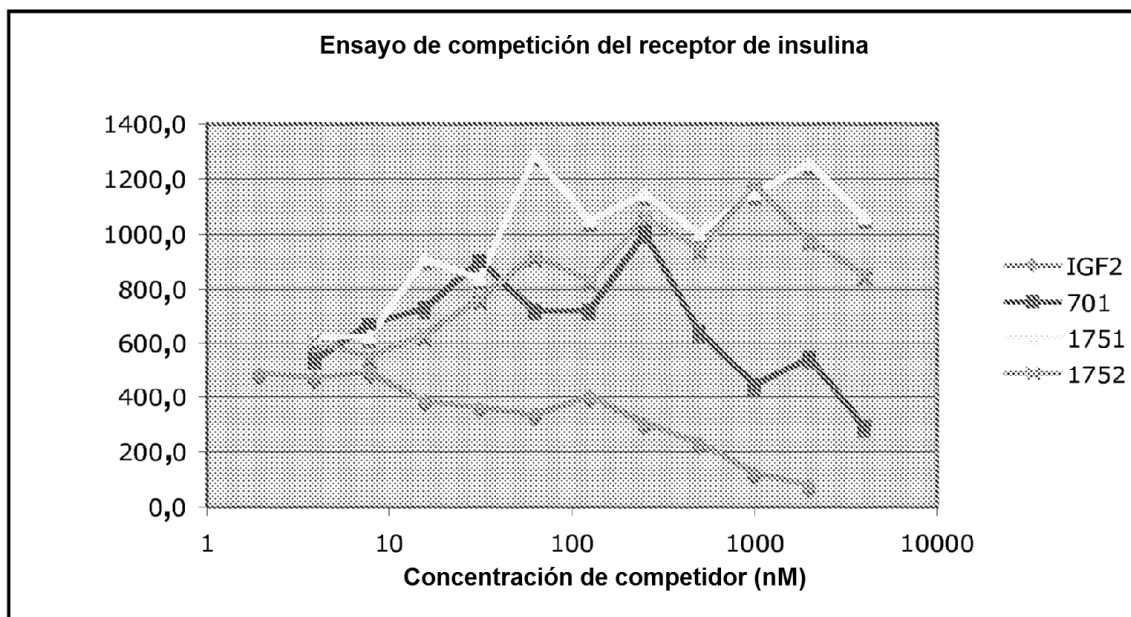


FIGURA 6

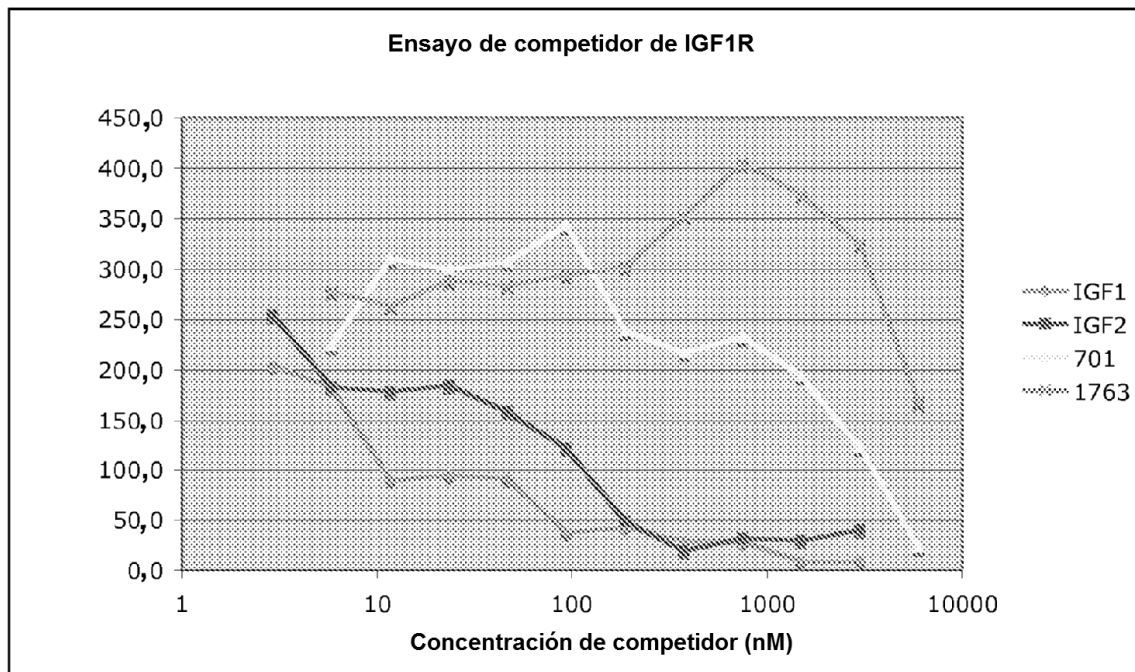


FIGURA 7

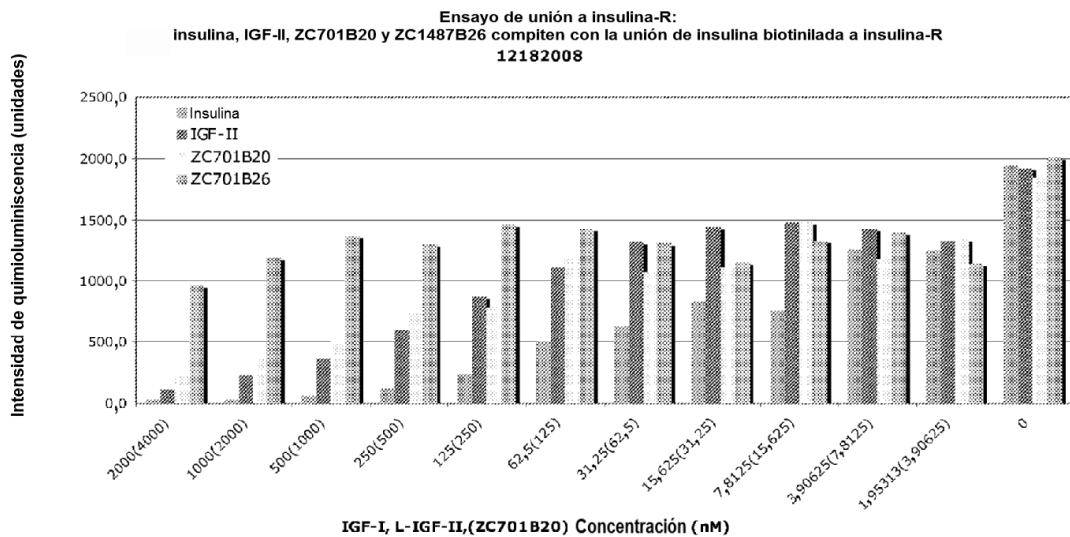
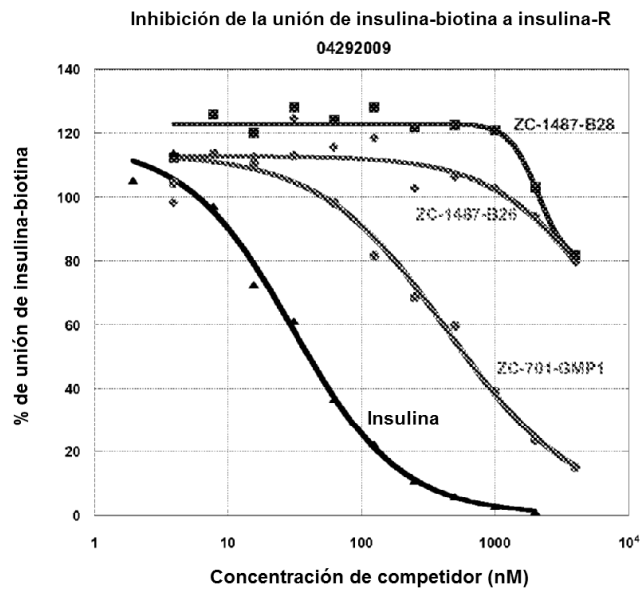


FIGURA 8



	Insulina	ZC-1487-B26	ZC-1487-B28	ZC-701-GMP1
CI ₅₀	40,5	N/A	N/A	607

FIGURA 9

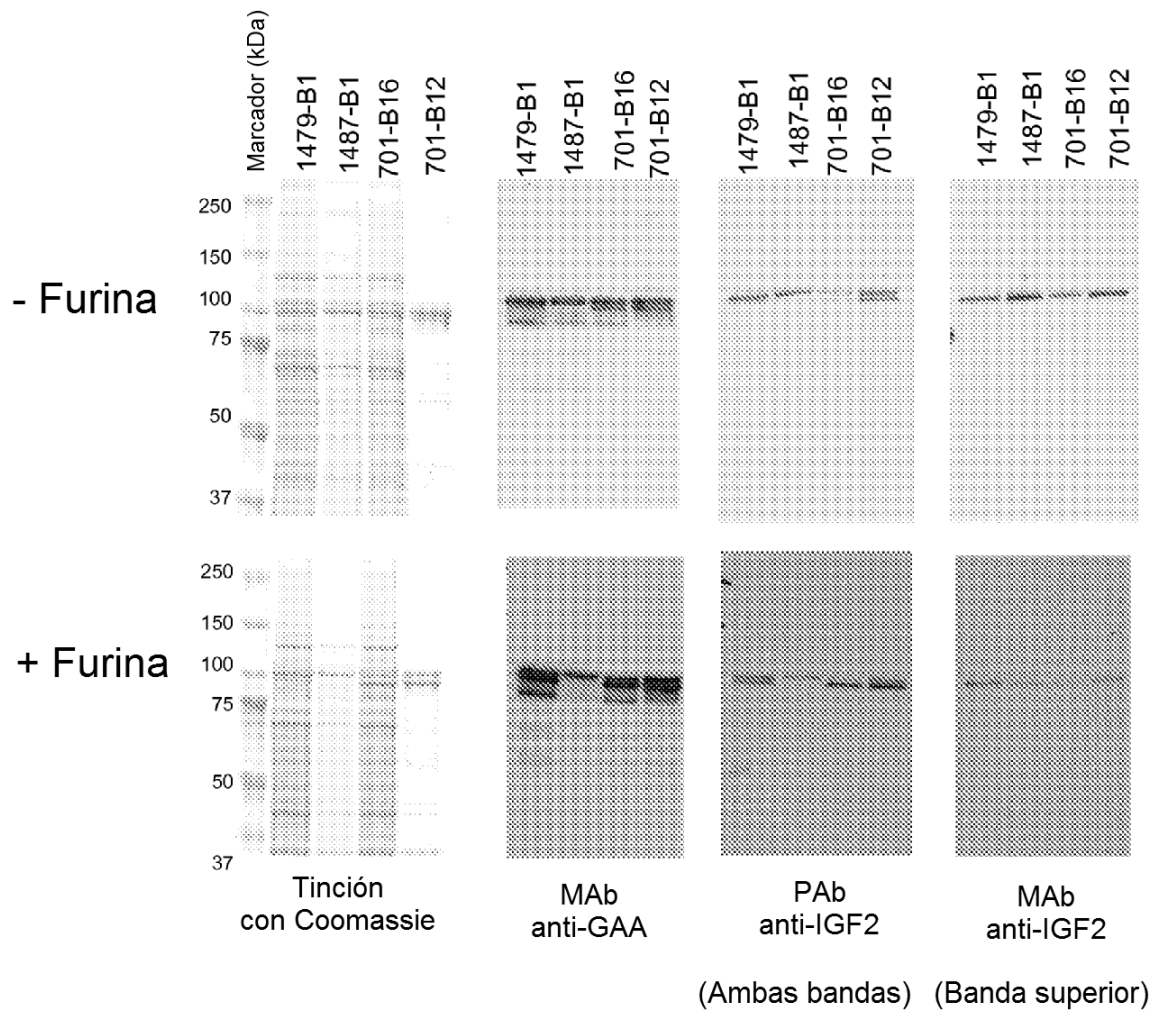


FIGURA 10

FIGURA 11

