

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 468**

51 Int. Cl.:

C12N 9/90

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/028045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14143884**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14729502 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2968602**

54 Título: **Transgén sintético de la metilmalonil-CoA mutasa para el tratamiento de la acidemia metilmalónica (MMA) de clase MUT**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361792081 P

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

29.11.2017

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)**

**6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, MD 20852, US**

72 Inventor/es:

**VENDITTI, CHARLES P. y
CHANDLER, RANDY J.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 644 468 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

Transgén sintético de la metilmalonil-CoA mutasa para el tratamiento de la acidemia metilmalónica (MMA) de clase MUT

5

Campo de la invención

La invención objeto se refiere a la modificación del gen de la metilmalonil-CoA mutasa humana de manera que se aumente su expresión en células eucariotas. En comparación con el gen *MUT* humano natural, las secuencias genéticas sintéticas objeto (*synMUT*) tienen codones optimizados para aumentar la expresión al administrarse.

10

Antecedentes

La acidemia metilmalónica (MMA) es un trastorno autosómico recesivo producido por defectos en la enzima metilmalonil-CoA mutasa (MUT) localizada en las mitocondrias (Manoli, et al. 2010 Methylmalonic Acidemia (en Gene Reviews, eds. Pagon, et al.)). La incidencia de MMA estimada es de 1 por cada 25.000-48.000. La MUT es una enzima que cataliza la conversión de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA. Esta reacción es una de varias reacciones enzimáticas necesarias para metabolizar aminoácidos de cadena ramificada, ácidos grasos de cadena impar, y propionato producidos por la flora intestinal (Chandler, et al. 2005 Mol Genet Metab 86:34-43). La deficiencia de MUT, la causa más común de MMA, se caracteriza por la acumulación de ácido metilmalónico y otros metabolitos relacionados con la enfermedad. La enfermedad se maneja con dieta de restricción de precursores y cofactores de aminoácidos pero carece de una terapia definitiva. La MMA puede dar lugar a una inestabilidad metabólica, convulsiones, ictus, y fallo renal, y puede ser letal incluso aunque los pacientes se hayan manejado apropiadamente, enfatizando la necesidad de nuevas terapias para esta enfermedad. Incluso aunque la MMA es rara, todos los bebés nacidos en los EE. UU. se exploran para esta afección de recién nacidos, enfatizando la necesidad de desarrollar terapias mejores.

15

20

25

Sumario

Como se ha expuesto anteriormente, los únicos tratamientos para MMA disponibles actualmente son las dietas de restricción. Los pacientes siguen siendo inestables metabólicamente mientras siguen con dieta de restricción y experimentan una progresión de la enfermedad, a pesar de la terapia médica. Estos episodios dan como resultado numerosas hospitalizaciones y pueden ser fatales. El transgén sintético de la metilmalonil-CoA mutasa humana (*synMUT*) se puede utilizar como un fármaco mediante el suministro genético mediado vírica o no víricamente, para restaurar la función de MUT en los pacientes de MMA, evitar la inestabilidad metabólica, y mejorar la progresión de la enfermedad. Debido a que esta enzima también puede ser importante en otros trastornos de oxidación de aminoácidos de cadena ramificada, el suministro genético del gen *MUT* sintético se podría utilizar para tratar afecciones distintas de la MMA por MUT.

35

Adicionalmente, el transgén *synMUT* se puede utilizar para la producción *in vitro* de MUT para su uso en terapia de reposición enzimática para la MMA. La terapia de reposición enzimática se consigue mediante la administración de la proteína *MUT* sintética por vía oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, o mediante otras vías de suministro terapéutico.

40

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se dirige a un polinucleótido sintético (*synMUT*) de metilmalonil-CoA mutasa (*MUT*) que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

45

a) un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1;

b) un polinucleótido que tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1;

50

c) un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico con al menos aproximadamente el 80 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1;

d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en el que el polinucleótido no tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3; y

55

e) un polinucleótido que codifica un fragmento activo de la proteína metilmalonil-CoA mutasa (*MUT*), en el que el polinucleótido en su totalidad no comparte el 100 % de identidad con una parte de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3.

En una realización, el fragmento incluye solo los restos de aminoácidos 33-750, que se codifican entre los nucleótidos 63-2250 en el *synMUT*, y que representa la forma activa, procesada de *MUT*.

60

Por activo se quiere decir, por ejemplo, la capacidad de la enzima para catalizar la isomerización de la metilmalonil-CoA a succinil-CoA. La actividad se puede ensayar utilizando métodos bien conocidos en la técnica (como se describe en el contexto de la función proteína posteriormente).

65

En una realización de un polinucleótido sintético de acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico codifica

un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente el 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

5 En otra realización, el polinucleótido sintético presenta una expresión aumentada con respecto a la expresión de la secuencia de polinucleótido de metilmalonil-CoA mutasa humana (SEQ ID NO: 3) en un sujeto. En otra realización más, el polinucleótido sintético que tiene una expresión aumentada comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende codones que se han optimizado con respecto a la secuencia de polinucleótidos de la metilmalonil-CoA mutasa humana de origen natural (SEQ ID NO: 3). En otra realización más de un polinucleótido sintético de acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico tiene al menos aproximadamente un 80 % de los codones que se utilizan menos comúnmente reemplazados con codones que se utilizan más comúnmente.

15 En una realización de un polinucleótido sintético de acuerdo con la invención, el polinucleótido es un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico con al menos aproximadamente un 85 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el polinucleótido es un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico con al menos aproximadamente un 90 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. En otra realización más, el polinucleótido es un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico con al menos aproximadamente un 95 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.

20 En una realización de un polinucleótido sintético de acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ADN. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ARN o una secuencia de ácido nucleico modificada peptídica. En otra realización, el polinucleótido sintético de acuerdo con la invención codifica un fragmento de MUT activo, los aminoácidos 33-750 de synMUT, que se corresponden con los pares de bases 67-2250 de *synMUT*.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende el polinucleótido sintético descrito en el presente documento. En otra realización de un vector de acuerdo con la invención, el polinucleótido sintético está unido operativamente a una secuencia de control de la expresión. En otra realización más, el polinucleótido sintético tiene codones optimizados.

30 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad o afección mediada por la metilmalonil-CoA mutasa o bajos niveles de actividad metilmalonil-CoA mutasa, comprendiendo el método la administración a un sujeto el polinucleótido sintético descrito en el presente documento.

35 En un aspecto adicional más la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad o afección mediada por metilmalonil-CoA mutasa, comprendiendo el método la administración a un sujeto de una metilmalonil-CoA mutasa producida utilizando el polinucleótido sintético descrito en el presente documento. En otra realización de un método de tratamiento de acuerdo con la invención, la enfermedad o afección es la acidemia metilmalónica (MMA).

40 En un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende el polinucleótido sintético de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un animal transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de polinucleótido que codifica la metilmalonil-CoA mutasa o un fragmento funcional de la misma. En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para producir dicho animal transgénico, que comprende: proporcionar un vector de expresión exógeno que comprende un polinucleótido que comprende un promotor unido operativamente a un polinucleótido que codifica la metilmalonil-CoA mutasa o un fragmento funcional de la misma; introducir el vector en un ovocito fertilizado; y trasplantar el ovocito en un animal hembra.

50 En un aspecto, la invención se refiere a un animal transgénico cuyo genoma comprende el polinucleótido sintético descrito en el presente documento. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir dicho animal transgénico, que comprende: proporcionar un vector de expresión exógeno que comprende un polinucleótido que comprende un promotor unido operativamente al polinucleótido sintético descrito en el presente documento; introducir el vector en un ovocito fertilizado; y trasplantar el ovocito en un animal hembra.

55 Los métodos para producir animales transgénicos se conocen en la técnica e incluyen, sin limitación, transformar células madre embrionarias en un cultivo tisular, inyectar el transgén en el pronúcleo de un huevo fertilizado de un animal (microinyección de ADN), modificación genética/genómica, suministro vírico (por ejemplo, transferencia genética mediada por retrovirus).

60 Los animales transgénicos de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, roedores (ratón, rata, ardilla, cobaya, hámster, castor, puercoespín), rana, hurón, conejo, pollo, cerdo, oveja, cabra, vaca, primates y similares.

65 En otro aspecto, la invención se refiere a la mejora preclínica o rescate del estado de enfermedad, por ejemplo, acidemia metilmalónica, que presenta el sujeto que la padece. Esto puede incluir síntomas, tales como letargia,

letalidad, acidosis metabólica, y perturbaciones bioquímicas, tal como niveles aumentados de ácido metilmalónico en la sangre, orina y fluidos corporales.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para producir un animal modificado genéticamente como fuente de *synMUT* recombinante. En otro aspecto, se puede llevar a cabo edición genómica, o edición genómica con nucleasas modificadas (GEEN) con los nucleótidos *synMUT* de la presente invención permitiendo que el ADN *synMUT* se inserte, sustituya, o retire de un genoma utilizando nucleasas modificadas artificialmente. Se puede utilizar cualquier nucleasa modificada conocida tal como nucleasas en dedos de Zinc (ZFN), Nucleasas efectoras tipo activador de la transcripción (TALEN), el sistema CRISPR/Cas, y meganucleasa modificada re-modificada en endonucleasa de asentamiento. De manera alternativa, se pueden utilizar los nucleótidos de la presente invención que incluyen *synMUT*, en combinación con un CASP/CRISPR, ZFN, o TALEN para modificar la corrección en el locus de las células del paciente sea *in vivo* o *ex vivo*, entonces, en una realización, se usa esas células corregidas, tal como un fibroblasto o linfoblasto, para crear un iPS u otra célula madre para su uso en terapia celular.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la lista de frecuencias de codón en el proteoma humano.

La Figura 2 ilustra un *synMUT* con codón optimizado (SEQ ID NO: 1) de la invención objeto.

La Figura 3 ilustra la secuencia de aminoácidos de MUT de Homo sapiens de origen natural (SEQ ID NO: 2) y el gen *MUT* de Homo sapiens de origen natural (SEQ ID NO: 3).

La Figura 4 ilustra un alineamiento de *MUT* (SEQ ID NO: 3) con la secuencia *synMUT* con codones optimizados objeto (SEQ ID NO: 1).

La Figura 5 ilustra las variantes exónicas que se ven en *MUT* que están presentes en *synMUT*. El número 1 presentado indica cambios que se ven en *MUT* en un análisis exoma que se encuentran en *synMUT*. El número 2 presentado en la figura indica variantes de *synMUT* únicas a una posición en la que existen variantes *MUT*.

La Figura 6 ilustra la expresión de la proteína MUT después de la transfección de células HEK-293 *in vitro* con proteína fluorescente verde (GFP), polinucleótido de metilmalonil-CoA mutasa humana optimizado (*synMUT*) (SEQ ID NO: 1), o el gen de la metilmalonil-CoA mutasa humana de origen natural (*MUT*) (SEQ ID NO: 3).

La Figura 7 presenta un mapa de la construcción AAV-HCR-hAAT-*synMUT*.

La Figura 8 ilustra el aumento de supervivencia de ratones *Mut^{f/-}* después del tratamiento con la construcción AAV8-HCR-hAAT-*synMUT*.

La Figura 9 ilustra la reducción de metabolitos circulantes en ratones *Mut^{f/-}* después del tratamiento con la construcción AAV8-HCR-hAAT-*synMUT*.

La Figura 10 muestra la expresión de MUT en el hígado después de la terapia genética con AAV8-HCR-hAAT-*synMUT*.

La Figura 11 muestra una incidencia de carcinoma hepatocelular después del suministro de AAV a ratones que eran *Mut^{f/+}* sin tratar (n = 51), tratados con 1-2 x 10¹¹ GC de AAV8-CBA-*MUT* (n = 13) o 1-2 x 10¹¹ GC de AAV8-hAAT-*synMUT* (n = 5) por inyección intrahepática en el nacimiento. * = P < 0,01, NS = no significativo estadísticamente a partir del grupo de control sin tratar.

40 Descripción detallada

Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones representativas de la invención. Aunque la invención se describirá en conjunción con las realizaciones enumeradas, se entenderá que la invención no tiene la intención de limitarse a esas realizaciones. Por el contrario, la invención intenta cubrir todas las alternativas, modificaciones, y equivalentes que se puedan incluir en el alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones.

Definiciones

A menos de que se defina otra cosa, los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento, tienen el mismo significado que es entendido normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la invención cualquiera de los métodos, dispositivos, y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, se describen a continuación los métodos, dispositivos, y materiales preferidos.

Como se utiliza en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de “uno”, “una” y “el” incluyen las referencias en plural, a menos de que el contenido dicte claramente otra cosa, y se utilizan de manera intercambiable con “al menos uno”, y “uno o más”. Por lo tanto, la referencia a “un polinucleótido” incluye una pluralidad de polinucleótidos o genes, y similares.

Como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente” representa una modificación o variación insignificante del valor numérico de manera que la función básica del artículo al que se refiere el valor numérico no cambia.

Como se utiliza en el presente documento, el término “comprende”, “que comprende”, “incluye”, “que incluye”, “contiene”, “que contiene”, y cualquier variación de los mismos, se tiene la intención de que cubran una inclusión no

excluyente, de manera que un procedimiento, método, producto-por-procedimiento, o composición de material que comprende, incluye, o contiene un elemento de la lista de elementos, no incluye solo esos elementos sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho procedimiento, método, producto-por-procedimiento, o composición de material.

5 En el contexto del *synMUT*, los términos “gen” y “transgén” se utilizan de manera intercambiable. Un “transgén” es un gen que se ha transferido de un organismo a otro.

10 El término “sujeto”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un animal domesticado, un animal de granja, un primate, un mamífero, por ejemplo un ser humano.

15 La frase “sustancialmente idéntico”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos que presenta una alta identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad) y mantiene la actividad biológica de interés (la actividad enzimática).

20 Las secuencias de polinucleótido codificantes *synMUT* permiten el aumento de expresión del gen *synMUT* con respecto a las secuencias *MUT* humanas de origen natural. Estas secuencias de polinucleótido se diseñan para no alterar la secuencia de aminoácidos *MUT* humana de origen natural. También se han modificado u optimizado para que tengan un aumento de la eficacia transcripcional, traduccional, y de repliegue proteico. Esta modificación se consigue utilizando tendencias de codones humanos, evaluando el contenido de GC, CpG y GpC negativos, optimizando la interacción entre el codón y anti-codón, y eliminando los sitios de corte y empalme críptico y los motivos de inestabilidad de ARN. Debido a que las secuencias son nuevas, facilitan la detección utilizando ensayos basados en ácidos nucleicos.

25 Como se utiliza en el presente documento “*MUT*” se refiere a una metilmalonil-Coenzima A mutasa humana, y “*Mut*” se refiere a la metilmalonil-Coenzima A mutasa de ratón. Esta proteína cataliza la isomerización de metilmalonil-CoA a succinil-CoA. Este proceso necesita 5'-desoxiadenosilcobalamina, un derivado de la vitamina B12. La succinil-CoA es un componente del ciclo del ácido cítrico o ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). Se hace referencia al gen que codifica la metilmalonil-CoA mutasa humana de origen natural como *MUT*. El polinucleótido que codifica la *MUT* sintética se conoce como *synMUT*.

30 Se hace referencia al *MUT* humano de origen natural como *MUT*, mientras que el *MUT* sintético se denomina *synMUT*, incluso aunque los dos son idénticos a nivel de aminoácidos.

35 “Optimización de codón” se refiere al procedimiento de alteración de una secuencia de polinucleótido de origen natural para aumentar la expresión en un organismo diana, por ejemplo, seres humanos. En la solicitud objeto, el gen *MUT* humano se ha alterado para sustituir codones que se encuentran menos frecuentemente en genes humanos por los que se encuentran más frecuentemente y/o por codones que se encuentran frecuentemente en genes humanos que se expresan de manera alta.

40 Como se utiliza en el presente documento, “determinar”, “determinación”, “detectar”, o similares se utilizan de manera intercambiable en el presente documento y se refiere a la detección o cuantificación (medición) de una molécula utilizando un método adecuado, que incluye inmunohistoquímica, fluorescencia, quimiofluorescencia, marcado radioactivo, resonancia de plasmones de superficie, ondas acústicas de superficie, espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja, espectroscopia Raman, microscopía de fuerza atómica, microscopía de barrido de efecto túnel, métodos de detección electroquímica, resonancia magnética nuclear, puntos cuánticos, y similares. “Detectar” y sus variaciones se refiere a la identificación u observación de la presencia de una molécula en una muestra biológica, y/o la medición del valor de la molécula.

45 Como se utiliza en el presente documento, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de absorción retardada, y similares que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de entre agua, solución salina, solución salina tampón de fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición.

50 Una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesaria para conseguir el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector que comprende el polinucleótido sintético de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo y la capacidad del vector para dar lugar a una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es en la que cualquiera de los efectos perjudiciales o tóxicos del vector están superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Normalmente, como la dosis profiláctica se utiliza en sujetos antes o

en un estado más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

5 Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar una única embolada, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en formas de dosificación unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades separadas físicamente adecuadas como
10 dosificaciones unitarias para sujetos mamíferos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del polinucleótido sintético o un fragmento del mismo de acuerdo con la invención calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con un vehículo farmacéutico.

15 *Realizaciones adicionales de la invención*

El polinucleótido sintético

En una realización de la invención, se empleó la optimización de codones para crear un alelo *MUT* sintético y altamente activo. Este método implica la determinación de la frecuencia relativa de un codón en los genes codificantes de proteínas en el genoma humano. Por ejemplo, la isoleucina se puede codificar por AUU, AUC o AUA, pero en el genoma humano el AUC (47 %), AUU (36 %), y AUA (17 %) se utilizan variablemente para codificar la isoleucina en las proteínas. Por lo tanto, en el contexto de la secuencia apropiada, se cambiaría AUA por AUC para permitir que este codón sea traducido más eficazmente en células humanas. La Figura 1 presenta las estadísticas de uso del codón para una gran parte de los genes humanos codificantes de proteínas y sirve como base para el
20 cambio de codones a lo largo del ADNc *MUT*.

Por lo tanto, la invención comprende polinucleótidos sintéticos que codifican la metilmalonil-CoA mutasa (*MUT*) que se selecciona de entre el grupo que consiste en la secuencia de ácido nucleico de la Figura 2 (SEQ ID NO: 1) y una secuencia de polinucleótido que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad con la misma. Para los
30 polinucleótidos que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad con SEQ ID NO: 1, en algunas realizaciones, tienen al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad.

En una realización, el polinucleótido sintético objeto codifica un polipéptido con el 100 % de identidad con la proteína *MUT* humana de origen natural, de manera alternativa incluye alelos de origen natural (Figura 3). El alineamiento por BLAST de *MUT* (NM_000255.3) con *synMUT* revela 1721/2253 (un 76 %) identidades (Figura 4); existen presentes 532 bases en *synMUT* y no en *MUT* (NM_000255.3) (Figura 4). Para validar adicionalmente que la secuencia de *synMUT* seleccionada era suficientemente única, se analizaron 8600 exones depositados en el servidor de variantes NHLBI exoma (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) utilizando el BLAST especializado en alineamiento del NCBI para
40 comparar las dos secuencias. Unos 67 cambios en el nucleótido de origen natural en la secuencia codificante *MUT* daban como resultado alelos sinónimos, variantes sin sentido, y mutaciones sin sentido (Tabla 1). En nueve de estas 67 localizaciones variantes, (*synMUT*) poseía nucleótidos únicos que no estaban presentes en la base de datos exoma (Figura 5). Por lo tanto el (*synMUT*) codifica 58 variantes, presentes con una frecuencia variable (Tabla 1), identificadas en la base de datos exoma, y 474 pares de bases únicas, no presentes en los 8600 exomas humanos comparados con *MUT* (NM_000255.3).
45

Tabla 1. Variantes en *syn-MUT* no observadas en la base de datos Exoma

Posición de variante	Bases de cadena no codificante de los alelos	Alelo presente en la cadena codificante <i>syn-MUT</i>	Todos los alelos n°	MAF (%)	Función GVS	Aminoácidos	Pos. proteica.	Pos en ADNC
<u>6:49427127</u>	C/T	A	C=1/T= 13005	0,0116/0,00,0077	sin sentido	ARG.GLN	18/751	53
<u>6:49427030</u>	G/C	G	G=1/C=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	HIS.GLN	50/751	150
<u>6:49426975</u>	C/T	A	C=39/T=1296 7	0,3837/0,1362/0,2999	sin sentido	VAL.ILE	69/751	205
<u>6:49426939</u>	G/A	C	G=1/A= 13005	0,0116/0,00,0077	Sinónimo codificante	ninguno	81/751	241
<u>6:49426895</u>	C/T	T	C=3/T= 13003	0,0/0,0681/0,0231	Sinónimo codificante	ninguno	95/751	285
<u>6:49426896</u>	A/G		A=3/G=13003	0,0/0,0681/0,0231	sin sentido	LEU.PRO	95/751	284
<u>6:49426853</u>	T/C	G	T=1/C=13005	0,0116/0,00,0077	Sinónimo codificante	ninguno	109/751	327
<u>6:49426814</u>	C/G	T	C=1/G=13005	0,0116/0,00,0077	sin sentido	LEU.PHE	122/751	366
<u>6:49425764</u>	T/C	G	T=15/C=1298 9	0,0/0,3404/0,1153	Sinónimo codificante	ninguno	131/751	393
<u>6:49425601</u>	C/T	A	C=1/T= 13005	0,0116/0,00,0077	sin sentido	VAL.MET	186/751	556
<u>6:49425591</u>	C/T	A	C=3/T= 13003	0,0/0,0681/0,0231	sin sentido	SER.ASN	189/751	566
<u>6:49425537</u>	A/C	G	A=1/C=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	VAL.GLY	207/751	620
<u>6:49425521</u>	T/C	A	T=7823/C=51 81	38,3578/42,7372/39,8416	Sinónimo codificante	ninguno	212/751	636
<u>6:49425446</u>	C/T	A	C=138/T=128 54	1,3388/0,5225/1,06 22	Sinónimo codificante	ninguno	237/751	711
<u>6:49425436</u>	C/T	A	C=1/T= 12995	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	VAL.ILE	241/751	721
<u>6:49423948</u>	A/G	C	A=1/G=13003	0,0116/0,00,0077	Sinónimo codificante	ninguno	252/751	756
<u>6:49423923</u>	C/T	A	C=1/T= 13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	VAL.ILE	261/751	781
<u>6:49423868</u>	C/T	A	C=12/T=1299 4	0,0/0,2724/0,0923	sin sentido	CYS.TYR	279/751	836
<u>6:49423826</u>	C/T	A	C=13/T=1299 3	0,1395/0,0227/0,1	sin sentido	ARG.GLN	293/751	878

<u>6.49421373</u>	T/C	G	T=2/C=13004	0,0/0,0454/0,0154	sin sentido	ILE.MET	336/751	1008
<u>6.49421345</u>	T/G	C	T=1/G=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	ILE.LEU	346/751	1036
<u>6.49419403</u>	G/T	A	G=1/T= 13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	PRO.THR	370/751	1108
<u>6.49419396</u>	G/A	T	G=6/A= 13000	0,0698/0,0/0,0461	sin sentido	THR.ILE	372/751	1115
<u>6.49419386</u>	T/C	G	T=22/C=12984	0,2442/0,0227/0,16 92	sin sentido	ILE.MET	375/751	1125
<u>6.49419305</u>	C/A	T	C=1/A=13005	0,0/0,0227/0,0077	Sinónimo codificante	ninguno	402/751	1206
<u>6.49419241</u>	A/G	C	A=1/G=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	SER.PRO	424/751	1272
<u>6.49419214</u>	G/A	T	G=1/A= 13005	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido	ARG.CYS	433/751	1297
<u>6.49419206</u>	A/T	A	A=1/T=13005	0,0116/0,0/0,0077	Sinónimo codificante	ninguno	435/751	1305
<u>6.49416573</u>	T/C	G	T=1/C=13005	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido	GLN.ARG	467/751	1400
<u>6.49416571</u>	C/T	A	C=1/T= 13005	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido	VAL.ILE	468/751	1402
<u>6.49416556</u>	A/C	G	A=2/C=13004	0,0233/0,0/0,0154	sin sentido	SER.ALA	473/751	1417
<u>6.49416552</u>	T/C	G	T=1/C=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	GLN.ARG	474/751	1421
<u>6.49415450</u>	C/T	A	C=1/T= 12997	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido	GLY.ASP	498/751	1493
<u>6.49415448</u>	T/C	G	T=1343/C=11 655	10,5655/9,8774/10,3324	sin sentido	THR.ALA	499/751	1495
<u>6.49415432</u>	C/G	C	C=1/G=12999	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	GLY.ALA	504/751	1511
<u>6.49415384</u>	G/T	A	G=1/T=12997	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido- cerca de un corde	THR.LYS	520/751	1559
<u>6.49412463</u>	C/T	A	C=1/T= 13005	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido	ARG.LYS	522/751	1566
<u>6.49412458</u>	C/T	T	C=1/T= 13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	GLY.SER	524/751	1570
<u>6.49412433</u>	T/C	G	T=4077/C=89 29	36,6047/21,0849/31 ,3471	sin sentido	HIS.ARG	532/751	1595

<u>6:49412430</u>	T/C	G	T=1/C=13005	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido	TYR.CYS	533/751	1598
<u>6:49412421</u>	A/G	C	A=1/G=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	VAL.ALA	536/751	1607
<u>6:49412399</u>	A/G	C	A=56/C=1295 0	0,6047/0,0908/0,4306	Sinónimo codificante	ninguno	543/751	1629
<u>6:49412398</u>	T/C	G	T=1/C=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	ARG.GLY	544/751	1630
<u>6:49409627</u>	T/C	C	T=1/C=13005	0,0/0,0227/0,0077	Sinónimo codificante	ninguno	578/751	1734
<u>6:49409598</u>	A/C	G	A=3/C=13003	0,0/0,0681/0,0231	sin sentido	LEU.ARG	588/751	1763
<u>6:49409599</u>	A/G	A	A=16/C=1299 0	0,010,3631/0,123	sin sentido	CYS.ARG	588/751	1762
<u>6:49409584</u>	G/C	G	G=2/C=13004	0,0/0,0454/0,0154	sin sentido	GLN.GLU	593/751	1777
<u>6:49409599</u>	C/T	A	C=2/T=13004	0,0/0,0454/0,0154	sin sentido	ALA.THR	598/751	1792
<u>6:49408037</u>	T/C	A	T=1/C=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	HIS.ARG	613/751	1839
<u>6:49408008</u>	T/C	G	T=1/C=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	ARG.GLY	623/751	1867
<u>6:49407995</u>	C/T	A	C=1/T=13005	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido	ARG.HIS	627/751	1890
<u>6:49407986</u>	T/C	G	T=1/C=13005	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido	GLU.GLY	630/751	1889
<u>6:49403334</u>	G/A	A	G=1/A=13005	0,0116/0,0/0,0077	Sinónimo codificante	ninguno	653/751	1959
<u>6:49403324</u>	A/C	G	A=1/C=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	LEU.VAL	657/751	1969
<u>6:49403301</u>	T/C	T	T=21/C=1298 5	0,0465/0,3858/0,1615	Sinónimo codificante	ninguno	664/751	1992
<u>6:49403302</u>	A/G	C	A=8/G=13000	0,0698/0,0/0,0461	sin sentido	VAL.ALA	664/751	1991
<u>6:49403282</u>	C/T	G	C=7894/T=51 12	38,3256/41,2165/39,3049	sin sentido	VAL.ILE	671/751	2011
<u>6:49403258</u>	G/A	A	G=1/A=13005	0,0116/0,0/0,0077	Sinónimo codificante	ninguno	675/751	2025

6:49403270	T/C	G	T=1/C=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	THR.ALA	675/751	2023
6:49403267	T/C	G	T=1/C=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	THR.ALA	676/751	2026
6:49403260	C/T	A	C=1/T=13005	0,0/0,0227/0,0077	sin sentido	ARG.HIS	678/751	2033
6:49403194	T/A	T	T=1/A=13005	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido	LYS.MET	700/751	2099
6:49399544	A/C	G	A=3/C=13003	0,0/0,0681/0,0231	sin sentido	VAL.GLY	717/751	2150
6:49399498	A/G	A	A=1/G=13005	0,0116/0,0/0,0077	coding-synonymous	ninguno	732/751	2196
6:49399476	T/C	G	T=1/C=13005	0,0116/0,0/0,0077	sin sentido	LYS.GLU	740/751	2218

En otro aspecto, SEQ ID NO: 3 codifica la proteína MUT que tiene el 100 % de identidad con la proteína MUT humana de origen natural, o que tiene al menos un 90 % de identidad de aminoácidos con la proteína MUT humana de origen natural. En una realización preferida, el polinucleótido codifica una proteína MUT que tiene al menos un 95 % de identidad de aminoácidos con la proteína MUT humana de origen natural.

5 En una realización, un polipéptido de acuerdo con la invención mantiene al menos un 90 % de la función de la proteína MUT humana de origen natural, es decir, la capacidad para catalizar la conversión de L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA. En otra realización, la proteína MUT codificada mantiene al menos un 95 % de la función de la proteína MUT humana de origen natural. Esta función proteica se puede medir, por ejemplo, mediante la eficacia de rescate
 10 de un fenotipo neonatal en ratones knock-out *Mut* (Chandler, et al. 2010 Mol Ther 18:11-6) (Figure 9), la disminución de metabolitos circulantes incluyendo el ácido metilmalónico (Chandler, et al. 2010 Mol Ther 18:11-6; Carrillo-Carrasco, et al. 2010 Hu Gene Ther 21:1147-54; Senac, et al. 2012 Gene Ther 19:385-91) (Figura 10), la medición del cuerpo completo (Chandler, et al. 2010 Mol Ther 18:11-6; Senac, et al. 2012 Gene Ther 19:385-91) o la capacidad oxidativa del ¹-C-¹³propionato hepático (Carrillo-Carrasco, et al. 2010 Hu Gene Ther 21:1147-54), o la
 15 corrección de la incorporación de ¹-C-¹⁴propionato macromolecular en cultivo celular (Chandler, et al. 2007 BMC Med Genet 8:64).

En algunas realizaciones, el polinucleótido sintético presenta una expresión mejorada con respecto a la expresión de la secuencia de polinucleótido de metilmalonil-CoA mutasa humana de origen natural. La expresión mejorada es
 20 debido a que el polinucleótido comprende codones que se han optimizado con respecto a la secuencia de polinucleótido de la metilmalonil-CoA mutasa humana de origen natural. En un aspecto, el polinucleótido sintético tiene al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un
 25 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 % de codones menos utilizados comúnmente sustituidos por codones más usados comúnmente. En realizaciones adicionales, el polinucleótido tiene al menos un 85 %, 90 %, o 95 % de sustitución de codones menos usados comúnmente por codones más usados comúnmente, y demuestra una expresión equivalente o aumentada de MUT en comparación con SEQ ID NO: 3.

30 En algunas realizaciones, las secuencias de polinucleótido sintético de la invención codifican preferentemente un polipéptido que mantiene al menos aproximadamente el 80 % de aumento de la expresión de MUT (como se demuestra por la expresión del polinucleótido de SEQ ID NO: 1 en un huésped apropiado). En realizaciones adicionales, el polipéptido mantiene al menos un 85 %, 90 %, o 95 % o 100 % de aumento de la expresión
 35 observada con un polinucleótido de SEQ ID NO: 1.

En el diseño del *synMUT* de la presente invención, se sopesan las siguientes consideraciones. Por ejemplo, los cambios menores que se hagan en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, disminuyen el potencial de alterar la estructura secundaria de la secuencia, que puedan tener un impacto significativo en la expresión genética. La
 40 introducción de sitios de restricción indeseables también se reduce, facilitando la subclonación de MUT en el vector plásmido de expresión. Sin embargo, un número mayor de cambios en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 permite una identificación más conveniente del mensaje traducido y expresado, por ejemplo, el ARNm *in vivo*. De manera adicional, un mayor número de cambios en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 proporciona un aumento de la probabilidad de una expresión mayor. Estas consideraciones se sopesaron cuando se llegó a SEQ ID
 45 NO: 1. Las secuencias de polinucleótido que codifican *synMUT* permite un aumento de expresión del gen *synMUT* con respecto a las secuencias *MUT* humanas de origen natural. También se modificaron para que tuvieran un aumento de eficacia transcripcional, traduccional, y de repliegamiento proteico. Esta modificación se consigue utilizando tendencias de codón humanas, evaluando el contenido de GC, CpG, y GpC negativo, optimizando la interacción entre el codón y el anti-codón, y eliminando sitios crípticos de corte y empalme y motivos de inestabilidad
 50 de ARN. Debido a que las secuencias son nuevas, facilitan la detección utilizando ensayos basados en ácido nucleico.

MUT tiene un total de 750 aminoácidos y (*synMUT*) contiene aproximadamente 750 codones correspondientes a dichos aminoácidos. De estos codones, en SEQ ID NO: 1, se han cambiado aproximadamente 463 codones de los
 55 del *MUT* humano natural, sin embargo, como se ha descrito, SEQ ID NO: 1, a pesar de los cambios desde SEQ ID NO: 3, codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 para MUT. Los codones de SEQ ID NO: 1 se cambian, de acuerdo con las posiciones de aminoácidos equivalentes de SEQ ID NO: 2, en las posiciones 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 47, 48, 49, 52, 59, 60, 63, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 81, 82, 83, 85, 90, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 100, 103, 106,
 60 107, 108, 110, 111, 112, 113, 117, 119, 120, 122, 128, 129, 130, 134, 135, 136, 137, 138, 141, 134, 147, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 160, 162, 164, 166, 170, 171, 173, 174, 177, 179, 180, 183, 184, 185, 187, 189, 190, 191, 192, 194, 195, 196, 198, 199, 200, 201, 203, 204, 206, 207, 208, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 225, 227, 228, 230, 234, 235, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 254, 255, 256, 257, 220, 262, 263, 264, 270, 271, 272, 273, 278, 279, 280, 281, 284, 285, 286, 287, 289, 290, 292, 294, 298,
 65 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 308, 312, 314, 315, 316, 318, 319, 320, 323, 325, 326, 328, 330, 332, 333, 335, 337, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 355, 357, 358, 360, 362, 363, 364, 365, 369, 370,

372, 373, 377, 378, 379, 381, 382, 384, 385, 388, 389, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 400, 401, 403, 405, 406, 407, 409, 411, 412, 413, 414, 416, 417, 418, 419, 420, 422, 424, 427, 432, 433, 434, 436, 437, 438, 432, 434, 435, 439, 450, 453, 456, 457, 458, 459, 462, 463, 464, 466, 467, 468, 469, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 485, 486, 487, 488, 489, 494, 495, 499, 500, 502, 504, 505, 507, 508, 509, 511, 512, 513, 516, 517, 518, 520, 523, 524, 525, 527, 528, 529, 530, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 542, 544, 545, 547, 548, 551, 553, 555, 556, 558, 560, 561, 563, 566, 567, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 581, 584, 585, 586, 588, 590, 591, 592, 594, 597, 598, 599, 600 604, 605, 606, 609, 610, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 621, 624, 625, 626, 628, 629, 633, 635, 636, 637, 638, 640, 641, 642, 644, 646, 627, 630, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 661, 662, 663, 664, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 677, 679, 681, 682, 683, 686, 689, 691, 692, 693, 694, 696, 697, 698, 701, 702, 703, 705, 707, 710, 711, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 740, 743, 745, 746, 748, 749, 750 de SEQ ID NO: 2, con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 3 humana natural. En esta realización, se había mantenido la secuencia de aminoácidos de la MUT humana natural.

15 Se puede apreciar que la reversión del *synMUT* diseñado a los codones que se encuentran en *MUT* se puede esperar que dé como resultado secuencias de ácido nucleico que cuando se incorporan en vectores apropiados, pueden presentar también las propiedades deseadas de SEQ ID NO: 1, por ejemplo, dichas variantes de reversión parcial pueden tener una expresión de MUT equivalente a partir de un vector insertado en un huésped apropiado, que SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la invención incluye ácidos nucleicos en los que se revierte al menos

20 aproximadamente 1 codón alterado, al menos aproximadamente 2 codones alterados, al menos aproximadamente 3, codones alterados, al menos aproximadamente 4 codones alterados, al menos aproximadamente 5 codones alterados, al menos aproximadamente 6 codones alterados, al menos aproximadamente 7 codones alterados, al menos aproximadamente 8 codones alterados, al menos aproximadamente 9 codones alterados, al menos

25 aproximadamente 10 codones alterados, al menos aproximadamente 11 codones alterados, al menos aproximadamente 12 codones alterados, al menos aproximadamente 13 codones alterados, al menos aproximadamente 14 codones alterados, al menos aproximadamente 15 codones alterados, al menos

aproximadamente 16 codones alterados, al menos aproximadamente 17 codones alterados, al menos

aproximadamente 18 codones alterados, al menos aproximadamente 20 codones alterados, al menos

aproximadamente 25 codones alterados, al menos aproximadamente 30 codones alterados, al menos

30 aproximadamente 35 codones alterados, al menos aproximadamente 40 codones alterados, al menos

aproximadamente 50 codones alterados, al menos aproximadamente 55 codones alterados, al menos

aproximadamente 60 codones alterados, al menos aproximadamente 65 codones alterados, al menos

aproximadamente 70 codones alterados, al menos aproximadamente 75 codones alterados, al menos

aproximadamente 80 codones alterados, al menos aproximadamente 85 codones alterados, al menos

35 aproximadamente 90 codones alterados, al menos aproximadamente 95 codones alterados, al menos

aproximadamente 100 codones alterados, al menos aproximadamente 110 codones alterados, al menos

aproximadamente 120 codones alterados, al menos aproximadamente 130 codones alterados, al menos

aproximadamente 130 codones alterados, al menos aproximadamente 140 codones alterados, al menos

aproximadamente 150 codones alterados, al menos aproximadamente 160 codones alterados, al menos

40 aproximadamente 170 codones alterados, al menos aproximadamente 180 codones alterados, al menos

aproximadamente 190 codones alterados, al menos aproximadamente 200 codones alterados, al menos

aproximadamente 220 codones alterados, al menos aproximadamente 240 codones alterados, al menos

aproximadamente 260 codones alterados, al menos aproximadamente 280 codones alterados, al menos

aproximadamente 300 codones alterados, al menos aproximadamente 320 codones alterados, al menos

45 aproximadamente 340 codones alterados, al menos aproximadamente 360 codones alterados, al menos

aproximadamente 380 codones alterados, al menos aproximadamente 400 codones alterados, al menos

aproximadamente 420 codones alterados, al menos aproximadamente 440 codones alterados, al menos

aproximadamente 460 codones alterados, o al menos aproximadamente 480 de las posiciones de codón alteradas en SEQ ID NO: 1 se revierten a codones nativos de acuerdo con SEQ ID NO: 3, una secuencia de codones alternativa para una secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura 1, o con SEQ ID NO: 3 que contiene SNP (alelos) como se ha señalado en la Tabla 1, y que tienen una expresión equivalente a SEQ ID NO: 1. De manera alternativa, al menos aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % de las posiciones de codón alteradas en SEQ ID NO: 1 se revierten a la secuencia nativa de acuerdo con SEQ ID NO: 3, una secuencia de

55 codones alternativa para la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 1, o con SEQ ID NO: 3 que contiene SNP como se señala en la Tabla 1, y que tienen una expresión equivalente a SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención no comparten el 100 % de identidad con SEQ ID NO: 3. En otras palabras, en algunas realizaciones, los polinucleótidos que tienen un 100 % de identidad con SEQ ID NO: 3 se excluyen de las realizaciones de la presente invención.

El polinucleótido sintético puede estar compuesto de ADN y/o ARN o un ácido nucleico modificado, tal como un ácido nucleico peptídico, y podría conjugarse para mejorar las propiedades biológicas.

Terapia

En otro aspecto, la invención comprende un método de tratamiento de una enfermedad o afección mediada por la metilmalonil-CoA mutasa, La enfermedad o afección puede, en una realización, ser una acidemia metilmalónica (MMA). Este método comprende la administración a un sujeto que necesita el mismo de una construcción de polinucleótido sintético de metilmalonil-CoA mutasa que comprende los polinucleótidos sintéticos (*synMUT*) descritos en el presente documento. La enzima MUT se procesa tras la transcripción, traducción, y translocalización en el espacio interno mitocondrial. Durante este proceso de importación y maduración, se eliminan los aminoácidos 1-32 para producir el péptido MUT maduro, que comprende los restos 33-750. Por lo tanto, en otra realización, la invención incluye la parte de la enzima *synMUT* localizada dentro de la matriz mitocondrial, específicamente, los restos 33-750 que se corresponden con los nucleótidos 62-2250 de *synMUT*, unidos a un vehículo, una secuencia líder mitocondrial heteróloga o sintética, una pequeña molécula cargada o lipófila para dirigirse a la mitocondria; conjugada o modificada covalentemente a un péptido que se dirige a la matriz mitocondrial; o encapsulado para suministrar este fragmento de *synMUT* a un orgánulo subcelular, tipo celular, o tejido.

La terapia de sustitución enzimática consiste en la administración de la enzima funcional (metilmalonil-CoA mutasa) a un sujeto de manera que la enzima administrada catalizará las reacciones en el cuerpo que la propia enzima deficiente o eliminada no puede. En la terapia enzimática, la enzima deficiente se puede sustituir *in vivo* o repararse *in vitro* utilizando el polinucleótido sintético de acuerdo con la invención. La molécula enzimática funcional se puede aislar producirse *in vitro*, por ejemplo. Los métodos para producir enzimas recombinantes *in vitro* se conocen en la técnica. Los sistemas de expresión enzimática *in vitro* incluyen, sin limitación, los sistemas basados en células (bacterianas (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas fluorescens*), levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), células de insecto (por ejemplo, células de insecto infectadas con Baculovirus, expresión no lítica en células de insecto), y sistemas en eucariotas (por ejemplo, Leishmania)) y sistemas libres de células (utilizando ARN polimerasa purificada, ribosomas, tARN, ribonucleótidos). Al igual se conocen en la técnica sistemas de expresión víricos *in vitro*. La enzima aislada o producida de acuerdo con los métodos repetidos anteriormente, presenta, en realizaciones específicas, una homología del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 %, o 100 % con la metilmalonil-CoA mutasa (por ejemplo, humana) de origen natural.

La terapia genética puede implicar la terapia genética *in vivo* (introducción directa del material genético en la célula o el cuerpo) o transferencia genética *ex vivo*, que habitualmente implica alterar genéticamente las células antes de la administración. En un aspecto, la edición genómica, o edición genómica con nucleasas modificadas (GEEN) se puede llevar a cabo con los nucleótidos *synMUT* de la presente invención permitiendo que el ADN *synMUT* se inserte, sustituya o retire de un genoma utilizando nucleasas modificadas artificialmente. Se puede utilizar cualquier nucleasa modificada conocida tal como nucleasas en dedos de Zinc (ZFN), Nucleasas efectoras tipo activador de la transcripción (TALEN), el sistema CRISPR/Cas, y meganucleasa modificada re-modificada en endonucleasa de asentamiento. De manera alternativa, se pueden utilizar los nucleótidos de la presente invención que incluyen *synMUT*, en combinación con CASP/CRISPR, ZFN, o TALEN para la corrección modificada en el locus en una célula de paciente sea *in vivo* o *ex vivo*, luego, en una realización, utilizar esa célula corregida, tal como un fibroblasto o linfoblasto, para crear un iPS u otra célula madre para su uso en terapia celular.

Administración/suministro y formas de dosificación

Las vías de suministro de un polinucleótido sintético de metilmalonil-CoA mutasa (MUT) de acuerdo con la invención puede incluir, sin limitación, inyecciones (sistémicas o en el sitio diana), por ejemplo, inyección intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intraocular, subretiniana, en la arteria renal, en la vena hepática, intramuscular; física, incluyendo transfección mediada por ultrasonidos, vibración molecular inducida por un campo eléctrico, transfección fotoquímica, pistola genética (bombardeo de partículas); parenteral y oral (incluyendo aerosoles para inhalación y similares). Los métodos relacionados incluyen la utilización de células modificadas genéticamente, terapia antisentido, y ARN de interferencia.

Los vehículos para el suministro de un polinucleótido sintético de la metilmalonil-CoA mutasa (*synMUT*) de acuerdo con la invención, puede incluir, sin limitación, vectores víricos (por ejemplo, AAV, adenovirus, baculovirus, retrovirus, lentivirus, espumavirus, herpes virus, virus de la leucemia Moloney de ratón, virus vaccinia, y virus de hepatitis) y vectores no víricos (por ejemplo, ADN desnudo, mini-circulantes, liposomas, complejos ligando-polisilina-ADN, nanopartículas, polímeros catiónicos, incluyendo polímeros policatiónicos tales como dendrímeros, complejos peptídicos sintéticos, cromosomas artificiales y polímeros polidispersados). Por lo tanto, las formas de dosificación que se contemplan incluyen inyectables, partículas en aerosol, cápsula, y otras formas de dosificación oral.

En ciertas realizaciones, el vector que se utiliza para la terapia genética comprende un casete de expresión. El casete de expresión puede, por ejemplo, consistir en un promotor, el polinucleótido sintético, y una señal de adenilación. Los promotores víricos incluyen, por ejemplo, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus ubicuo (CMV-IE), el promotor de beta-activa de pollo (CBA), el promotor del virus de simio 40 (SV40), el promotor de repetición del extremo largo del virus de sarcoma de Rous (RSV-LTR), el promotor LTR del virus de leucemia murina Moloney (MoMLV), y otros promotores LTR retrovíricos. Los promotores pueden variar con el tipo de vector vírico que es útil y se conocen bien en la técnica.

En una realización específica, el *synMUT* podría situarse bajo el control transcripcional de un promotor ubicuo o específico de tejido, con un intrón 5', señal de poliadenilación, y un elemento de estabilidad de ARNm, tal como el elemento regulador post-transcripcional de marmota. El uso de un promotor específico de tejido puede restringir la expresión transgénica no deseada, así como facilitar la expresión transgénica persistente. El transgén terapéutico se

5 podría entonces suministrar como un ADN revestido o desnudo en la circulación sistémica, vena porta, o se inyecta directamente en un tejido u órgano, tal como el hígado o el riñón. Además, del hígado o riñón, pueden constituir dianas para la terapia el cerebro, páncreas, ojo, corazón, pulmones, médula ósea, y músculo. Otros tejidos u órganos pueden contemplarse como dianas para la terapia.

10 En otra realización, la misma construcción de expresión de *synMUT* se podría empaquetar en un vector vírico, tal como un vector adenovírico, vector retrovírico, vector lentivírico, o vector vírico adeno-asociado, y se suministra por distintos medios en la circulación sistémica, vena porta, o se inyecta directamente en un tejido u órgano, tal como el hígado o el riñón. Además, del hígado o riñón, pueden constituir dianas para la terapia el cerebro, páncreas, ojo, corazón, pulmones, médula ósea, y músculo. Otros tejidos u órganos pueden contemplarse como dianas para la

15 terapia.

Los promotores específicos de tejido incluyen, sin limitación, Apo A-I, ApoE, hAAT, transtiretina, activador hepático enriquecido, albúmina, PEPCK, y promotores RNAP_{II} (hígado), PAI-1, ICAM-2 (endotelio), MCK, SMC α -actina, promotores de cadena pesada de miosina, y cadena ligera de miosina (músculo), promotores de citoqueratina 18, CFTR (epitelio), GFAP, NSE, Sinapsina I, Preproencefalina, d β H, prolactina, y proteína básica de mielina (neuronales), y promotores de anquirina, α -espectrina, globina, HLA-DR α , CD4, glucosa-6-fosfatasa, y dectina-2 (eritroides).

20

Los promotores regulables (por ejemplo, promotores inducibles por ligando o inducibles por estímulo) también se contemplan para las construcciones de expresión de acuerdo con la invención.

25

En otra realización más, se puede utilizar el *synMUT* en aplicaciones *ex vivo* mediante el empaquetamiento en un vector retro o lentivírico para crear un vector integrado que se podría utilizar para corregir permanentemente cualquier tipo celular de un paciente con deficiencia de MUT. Las células transducidas con *synMUT* y corregidas se podrían utilizar entonces como una terapia celular. Los ejemplos pueden incluir células madre CD34+, hepatocitos primarios, o fibroblastos derivados de pacientes con deficiencias de MUT. Los fibroblastos se podrían reprogramar a otros tipos celulares utilizando métodos iPS bien conocidos por los practicantes de la técnica, tales como ZFN y TALENS, en el locus *MUT*, un sitio puerto genómico seguro, tal como AAVS1, o en otra localización ventajosa, tal como en un ARNr, el locus albúmina, GAPDH, o un pseudogen expresado adecuado.

30

Una composición (composición farmacéutica) para tratar un individuo por terapia genética puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector que comprende los transgenes de *synMUT* o una partícula vírica producida por u obtenida de la misma. La composición farmacéutica puede ser para su uso humano o animal. Normalmente, un médico determinará la dosificación actual que será más adecuada para un sujeto individual, y variará con la edad, peso, y respuesta del individuo en particular.

40

La composición puede comprender, en realizaciones específicas, un vehículo, diluyente, excipiente, o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Dichos materiales no deberían ser tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del transgén. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como el agua, solución salina, glicerol, azúcares y etanol. Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden incluir en estos, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. De manera adicional, pueden estar presentes en dichos vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tampones de pH, y similares. Una exposición completa de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences [Mack Pub. Co., 18^a Edición, Easton, Pa. (1990)]. La elección del vehículo, excipiente, o diluyente farmacéuticos se puede seleccionar con respecto a la vía de administración que se pretende y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además de, el vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante, lubricante, agentes suspensores, agentes de revestimiento, agentes solubilizante adecuados, y otros agentes como vehículos que pueden ayudar o aumentar la entrada vírica en el sitio diana (tal como por ejemplo, un sistema de suministro lipídico). Para la administración oral, se pueden utilizar excipientes como el almidón o la lactosa. También se pueden incluir saborizantes o colorantes. Para la administración parenteral, se puede utilizar una solución acuosa estéril, que contenga opcionalmente otras sustancias, tal como sales o monosacáridos para hacer que la solución sea isotónica con la sangre.

45

Una composición de acuerdo con la invención se puede administrar sola o en combinación con al menos otro agente tal como un compuesto estabilizante, que se puede administrar en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible, estéril, incluyendo, pero sin limitarse a, solución salina, solución salina tampón, dextrosa, y agua. Las composiciones se pueden administrar a un pacientes solo, o en combinación con otros agentes, moduladores o fármacos (por ejemplo, antibióticos).

50

60

65

La composición puede estar en varias formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas, y supositorios. Las formas de dosificación adicionales que se contemplan incluyen: en forma de supositorio o supositorio vaginal; en forma de una loción, solución, crema, unguento, o polvo fino; por el uso de un parche cutáneo; en cápsulas u óvulos; en forma de elixires, soluciones, o suspensiones; en forma de comprimidos o grageas.

Ejemplos

10 **Estudios de cultivos celulares:** Se modificó un gen sintético de la metilmalonil-CoA mutasa humana con codones optimizados (*synMUT*) se modificó utilizando una estrategia repetitiva, en la que el ADNc *MUT* (Secuencia de referencia del NCBI: NM_000255.3) se optimizó codón por codón para crear el *synMUT* (Figura 2) utilizando el software de optimización de codón OptimunGene™ (Genscript Inc.) que incorpora factores críticos implicados en la expresión proteica, tal como la adaptabilidad de codón, la estructura de ARNm, y varios elementos *cis* en la transcripción y la traducción. La secuencia resultante que se seleccionó tenía la máxima divergencia respecto al ADNc *MUT* a nivel de nucleótidos mientras mantenía los codones utilizados óptimamente en cada posición.

20 Para mejorarla expresión de la metilmalonil-CoA mutasa y crear un vector que pudiera expresar el gen *MUT* humano de una manera más eficiente, se clonó el *synMUT* utilizando una escisión por endonucleasas de restricción y la unión de ADN en el vector de expresión bajo el control del promotor β -activa de pollo (Chandler, et al. 2010 Mol Ther 18:11-6). La construcción que expresaba el *MUT* de longitud completa o el *synMUT* de longitud completa se transfeció en células 293FT utilizando Lipofectamina™ (Life Technologies). Los métodos de clonación y transfección son bien entendidos por los practicantes de la técnica (Sambrook, Fritsch, Maniatis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual). Tras 48 horas, se extrajo la proteína celular de las células transfectadas y se evaluó en cuanto a la expresión de metilmalonil-CoA mutasa proteica utilizando un análisis de Western (Chandler, et al. 2010 Mol Ther 18:11-6). Los resultados muestran que el *synMUT* se transcribe y traduce como o más eficazmente que el *MUT* (Figura 6). La Figura 6 muestra la expresión de la proteína MUT después de la transfección de células HEK-293 *in vitro* con *synMUT*. La Figura 6(A) muestra un esquema de las construcciones de expresión preparadas como se describe en Chandler, et al. 2010 Mol Ther 18:11-6. La Figura (B) muestra las células HEK-293 transfectadas con las construcciones de expresión de proteína fluorescente verde (GFP), la metilmalonil-CoA mutasa humana con codones optimizados (*synMUT* marcada con CBA) o la metilmalonil-CoA mutasa humana (*MUT* marcada con CBA). Las células transfectadas con CBA- *synMUT* presentaban un aumento significativo de la expresión de MUT en comparación con las células transfectadas con GFP o CBA- *MUT*.

35 **Terapia génica en ratones Knock-out (*Mut^{-/-}*) para metilmalonil-CoA mutasa.** El alelo *Mut* alberga una eliminación del exón 3 en el gen *Mut*. Este exón codifica un supuesto bolsillo de unión al sustrato en la enzima Mut. El alelo *Mut* no produce ARN maduro, proteínas, ni actividad enzimática. Los ratones *Mut^{-/-}* (ratones que tienen desactivado (destruido o sustituido) el gen *Mut*) en un fondo mixto (C57BL/6x [129SV/Ev x FvBN]) presentaban un fenotipo neonatal letal semipenetrante, en el que la mayoría de los ratones perecen en el periodo neonatal temprano. En el presente ejemplo, también se hace referencia al ratón *Mut^{-/-}* (knock-out para la metilmalonil-CoA mutasa) como el ratón con MMA.

45 Los ratones *Mut^{-/-}* presentan concentraciones elevadas masivamente de ácido metilmalónico en el plasma que aumenta progresivamente a un intervalo de 2 mmol/l, hasta que se produce la muerte. Los animales *Mut^{-/-}* tienen parámetros bioquímicos idénticos a los animales *Mut^{+/+}* de tipo silvestre y se utilizaron como control. Este modelo animal de MMA, por lo tanto, recapitula la forma más grave de la afección humana – acidemia metilmalónica *mut^o*.

50 El polinucleótido *synMUT* se utilizó entonces para construir una serie de nuevos vectores de terapia génica para tratar los ratones con MMA. Un vector se diseñó para expresar *synMUT* en el hígado de los ratones MMA y se utiliza para fabricar un vector vírico adeno-asociado recombinante.

55 El vector AAV2/8-HCR-hAAT-RBG contiene los elementos de control de la transcripción de la región de control hepática (HCR) y el promotor anti-tripsina alfa humano (hAAT), los sitios de clonación para la inserción de un ADN complementario, y la señal de poliadenilación de β -globina de conejo (RBG) (Figura 7). Flanqueando el casete de expresión repeticiones terminales del serotipo AAV 2. El gen humano de la metilmalonil-CoA mutasa con codones optimizados (*synMUT*) se clonaron en el AAV2-HCR-hAAT-RBG y se empaquetaron en rAAV8 como se había descrito anteriormente (Chandler, et al. 2010 Mol Ther 18:11-6), se purificó por centrifugación en cloruro de cesio, y se tituló por qPCR para fabricar el vector AAV8-HCR-hAAT- *synMUT*-RBG como se había descrito anteriormente Chandler, et al. 2010 Mol Ther 18:11-6; Carrillo-Carrasco, et al. 2010 Hum Gene Ther 21:1147-54). Se revisaron los estudios animales y se aprobaron por el Comité de Usuarios de Animales del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano. Las inyecciones hepáticas se llevaron a cabo en ratones no anestesiados neonatales, normalmente varias horas tras el nacimiento. Las partículas víricas se diluyeron hasta un volumen total de 20 microlitros con solución salina tampón de fosfato inmediatamente antes de la inyección y se suministraron en el parénquima hepático utilizando una aguja de calibre 32 y una estrategia transdérmica, como se había descrito anteriormente.

El tratamiento con el polinucleótido *synMUT* suministrado utilizando un AAV (virus adeno-asociado) rescataba los ratones *Mut^{-/-}* de la letalidad neonatal (Figura 8), mejoraba su crecimiento, y disminuía los niveles de ácido metilmalónico en el plasma (Figura 9). Esto establece la eficacia pre-clínica de *synMUT* como tratamiento para MMA *in vivo*, incluyendo en otros modelos animales, así como en seres humanos. La Figura 8 aumenta la supervivencia de ratones *Mut^{-/-}* después del tratamiento con el AAV8-HCR-hAAT-*synMUT*. Los ratones *Mut^{-/-}* recibieron una única inyección intrahepática de 1×10^{11} AAV8-HCR-hAAT-*synMUT* al nacer. Todos los ratones *Mut^{-/-}* tratados sobrevivieron hasta el día 30 y tenían apariencia normal con respecto a los hermanos no afectados. El día 30 se sacrificó un único ratón *Mut^{-/-}* tratado para evaluar la expresión *in vivo* de MUT (véase la Figura 9). La Figura 9 muestra la corrección metabólica tras la terapia genética con AAV8-HCR-hAAT-*synMUT*. Se documentó una reducción significativa en el plasma de los niveles de MMA el día 90 de vida en ratones *Mut^{-/-}* que recibieron una única inyección intrahepática de 1×10^{11} GC de AAV8-HCR-hAAT-*synMUT* al nacer.

Un único ratón *Mut^{-/-}* tratado se sacrificó a los 30 días tras el tratamiento con AAV8-HCR-hAAT-*synMUT*-RBG para evaluar la expresión *in vivo* de MUT (Figura 10). La Figura 10 muestra la expresión hepática de MUT en un ratón *Mut^{-/-}* rescatado después del tratamiento con AAV8-HCR-hAAT-*synMUT*. El hígado del ratón *Mut^{-/-}* mantenía una cantidad significativa de expresión de MUT 30 días después del tratamiento con AAV8-hAAT-*synMUT*, pero menor que los ratones de tipo silvestre sin tratar (*Mut^{+/+}*). En comparación, el hígado del ratón *Mut^{-/-}* sin tratar no presentaba proteína MUT detectable.

Se observó que el hígado del ratón *Mut^{-/-}* demostraba una expresión continua de MUT a los 30 días tras el tratamiento con AAV8-HCR-hAAT-*synMUT*-RBG, pero menor que los ratones de tipo silvestre sin tratar (*Mut^{+/+}*). El ratón *Mut^{-/-}* sin tratar no presentaba expresión de la proteína MUT detectable.

Estudio de seguridad en ratones

La genotoxicidad del AAV, específicamente el hepatocarcinoma (HCC) en ratones tras el suministro de AAV, se había expuesto como un problema creciente sobre la seguridad de la terapia genética con AAV. Los inventores observaron un aumento similar de la existencia de HCC a continuación del tratamiento de ratones con AAV8-CBA-*MUT* diseñado por los inventores (Figura 11). Sin embargo, los inventores no observaron ningún aumento significativo en la existencia de HCC cuando los ratones se trataban de manera similar con AAV8-hAAT-*synMUT*. Los datos demostraban que el AAV8-hAAT-*synMUT* es menos genotóxico y tiene un mejor perfil de seguridad que el del AAV8-CBA-*MUT*. Estos hallazgos sugieren que el AAV8-hAAT-*synMUT* es una construcción de AAV potencialmente más segura para los ensayos clínicos en seres humanos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Government of the United States of America, As Represented by the Secretary, Department of Health and Human Services

<120> TRANSGÉN SINTÉTICO DE LA METILMALONIL-COA MUTASA PARA EL TRATAMIENTO DE CLASE MUT

<130> 6137NHGRI-6-PCT

<150> US 61/792.081
<151> 15-03-2013

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 2253
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> *synMUT*

<400> 1

ES 2 644 468 T3

atgctgagag ccaaaaacca gctgttcctg ctgagcccc actatctgag acaggtcaaa	60
gaaagtccg ggagtagact gatccagcag agactgctgc accagcagca gccactgcat	120
cctgagtggg ccgctctggc caagaaacag ctgaagggca aaaaccaga agacctgatc	180
tggcacactc cagaggggat ttcaatcaag cccctgtaca gcaaaagga cactatggat	240
ctgccagagg aactgccagg agtgaagcct ttcaccgcg gaccttacc aactatgtat	300
acctttcgac cctggacaat tcggcagtac gccggcttca gtactgtgga ggaatcaaac	360
aagttttata aggacaacat caaggctgga cagcagggcc tgagtgtggc attcgatctg	420
gccacacatc gcggctatga ctcagataat cccagagtca ggggggacgt gggaatggca	480
ggagtgccta togacacagt ggaagatact aagattctgt tcgatggaat ccctctggag	540
aaaatgtctg tgagtatgac aatgaacggc gctgtcattc ccgtgctggc aaacttcac	600
gtcactggcg aggaacaggg ggtgcctaag gaaaaactga ccggcacaat tcagaacgac	660
atcctgaagg agttcatggt gcggaatact tacatthttc ccctgaacc atccatgaaa	720
atcattgccg atatcttcga gtacaccgct aagcacatgc ccaagttcaa ctcaattagc	780
atctccgggt atcatatgca ggaagcagga gccgacgcta ttctggagct ggcttacacc	840
ctggcagatg gcctggaata ttctogaacc ggactgcagg caggcctgac aatogacgag	900
ttogctccta gactgagttt cttttgggga attggcatga acttttacat ggagatcgcc	960
aagatgaggg ctggccggag actgtgggca cacctgatcg agaagatggt ccagcctaag	1020
aactctaaga gtctgctgct gcgggcccac tgccagacat ccggctggtc tctgactgaa	1080
caggacccat ataacaatat tgtcagaacc gcaatcgagg caatggcagc cgtgttcgga	1140

ES 2 644 468 T3

ggaaccaga gcctgcacac aaactccttt gatgaggccc tggggctgcc tacctggaag 1200
 totgctagga ttgcacgcaa tacacagatc attatccagg aggaatccgg aatcccaag 1260
 gtggccgatac cctggggagg ctcttacatg atggagtgcc tgacaaacga cgtgtatgat 1320
 gctgcaactga agctgattaa tgaaatcgag gaaatggggg gaatggcaaa ggccgtggct 1380
 gagggcattc caaaactgag gatcgaggaa tgtgcagcta ggcgccaggc acgaattgac 1440
 tcaggaagcg aagtgatcgt cggggtgaat aagtaccagc tggagaaaga agacgcagtc 1500
 gaagtgctgg ccatcgataa cacaagcgtg cgcaatcgac agattgagaa gctgaagaaa 1560
 atcaaaagct cccgogatca ggcaactggcc gaacgatgcc tggcagccct gactgagtgt 1620
 gctgcaagcg gggacggaaa cattctggct ctggcagtcg atgcctcccg ggctagatgc 1680
 actgtggggg aatcaccga cggcctgaag aaagtcttcg gagagcaca gccaatgat 1740
 cggatggtga gcggcgctta tagacaggag ttcggggaat ctaaagagat taccagtgcc 1800
 atcaagaggg tgcacaagtt catggagaga gaagggcgac ggcccaggct gctggtggca 1860
 aagatgggac aggacggaca tgatcgcgga gcaaaagtca ttgccaccgg gttcgctgac 1920
 ctgggatttg acgtggatat cggccctctg ttccagacac cacgagaggt cgcacagcag 1980
 gcagtgcagc ctgatgtgca cgcagtcgga gtgtccactc tggcagctgg ccataagacc 2040
 ctggtgcctg aactgatcaa agagctgaac tctctgggca gaccagacat cctggtcatg 2100
 tgcggcggcg tgatcccacc ccaggattac gaattcctgt ttgaggtcgg ggtgagcaac 2160
 gtgttcggac caggaaccag gatccctaag gccgcagtgc aggtcctgga tgatattgaa 2220
 aagtgtctgg aaaagaaaca gcagtcagtg taa 2253

<210> 2
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

5

Met Leu Arg Ala Lys Asn Gln Leu Phe Leu Leu Ser Pro His Tyr Leu
 1 5 10 15
 Arg Gln Val Lys Glu Ser Ser Gly Ser Arg Leu Ile Gln Gln Arg Leu
 20 25 30
 Leu His Gln Gln Gln Pro Leu His Pro Glu Trp Ala Ala Leu Ala Lys
 35 40 45
 Lys Gln Leu Lys Gly Lys Asn Pro Glu Asp Leu Ile Trp His Thr Pro
 50 55 60

10

ES 2 644 468 T3

Glu Gly Ile Ser Ile Lys Pro Leu Tyr Ser Lys Arg Asp Thr Met Asp
 65 70 75 80
 Leu Pro Glu Glu Leu Pro Gly Val Lys Pro Phe Thr Arg Gly Pro Tyr
 85 90 95
 Pro Thr Met Tyr Thr Phe Arg Pro Trp Thr Ile Arg Gln Tyr Ala Gly
 100 105 110
 Phe Ser Thr Val Glu Glu Ser Asn Lys Phe Tyr Lys Asp Asn Ile Lys
 115 120 125
 Ala Gly Gln Gln Gly Leu Ser Val Ala Phe Asp Leu Ala Thr His Arg
 130 135 140
 Gly Tyr Asp Ser Asp Asn Pro Arg Val Arg Gly Asp Val Gly Met Ala
 145 150 155 160
 Gly Val Ala Ile Asp Thr Val Glu Asp Thr Lys Ile Leu Phe Asp Gly
 165 170 175
 Ile Pro Leu Glu Lys Met Ser Val Ser Met Thr Met Asn Gly Ala Val
 180 185 190
 Ile Pro Val Leu Ala Asn Phe Ile Val Thr Gly Glu Glu Gln Gly Val
 195 200 205
 Pro Lys Glu Lys Leu Thr Gly Thr Ile Gln Asn Asp Ile Leu Lys Glu
 210 215 220
 Phe Met Val Arg Asn Thr Tyr Ile Phe Pro Pro Glu Pro Ser Met Lys
 225 230 235 240
 Ile Ile Ala Asp Ile Phe Glu Tyr Thr Ala Lys His Met Pro Lys Phe
 245 250 255
 Asn Ser Ile Ser Ile Ser Gly Tyr His Met Gln Glu Ala Gly Ala Asp
 260 265 270
 Ala Ile Leu Glu Leu Ala Tyr Thr Leu Ala Asp Gly Leu Glu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Thr Gly Leu Gln Ala Gly Leu Thr Ile Asp Glu Phe Ala Pro Arg
 290 295 300
 Leu Ser Phe Phe Trp Gly Ile Gly Met Asn Phe Tyr Met Glu Ile Ala
 305 310 315 320

ES 2 644 468 T3

Lys Met Arg Ala Gly Arg Arg Leu Trp Ala His Leu Ile Glu Lys Met
 325 330 335
 Phe Gln Pro Lys Asn Ser Lys Ser Leu Leu Leu Arg Ala His Cys Gln
 340 345 350
 Thr Ser Gly Trp Ser Leu Thr Glu Gln Asp Pro Tyr Asn Asn Ile Val
 355 360 365
 Arg Thr Ala Ile Glu Ala Met Ala Ala Val Phe Gly Gly Thr Gln Ser
 370 375 380
 Leu His Thr Asn Ser Phe Asp Glu Ala Leu Gly Leu Pro Thr Val Lys
 385 390 395 400
 Ser Ala Arg Ile Ala Arg Asn Thr Gln Ile Ile Ile Gln Glu Glu Ser
 405 410 415
 Gly Ile Pro Lys Val Ala Asp Pro Trp Gly Gly Ser Tyr Met Met Glu
 420 425 430
 Cys Leu Thr Asn Asp Val Tyr Asp Ala Ala Leu Lys Leu Ile Asn Glu
 435 440 445
 Ile Glu Glu Met Gly Gly Met Ala Lys Ala Val Ala Glu Gly Ile Pro
 450 455 460
 Lys Leu Arg Ile Glu Glu Cys Ala Ala Arg Arg Gln Ala Arg Ile Asp
 465 470 475 480
 Ser Gly Ser Glu Val Ile Val Gly Val Asn Lys Tyr Gln Leu Glu Lys
 485 490 495
 Glu Asp Ala Val Glu Val Leu Ala Ile Asp Asn Thr Ser Val Arg Asn
 500 505 510
 Arg Gln Ile Glu Lys Leu Lys Lys Ile Lys Ser Ser Arg Asp Gln Ala
 515 520 525
 Leu Ala Glu His Cys Leu Ala Ala Leu Thr Glu Cys Ala Ala Ser Gly
 530 535 540
 Asp Gly Asn Ile Leu Ala Leu Ala Val Asp Ala Ser Arg Ala Arg Cys
 545 550 555 560
 Thr Val Gly Glu Ile Thr Asp Ala Leu Lys Lys Val Phe Gly Glu His
 565 570 575

ES 2 644 468 T3

Lys Ala Asn Asp Arg Met Val Ser Gly Ala Tyr Arg Gln Glu Phe Gly
 580 585 590

Glu Ser Lys Glu Ile Thr Ser Ala Ile Lys Arg Val His Lys Phe Met
 595 600 605

Glu Arg Glu Gly Arg Arg Pro Arg Leu Leu Val Ala Lys Met Gly Gln
 610 615 620

Asp Gly His Asp Arg Gly Ala Lys Val Ile Ala Thr Gly Phe Ala Asp
 625 630 635 640

Leu Gly Phe Asp Val Asp Ile Gly Pro Leu Phe Gln Thr Pro Arg Glu
 645 650 655

Val Ala Gln Gln Ala Val Asp Ala Asp Val His Ala Val Gly Val Ser
 660 665 670

Thr Leu Ala Ala Gly His Lys Thr Leu Val Pro Glu Leu Ile Lys Glu
 675 680 685

Leu Asn Ser Leu Gly Arg Pro Asp Ile Leu Val Met Cys Gly Gly Val
 690 695 700

Ile Pro Pro Gln Asp Tyr Glu Phe Leu Phe Glu Val Gly Val Ser Asn
 705 710 715 720

Val Phe Gly Pro Gly Thr Arg Ile Pro Lys Ala Ala Val Gln Val Leu
 725 730 735

Asp Asp Ile Glu Lys Cys Leu Glu Lys Lys Gln Gln Ser Val
 740 745 750

5

<210> 3
 <211> 2253
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

ES 2 644 468 T3

atg	ttaagag	ctaagaatca	gcttttttta	ctttcacctc	attacctgag	gcaggtaaaa	60
gaat	catcag	gctccaggct	catacagcaa	cgacttctac	accagcaaca	gcccttcac	120
ccaga	atggg	ctgccctggc	taaaaagcag	ctgaaaggca	aaaaccaga	agacctata	180
tggc	acacc	cggaaggat	ctctataaaa	cccttgatt	ccaagagaga	tactatggac	240
ttac	ctgaag	aacttcagg	agtgaagcca	ttcacacgtg	gaccatatoc	taccatgtat	300
acct	taggc	cctggaccat	ccgccagtat	gctggttta	gtactgtgga	agaaagcaat	360

ES 2 644 468 T3

aagttctata aggacaacat taaggctggt cagcagggat tatcagttgc ctttgatctg 420
gogacacatc gtggctatga ttcagacaac cotcgagttc gtggtgatgt tggaatggct 480
ggagttgcta ttgacactgt ggaagatacc aaaattcttt ttgatggaat tcctttagaa 540
aaaatgtcag tttccatgac tatgaatgga gcagttattc cagttcttgc aaattttata 600
gtaactggag aagaacaagg tgtacctaaa gagaagctta ctggtacat ccaaaatgat 660
atactaaagg aatttatggt tcgaaataca tacatttttc ctocagaacc atccatgaaa 720
attattgctg acatatttga atatacagca aagcacatgc caaaatttaa ttcaatttca 780
attagtggat accatattgca ggaagcaggg gctgatgcc tttctggagct ggcctatact 840
ttagcagatg gattggagta ctctagaact ggactccagg ctggcctgac aattgatgaa 900
tttgaccaa ggttgtcttt cttctgggga attggaatga atttctatat ggaaatagca 960
aagatgagag ctggtagaag actctgggct cacttaatag agaaaatgtt tcagcctaaa 1020
aactcaaat ctcttcttct aagagcacac tgtcagacat ctggatggtc acttactgag 1080
caggatccct acaataatat tgtccgtact gcaatagaag caatggcagc agtatttggg 1140
gggactcagt cttgacacac aaattctttt gatgaagctt tgggtttgcc aactgtgaaa 1200
agtgtctgaa ttgccaggaa cacacaaatc atcattcaag aagaatctgg gattcccaaa 1260
gtggctgac cttggggagg ttcttacatg atggaatgtc tcacaaatga tgtttatgat 1320
gctgctttaa agctcattaa tgaaattgaa gaaatgggtg gaatggcca agctgtagct 1380
gaggaatac ctaaacttctg aattgaagaa tgtgtctgcc gaagacaagc tagaatagat 1440
tctggttctg aagtaattgt tggagtaaat aagtaccagt tggaaaaaga agacgctgta 1500
gaagtctgga caattgataa tacttcagtg cgaaacaggc agattgaaaa acttaagaag 1560
atcaaatoca gcagggatca agctttggct gaacgttgtc ttgctgcact aaccgaatgt 1620
gctgctagcg gagatggaaa tatcctggct cttgcagtgg atgcatctcg ggcaagatgt 1680
acagtgggag aatcacaga tgccctgaaa aaggatattg gtgaacataa agcgaatgat 1740
cgaatggtga gtggagcata tcgccaggaa tttggagaaa gtaaagagat aacatctgct 1800
atcaagaggg ttcataaatt catggaacgt gaaggtcgca gacctcgtct tctttagca 1860
aaaatgggac aagatggcca tgacagagga gcaaaagtta ttgctacagg atttgctgat 1920
cttggttttg atgtggacat aggcctctt ttccagactc ctctggaagt ggcccagcag 1980
gctgtggatg cggatgtgca tgctgtggc ataagcacc tcgctgctgg tcataaaacc 2040
ctagttctg aactcatcaa agaacttaac tcccttgac ggccagatat tcttgtcatg 2100
tgtggagggg tgataccacc tcaggattat gaatttctgt ttgaagttgg tgtttccaat 2160
gtatttggtc ctgggactcg aattccaaag gctgccgttc aggtgcttga tgatattgag 2220
aagtgtttg aaaagaagca gcaatctgta taa 2253

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido sintético de la metilmalonil-CoA mutasa (*synMUT*) que se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- 5 a) un polinucleótido que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1;
 b) un polinucleótido que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico con al menos aproximadamente un 80 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 y que codifica un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 2, y que tiene una expresión equivalente en un huésped que la expresión con SEQ ID NO: 1 o la expresión con SEQ ID NO: 3, en donde el polinucleótido no tiene la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3.
- 10 2. El polinucleótido sintético de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.
- 15 3. El polinucleótido sintético de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido tiene al menos un 95 % de identidad con la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1.
- 20 4. El polinucleótido sintético de la reivindicación 1, en la que el SEQ ID NO: 1 presenta un aumento de la expresión en un huésped apropiado con respecto a la expresión de SEQ ID NO: 3 en un huésped apropiado.
- 25 5. El polinucleótido sintético de la reivindicación 3, en la que el polinucleótido sintético que tiene un aumento de la expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende codones que se han optimizado con respecto a la secuencia de polinucleótido de la metilmalonil-CoA mutasa humana de origen natural (SEQ ID NO: 3).
- 30 6. El polinucleótido sintético de la reivindicación 4, en la que la secuencia de ácido nucleico tiene al menos aproximadamente un 70 % de codones utilizados menos comúnmente sustituidos por codones utilizados más comúnmente.
- 35 7. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido sintético de la reivindicación 1.
8. El vector de expresión de la reivindicación 7, en la que el vector de expresión es AAV2/8-HCR-hAAT-RBG.
9. Un polinucleótido sintético de la metilmalonil-CoA mutasa (MUT) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o una afección mediadas por la metilmalonil-CoA mutasa, comprendiendo el método de tratamiento la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad terapéutica del polinucleótido sintético.
- 40 10. Una metilmalonil-CoA mutasa (MUT) para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o una afección mediadas por la metilmalonil-CoA mutasa, comprendiendo el método la administración a un sujeto de la metilmalonil-CoA mutasa, siendo producida la metilmalonil-CoA mutasa utilizando el polinucleótido sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 45 11. El polinucleótido sintético de la metilmalonil-CoA mutasa (MUT) para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la enfermedad o la afección son acidemia metilmalónica (MMA).
12. La metilmalonil-CoA mutasa (MUT) para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la enfermedad o la afección son acidemia metilmalónica (MMA).
- 50 13. Una composición que comprende el polinucleótido sintético de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 14. Un polinucleótido sintético de la metilmalonil-CoA mutasa (MUT) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o una afección mediadas por la metilmalonil-CoA mutasa, comprendiendo el método de tratamiento la administración del polinucleótido sintético de la metilmalonil-CoA mutasa a una célula de un sujeto que lo necesita, en donde el polinucleótido se introduce en la célula del sujeto mediante edición genómica en la célula del sujeto utilizando una nucleasa seleccionada de entre el grupo de nucleasas en dedos de zinc (ZFN), nucleasas efectoras tipo activador de la transcripción (TALEN), el agrupamiento de repeticiones cortas palindrómicas interespaciadas regularmente (sistema CRISPER/cas) y meganucleasa re-modificada en endonucleasas de asentamiento en una célula del sujeto; y administrar la célula al sujeto.
- 60

Figura 1

***Homo sapiens* [gbpri]: 93487 CDS's (40662582 codones)**

campos: [tripleto] [frecuencia: **por mil**] ([número])

UUU 17,6 (714298)	UCU 15,2 (618711)	UAU 12,2 (495699)	UGU 10,6 (430311)
UUC 20,3 (824692)	UCC 17,7 (718892)	UAC 15,3 (622407)	UGC 12,6 (513028)
UUA 7,7 (311881)	UCA 12,2 (496448)	UAA 1,0 (40285)	UGA 1,6 (63237)
UUG 12,9 (525688)	UCG 4,4 (179419)	UAG 0,8 (32109)	UGG 13,2 (535595)
CUU 13,2 (536515)	CCU 17,5 (713233)	CAU 10,9 (441711)	CGU 4,5 (184609)
CUC 19,6 (796638)	CCC 19,8 (804620)	CAC 15,1 (613713)	CGC 10,4 (423516)
CUA 7,2 (290751)	CCA 16,9 (688038)	CAA 12,3 (501911)	CGA 6,2 (250760)
CUG 39,6 (1611801)	CCG 6,9 (281570)	CAG 34,2 (1391973)	CGG 11,4 (464485)
AUU 16,0 (650473)	ACU 13,1 (533609)	AAU 17,0 (689701)	AGU 12,1 (493429)
AUC 20,8 (846466)	ACC 18,9 (768147)	AAC 19,1 (776603)	AGC 19,5 (791383)
AUA 7,5 (304565)	ACA 15,1 (614523)	AAA 24,4 (993621)	AGA 12,2 (494682)
AUG 22,0 (896005)	ACG 6,1 (246105)	AAG 31,9 (1295568)	AGG 12,0 (486463)
GUU 11,0 (448607)	GCU 18,4 (750096)	GAU 21,8 (885429)	GGU 10,8 (437126)
GUC 14,5 (588138)	GCC 27,7 (1127679)	GAC 25,1 (1020595)	GGC 22,2 (903565)
GUA 7,1 (287712)	GCA 15,8 (643471)	GAA 29,0 (1177632)	GGA 16,5 (669873)
GUG 28,1 (1143534)	GCG 7,4 (299495)	GAG 39,6 (1609975)	GGG 16,5 (669768)

Codificación GC 52,27% 1ª letra GC 55,72% 2ª letra GC 42,54% 3ª letra GC 58,55%

Figura 2

SEQ ID NO:1

ATGCTGAGAGCCAAAAACCAGCTGTTCTGCTGAGCCCCACTATCTGAGACAGGTCAAAGAAAGTTCCG
 GGAGTAGACTGATCCAGCAGAGACTGCTGCACCAGCAGCAGCCACTGCATCCTGAGTGGGCCGCTCTGGC
 CAAGAAACAGCTGAAGGGCAAAAACCCAGAAGACCTGATCTGGCACACTCCAGAGGGGATTTCAATCAAG
 CCCCTGTACAGCAAAAGGGACACTATGGATCTGCCAGAGGAACTGCCAGGAGTGAAGCCTTTCACCCGCG
 GACCTTACCCAACCTATGTATACTTTTCGACCCTGGACAATTCGGCAGTACGCCGGCTTCAGTACTGTGGA
 GGAATCAAACAAGTTTTATAAGGACAACATCAAGGCTGGACAGCAGGGCCTGAGTGTGGCATTTCGATCTG
 GCCACACATCGCGGCTATGACTCAGATAATCCAGAGTCAGGGGGGACGTGGGAATGGCAGGAGTCGCTA
 TCGACACAGTGGAAAGATACTAAGATTCTGTTTCGATGGAATCCCTCTGGAGAAAATGTCTGTGAGTATGAC
 AATGAACGGCGCTGTCTATCCCGTGGTGGCAAACTTCATCGTCACTGGCGAGGAACAGGGGGTGCCTAAG
 GAAAACTGACCGGCACAATTCAGAACGACATCTGAAGGAGTTCATGGTGCAGGAATACTTACATTTTTTC
 CCCCTGAACCATCCATGAAAATCATTGCCGATATCTTCGAGTACACCGCTAAGCACATGCCCAAGTTCAA
 CTAATTAGCATCTCCGGGTATCATATGCAGGAAGCAGGAGCCGACGCTATTCTGGAGCTGGCTTACACC
 CTGGCAGATGGCCTGGAATATTCTCGAACCAGGACTGCAGGCAGGCCTGACAATCGACGAGTTCGCTCCTA
 GACTGAGTTTTCTTTGGGGAATTGGCATGAACTTTTACATGGAGATCGCCAAGATGAGGGCTGGCCGGAG
 ACTGTGGGCACACCTGATCGAGAAGATGTTCCAGCCTAAGAACTCTAAGAGTCTGCTGCTGCCGGGCCAT
 TGCCAGACATCCGGCTGGTCTCTGACTGAACAGGACCCATATAACAATATTGTCAGAACCAGCAATCGAGG
 CAATGGCAGCCGTGTTTCGGAGGAACCCAGAGCCTGCACACAACTCCTTTGATGAGGCCCTGGGGCTGCC
 TACCGTGAAGTCTGCTAGGATTGCACGCAATACACAGATCATTATCCAGGAGGAATCCGGAATCCCAAAG
 GTGGCCGATCCCTGGGGAGGCTCTTACATGATGGAGTGCTGACAAACGACGTGTATGATGCTGCACTGA
 AGCTGATTAATGAAATCGAGGAAATGGGGGAATGGCAAAGGCCGTGGCTGAGGGCATTCCAAAACCTGAG
 GATCGAGGAATGTGCAGCTAGGCGCCAGGCACGAATGACTCAGGAAGCGAAGTATCGTCCGGGTGAAT
 AAGTACCAGCTGGAGAAAAGAAGACGCAGTCGAAGTGTGGCCATCGATAACACAAGCGTGCAGCAATCGAC
 AGATTGAGAAGCTGAAGAAAATCAAAGCTCCCGCATCAGGCCTGGCCGAACGATGCCTGGCAGCCCT
 GACTGAGTGTGCTGCAAGCGGGGACGGAAACATTTCTGGCTCTGGCAGTTCGATGCCTCCCGGGCTAGATGC
 ACTGTGGGGGAAATCACCGACGCCCTGAAGAAAGTCTTCGGAGAGCACAGGCCAATGATCGGATGGTGA
 GCGGCGCTTATAGACAGGAGTTCGGGGAAATCTAAAAGAGATTACCAGTGCCATCAAGAGGGTGCACAAGTT
 CATGGAGAGAGAAGGGCGACGGCCAGGCTGCTGGTGGCAAAGATGGGACAGGACGGACATGATCGCGGA
 GCAAAAGTCATTGCCACCGGGTTCGCTGACCTGGGATTTGACGTGGATATCGGCCCTCTGTTCCAGACAC
 CACGAGAGGTGCGACAGCAGGCAGTCGACGCTGATGTGCACGCAGTCGGAGTGTCCACTCTGGCAGCTGG
 CCATAAGACCCTGGTGCCTGAACTGATCAAAGAGCTGAACTCTCTGGGCAGACCAGACATCCTGGTCATG
 TGCGGCGGCGTATCCACCCAGGATTACGAATTCCTGTTTGAGGTCGGGGTGGCAACGTGTTTCGGAC
 CAGGAACCAGGATCCCTAAGGCCGAGTGCAGGTCCTGGATGATATTGAAAAGTGTCTGGAAAAGAAACA
 GCAGTCAGTGTA

Figura 3

SEQ ID NO:2

1 mlraknqlfl lsphylrqvk essgsrliqq rllhqqqplh pewaalakkq lkqknpedli
 61 whtpegisik plyskrdtmd lpeelpgvvp ftrgpyptmy tfrpwtirqy agfstveesn
 121 kfykdnikag qgglsvafdl athrgydsdn prvrqdvqma gvaidtvedt kilfdgiple
 181 kmsvsmtmng avipvlanfi vtgeeqgvpk ekltgtiqnd ilkefmvrnt yifppepsmk
 241 iiadifeyta khmpkfnsis isgyhmqeag adailelayt ladgleysrt glqagltide
 301 faprlsffwg igmnfyemeia kmragrrlwa hliekmfcpk nskslllrah cqtsqwslte
 361 qdpynnivrt aieamaavfg gtqslhtnsf dealglptvk sariarntqi iiqeesgipk
 421 vadpwggsym mecltndvyd aalklineie emggmakava egipklriee caarrqarid
 481 sgsevivgvn kyqlekedav evlaidntsv rnrqiekllk ikssrdqala ehclaaltec
 541 aasgdgnila lavdasrarc tvgeitdalk kvfgehkand rmvsgayrqe fgeskeitsa
 601 ikrvhkfmmer egrprllva kmgqdgndrg akviatgfad lgfdvdigpl fqtprevaqq
 661 avdadvhav vstlaaghkt lvpelikeln slgrpdlvm cggvippqdy eflfevqvsn
 721 vfgpgtriph aavqvlddie kclekkqqsq

SEQ ID NO:3

ATGTTAAGAGCTAAGAATCAGCTTTTTTACTTTACCTCATTACCTGAGGCAGGTAAAAAAGAAATCATCAG
 GCTCCAGGCTCATAACAGCAACGACTTCTACACCAGCAACAGCCCCCTCACCAGAAATGGGCTGCCCTGGC
 TAAAAAGCAGCTGAAAAGGCAAAAACCCAGAAAGACCTAATATGGCACACCCCCGGAAGGGATCTCTATAAAA
 CCCTTGTATTCCAAGAGAGATACTATGGACTTACCIGAAGAACTCCAGGAGTGAAGCCATTACACGTTG
 GACCATACTTACCAATGATATACCTTTAGGCCCTGGACCATCCGCCAGTATGCTGGTTTTAGTACTGTGGA
 AGAAAGCAATAAGTTCTATAAGGACAACATTAAGGCTGGTTCAGCAGGGATTATCAGTTGCCTTTGATCTG
 GCGACACATCGTGGCTATGATTGAGACAACCCCTCGAGTTTCGTGGTGATGTTGGAATGGCTGGAGTTGCTA
 TTGACACTGTGGAAGATACCAAAATCTTTTTGATGGAATTCCTTTAGAAAAAATGTCAGTTTCCATGAC
 TATGAATGGAGCAGTTATTCCAGTTCTTGCAAAATTTATAGTAACTGGAGAAGAACAAGGTGACCTAAA
 GAGAAGCTTACTGGTACCATCCAAAATGATATACTAAAGGAATTTATGGTTCGAAATACATACATTTTTTC
 CTCCAGAACCATCCATGAAAATTTATGCTGACATATTTGAATATACAGCAAAGCACATGCCAAAATTTAA
 TTCAATTTCAATTAGTGGATACCATATGCAAGGAGCAGGGGCTGATGCCATTCTGGAGCTGGCCTATACT
 TTAGCAGATGGATGGAGTACTCTAGAACTGGACTCCAGGCTGGCCTGACAATTTGATGAATTTGCACCAA
 GGTGCTCTTTCTTCTGGGGAATTTGGAATGAATTTCTATATGAAATAGCAAAGATGAGAGCTGGTAGAAG
 ACTCTGGGCTCACTTAATAGAGAAAATGTTTCAGCCTAAAAAATCAAAAATCTCTTCTTCTAAGAGCACAC
 TGTCAGACATCTGGATGGTCACTTACTGAGCAGGATCCCTACAATAATATTGTCCGTACTGCAATAGAAG
 CAATGGCAGCAGTATTTGGAGGGACTCAGTCTTTGCACACAAAATCTTTTGGATGAAGCTTTGGGTTTGCC
 AACTGTGAAAAGTGCFCGAATGGCAGGAACACACAAAATCATCATTTCAAGAAAGAAATCTGGGATTTCCAAA
 GTGGCTGATCCTTGGGGAGGTTCTTACATGATGGAATGTCTCACAAATGATGTTTATGATGCTGCTTTAA
 AGTCATTAATGAAATTTGAAGAAATGGGTGGAATGGCCAAAGCTGTAGCTGAGGGAATACCTAAAATTCG
 AATTGAAGAATGTGCTGCCCGAAGACAAGCTAGAATAGATTCTGGTTCGAAAGTAATTTGTTGGAGTAAAT
 AAGTACCAGTTGGAAGAAAGAACGCTGTAGAAGTCTGGCAATTGATAATACTTTCAGTGCAGAAACAGGC
 AGATTGAAAAACTTAAGAAGATCAATCCAGCAGGGATCAAGCTTTGGCTGAACGTTGCTTGTGCTGCACT
 AACCGAATGTGCTGCTAGCGGAGATGGAAAATATCTGGCTCTTGCAGTGGATGCATCTCGGGCAAGATGT
 ACAGTGGGAGAAAATCACAGATGCCCTGAAAAGGATTTGGTGAACATAAAGCGAATGATCGAATGGTGA
 GTGGAGCATATCGCCAGGAATTTGGAGAAAGTAAAGAGATAACATCTGCTATCAAGAGGGTTCAATAAAT
 CATGGAACGTGAAGGICGACAGACCICGICTTCTTGTAGCAAAAATGGGACAAGATGGCCATGACAGAGGA
 GCAAAAGTTATGCTACAGGATTTGCTGATCTTGGTTTTGATGTGGACATAGGCCCTCTTTCCAGACTC
 CTCGTGAAGTGGCCCAGCAGGCTGTGGATGCGGATGTGCATGCTGTGGGCATAAGCACCCCTCGCTGCTGG
 TCATAAAACCCTAGTTCCCTGAACATCAAAAGAACTTAACTCCCTGGACGGCCAGATATTCTTGTGATG
 TGTGGAGGGGTGATACCACCTCAGGATTAAGAAATTTCTGTTTTGAAGTTGGTGTTCCTAATGTAATTTGGTC
 CTGGGACTCGAATTTCAAAGGCTGCCGTTTCAGGTGCTTGTATGATATTGAGAAAGTGTTTGGAAGAAAGCA
 GCAATCTGTATAA

Figura 4

Búsqueda: *synMUT*

Sujeto: *MUT* (Secuencia de referencia NCBI: NM_000255.3)

Estadística de alineamiento para coincidencia nº 1				
Puntuación	Expectativa	Identidades	Huecos	Cadena
1665 bits(1846)	0,0	1721/2253(76%)	0/2253(0%)	más/más
Búsqueda 1	ATGCTGAGAGCCAAAAACCGCTGTTCTGCTGAGCCCCACTATCTGAGACAGGTCARA			60
Sujeto 1	ATGTTAAGAGCTAAGAATCAGCTTTTTTTACTTTTCACCTCATACCTGAGGCAGGTAARA			60
Búsqueda 61	GAAAGTTCGGGAGTAGACTGATCCAGCAGAGACTGCTGCACCAGCAGCAGCCACTGCAT			120
Sujeto 61	GAATCATCAGGCTCCAGGCTCATACAGCAACGGACTTCTACACCAGCAACAGCCCTTCC			120
Búsqueda 121	CCTGAGTGGGCGCTCTGGCCAAGAAACAGCTGAAGGGCAAAAACCCAGAAGACCTGATC			180
Sujeto 121	CCAGAATGGGCTGCCCTGGCTAAAAAGCAGCTGAAAGGCAAAAACCCAGAAGACCTAATA			180
Búsqueda 181	TGGCACACTCCAGAGGGGATTTCATCAAGCCCCGTACAGCAAAAAGGACACTATGGAT			240
Sujeto 181	TGGCACACCCCGAAGGGATCTCTATAAAACCCTTGTATTCCAAGAGAGATACTATGGAC			240
Búsqueda 241	CTGCCAGAGGAACTGCCAGGAGTGAAGCCTTTACCCGGGACCTTACCCAACTATGTAT			300
Sujeto 241	TTACCTGAAGAACTTCCAGGAGTGAAGCCATTCCACAGTGGACCATATCCTACCATGTAT			300
Búsqueda 301	ACCTTTCGACCCTGGACAATTCGGCAGTACGCCGGCTTTCAGTACTGTGGAGGAATCAAA			360
Sujeto 301	ACCTTTAGGCCCTGGACCATCCGCCAGTATGCTGGTTTTAGTACTGTGGAAGAAAGCAAT			360
Búsqueda 361	AAGITTTATAAGGACAACATCAAGGCTGGACAGCAGGGCTGAGTGTGGCATTTCGATCTG			420
Sujeto 361	AAGITCTATAAGGACAACATTAAGGCTGGTACAGCAGGGATTATCAGTTGCCITTCATCTG			420
Búsqueda 421	GCCACACATCGCGGCTATGACTCAGATAATCCACAGTCAAGGGGGACGTGGGAATGGCA			480
Sujeto 421	GCGACACATCGTGGCTATGATTGAGACAACCCCTCGAGTTCGTGGTGTGTGGGAATGGCT			480
Búsqueda 481	GGAGTCCGCTATCGACACAGTGGAAAGATACTAAGATTCTGTTCCGATGGAAATCCCTCTGGAG			540
Sujeto 481	GGAGTTGCTATGACACTGTGGAAAGATAACAAAATTCCTTTTGGATGGAAATCCCTTAGAA			540
Búsqueda 541	AAAATGCTCTGTGAGTATGACAATGAAAGGCGCTGTCATTCCTGCTGGCAAACTTCATC			600
Sujeto 541	AAAATGTCAGTITCCATGACTATGAATGGAGCAGITATTCAGITCTTGCAAAATTTATA			600
Búsqueda 601	GTCAGTGGCAGGAACAGGGGTGCCAAGGAAAACACTGACCGGCACAATTCAGAACGAC			660
Sujeto 601	GTAAGTGGAGAAGAACAAGGTGTACCTAAAGAGAGAGCTTACTGGTACCATCCAAAATGAT			660
Búsqueda 661	AICCTGAAGGAGTTCATGGTCCGGAATACTTACATTTTTCCOCTGAACCATCCATGAAA			720
Sujeto 661	ATACTAAAGGAATTTATGGTTCGAAATACATACATTTTTCTCCAGAACCATCCATGAAA			720
Búsqueda 721	AICATTGCCGATATCTTCAGTACACCGCTAAGCACATGCCCAAGTTCAACTCAATTAGC			780
Sujeto 721	ATTATTGCTGACATATTTGAATATACAGCAAGCACATGCCAAAATTTAATTCAAATTTCA			780

Figura 4 (continuación)

Búsqueda	781	ATCTCCGGGTATCATATGCAGGAAGCAGGAGCCGACGCTATTCTGGAGCTGGCTTACACC	840
Sujeto	781	ATTAGTGGATACCATATGCAGGAAGCAGGGGCTGATGCCATTCTGGAGCTGGCCTATACT	840
Búsqueda	841	CTGGCAGATGGCCTGGAATATTCTCGAACCCGGACTGCAGGCAGGCCTGACAATCGACGAG	900
Sujeto	841	TTAGCAGATGGATTGGAGTACTCTAGAACTGGACTCCAGGCTGGCCTGACAATTGATGAA	900
Búsqueda	901	TTCGCTCCTAGACTGAGTTTCTTTTGGGGAATTGGCATGAACTTTTACATGGAGATCGCC	960
Sujeto	901	TTTGCACCAAGGTTGTCCTTCTCTGGGGAATTGGAATGAATTTCTATATGGAAATAGCA	960
Búsqueda	961	AAGATGAGGGCTGGCCGGAGACTGTGGGCACACCTGATCGAGAAGATGTTCCAGCCTAAG	1020
Sujeto	961	AAGATGAGAGCTGGTAGAAGACTCTGGGCTCACTTAATAGAGAAAATGTTCCAGCCTAAA	1020
Búsqueda	1021	AACTCTAAGAGTCTGCTGCTGCGGGCCCATTTGCCAGACATCCGGCTGGTCTCTGACTGAA	1080
Sujeto	1021	AACTCAAAATCTCTTCTTCTAAGAGCACACTGTCAGACATCTGGATGGTCACTTACTGAG	1080
Búsqueda	1081	CAGGACCCATATAACAATATTGTGAGAACCGCAATCGAGGCAATGGCAGCCGTGTTCCGA	1140
Sujeto	1081	CAGGATCCCTACAATAATATTGTCCGTAGTCAATAGAAGCAATGGCAGCAGTATTGGA	1140
Búsqueda	1141	GGAACCCAGAGCCTGCACACAACTCCTTTGATGAGGCCCTGGGGCTGCTTACCCTGAAG	1200
Sujeto	1141	GGGACTCAGTCTTTGCACACAAATTCCTTTGATGAAGCTTTGGGTTTGCCAACGTGAAA	1200
Búsqueda	1201	TCTGCTAGGATTGCACGCAATACACAGATCATTATCCAGGAGGAATCCGGAATCCCAAAG	1260
Sujeto	1201	AGTGTCTGCAATTGCCAGGAACACACAAATCATCATCAAGAAGAATCTGGGATTCCCAA	1260
Búsqueda	1261	GTGGCCGATCCCTGGGGAGGCTCTTACATGATGGAGTGCCTGACAAACGACGTGTATGAT	1320
Sujeto	1261	GTGGCTGATCCTTGGGGAGGTTCTTACATGATGGAATGTCTCACAAATGATGTTTATGAT	1320
Búsqueda	1321	GCTGCAC TGAAGCTGATTAATGAAATCGAGGAAATGGGGGAATGGCAAAGCCGTGGCT	1380
Sujeto	1321	GCTGCTTTAAAGCTCATTAATGAAATGGAAGAAATGGGTGGAATGGCCAAAGCTGTAGCT	1380
Búsqueda	1381	GAGGGCATTCCAAACTGAGGATCGAGGAATGTGCAGCTAGGCGCCAGGCACGAATTGAC	1440
Sujeto	1381	GAGGGAATACCTAAACTTCGAATTGAAGAAATGTGCTGCCGGAAGACAAGCTAGAAATAGAT	1440
Búsqueda	1441	TCAGGAAGCGAAGTGATCGTCCGGGTGAATAAGTACCAGCTGGAGAAAGAAGACGCAGTC	1500
Sujeto	1441	TCTGGTTCTGAAGTAATTGTTGGAGTAAATAAGTACCAGTTGGAAAAAGAAGACGCTGTA	1500
Búsqueda	1501	GAAGTGTGGCCATCGATAACACAAGCGTGCAGCAATCGACAGATTGAGAAGCTGAAGAAA	1560
Sujeto	1501	GAAGTTCTGGCAATTGATAATACTTCAGTGCGAARACAGGCAGATTGAAAAACTTAAGAAG	1560
Búsqueda	1561	ATCAAAAGCTCCCGGATCAGGCACTGGCCGAACGATGCCTGGCAGCCCTGACTGAGTGT	1620
Sujeto	1561	ATCAAAATCCAGCAGGGATCAAGCTTTGGCTGAACGTTGTCTTGTCTGCACTAACCGAATGT	1620
Búsqueda	1621	GCTGCAAGCGGGGACGAAACATTCTGGCTCTGGCAGTGCATGCCTCCCGGGCTAGATGC	1680
Sujeto	1621	GCTGCTAGCGGAGATGGAATACTCTGGCTCTTGCAGTGGATGCATCTCGGGCAAGATGT	1680

Figura 5

ATG	CTG	AGA	GCC	AAA	AAC	CAG	CTG	TTC	CTG	CTG	AGC	CCC	CAC
M	L	R	A	K	N	Q	L	F	L	L	S	P	H
TAT	CTG	AGA	CAG	GTC	AAA	GAA	AGT	TCC	GGG	AGT	AGA	CTG	ATC
Y	L	R	Q ¹	V	K	E	S	S	G	S	R	L	I
CAG	CAG	AGA	CTG	CTG	CAC	CAG	CAG	CAG	CCA	CTG	CAT	CCT	GAG
Q	Q	R	L	L	H	Q	Q	Q	P	L	H	P	E
TGG	GCC	GCT	CTG	GCC	AAG	AAA	CAG	CTG	AAG	GGC	AAA	AAC	CCA
W	A	A	L	A	K	K	Q ¹	L	K	G	K	N	P
GAA	GAC	CTG	ATC	TGG	CAC	ACT	CCA	GAG	GGG	ATT	TCA	ATC	AAG
E	D	L	I	W	H	T	P	E	G	I	S	I ¹	K
CCC	CTG	TAC	AGC	AAA	AGG	GAC	ACT	ATG	GAT	CTG	CCA	GAG	GAA
P	L	Y	S	K	R	D	T	M	D	L ¹	P	E	E
CTG	CCA	GGA	GIG	AAG	CCT	TTC	ACC	CGC	GGA	CCT	TAC	CCA	ACT
L	P	G	V	K	P	F	T	R	G	P ¹	Y	P	T
ATG	TAT	ACC	TTT	CGA	CCC	TGG	ACA	ATT	CGG	CAG	TAC	GCC	GGC
M	Y	T	F	R	P	W	T	I	R	Q ¹	Y	A	G
TTC	AGT	ACT	GIG	GAG	GAA	TCA	AAC	AAG	TTT	TAT	AAG	GAC	AAC
F	S	T	V	E	E	S	N	K	F ¹	Y	K	D	N
ATC	AAG	GCT	GGA	CAG	CAG	GGC	CTG	AGT	GIG	GCA	TTC	GAT	CTG
I	K	A	G	Q ¹	Q	G	L	S	V	A	F	D	L
GCC	ACA	CAT	CGC	GGC	TAT	GAC	TCA	GAT	AAT	CCC	AGA	GTC	AGG
A	T	H	R	G	Y	D	S	D	N	P	R	V	R
GGG	GAC	GIG	GGA	ATG	GCA	GGA	GTC	GCT	ATC	GAC	ACA	GTG	GAA
G	D	V	G	M	A	G	V	A	I	D	T	V	E
GAT	ACT	AAG	ATT	CTG	TTC	GAT	GGA	ATC	CCT	CTG	GAG	AAA	ATG
D	T	K	I	L	F	D	G	I	P	L	E	K	M

Figura 5 (continuación)

TCT	GTG	AGT	ATG	ACA	ATG	AAC	GGC	GCT	GTC	ATT	CCC	GTG	CTG
S	V	S	1 M	T	M	1 N	G	A	V	I	P	V	L
GCA	AAC	TTC	ATC	GTC	ACT	GGC	GAG	GAA	CAG	1 GGG	GTG	CCT	AAG
A	N	F	I	V	T	G	E	E	Q	G	V	P	K
GAA	1 AAA	CTG	ACC	GGC	ACA	ATT	CAG	AAC	GAC	ATC	CTG	AAG	GAG
E	K	L	T	G	T	I	Q	N	D	I	L	K	E
TTC	ATG	GTG	CGG	AAT	ACT	TAC	ATT	TTT	CCC	CCT	GAA	1 CCA	TCC
F	M	V	R	N	T	Y	I	F	P	P	E	P	S
ATG	AAA	1 ATC	ATT	GCC	GAT	ATC	TTC	GAG	TAC	ACC	GCT	AAG	1 CAC
M	K	I	I	A	D	I	F	E	Y	T	A	K	H
ATG	CCC	AAG	TTC	AAC	TCA	ATT	AGC	1 ATC	TCC	GGG	TAT	CAT	ATG
M	P	K	F	N	S	I	S	I	S	G	Y	H	M
CAG	GAA	GCA	GGA	GCC	GAC	GCT	ATT	CTG	GAG	CTG	GCT	1 TAC	ACC
Q	E	A	G	A	D	A	I	L	E	L	A	Y	T
CTG	GCA	GAT	GGC	CTG	GAA	TAT	TCT	CGA	ACC	GGA	CTG	1 CAG	GCA
L	A	D	G	L	E	Y	S	R	T	G	L	Q	A
GGC	CTG	ACA	AIC	GAC	GAG	TTC	GCT	CCT	AGA	CTG	AGT	TTC	TTT
G	L	T	I	D	E	F	A	P	R	L	S	F	F
TGG	GGA	ATT	GGC	ATG	AAC	TTT	TAC	ATG	GAG	ATC	GCC	AAG	ATG
W	G	I	G	M	N	F	Y	M	E	I	A	K	M
AGG	GCT	GGC	CGG	AGA	CTG	TGG	GCA	CAC	CTG	ATC	GAG	AAG	1 ATG
R	A	G	R	R	L	W	A	H	L	I	E	K	M
TTC	CAG	CCT	AAG	AAC	TCT	AAG	AGT	CTG	1 CTG	CTG	CGG	GCC	CAT
F	Q	P	K	N	S	K	S	L	L	L	R	A	H
TGC	CAG	ACA	TCC	GGC	TGG	TCT	CTG	ACT	GAA	CAG	GAC	CCA	TAT
C	Q	T	S	G	W	S	L	T	E	Q	D	P	Y

Figura 5 (continuación)

AAC	AAT	ATT	GTC	AGA	ACC	GCA	ATC	GAG	GCA	ATG	GCA	GCC	GTG
N	N	I	V	R	1 T	A	1 I	E	A	1 M	A	A	V
TTC	GGA	GGA	ACC	CAG	AGC	CTG	CAC	ACA	AAC	TCC	TTT	GAT	GAG
F	G	G	T	Q	S	L	H	T	N	S	F	D	E
GCC	CTG	GGG	CTG	CCT	ACC	GTG	AAG	TCT	GCT	AGG	ATT	GCA	CGC
A	L	G	L	P	T	V	K	S	1 A	R	I	A	R
AAT	ACA	CAG	ATC	ATT	ATC	CAG	GAG	GAA	TCC	GGA	ATC	CCA	AAG
N	T	Q	I	I	I	Q	E	E	S	G	I	P	K
GTG	GCC	GAT	CCC	TGG	GGA	GGC	TCT	TAC	ATG	ATG	GAG	TGC	CTG
V	A	D	1 P	W	G	G	S	Y	M	M	E	1 C	L
ACA	AAC	GAC	GTG	TAT	GAT	GCT	GCA	CTG	AAG	CTG	ATT	AAT	GAA
1 T	N	D	V	Y	D	A	A	L	K	L	I	N	E
ATC	GAG	GAA	ATG	GGG	GGA	ATG	CCA	AAG	GCC	GTG	GCT	GAG	GGC
I	E	E	M	G	G	M	A	K	A	V	A	E	G
ATT	CCA	AAA	CTG	AGG	ATC	GAG	GAA	TGT	GCA	GCT	AGG	CGC	CAG
I	P	K	L	1 R	1 I	E	E	C	A	1 A	1 R	R	Q
GCA	CGA	ATT	GAC	TCA	GGA	AGC	GAA	GTG	ATC	GTC	GGG	GTG	AAT
A	R	I	D	S	G	S	E	V	I	V	G	V	N
AAG	TAC	CAG	CTG	GAG	AAA	GAA	GAC	GCA	GTC	GAA	GTG	CTG	GCC
K	Y	Q	L	E	K	E	1 D	1 A	V	E	V	L	1 A
ATC	GAT	AAC	ACA	AGC	GTG	CGC	AAT	CGA	CAG	ATT	GAG	AAG	CTG
I	D	N	T	S	V	R	N	R	Q	I	E	K	L
AAG	AAA	ATC	AAA	AGC	TCC	CGC	GAT	CAG	GCA	CTG	GCC	GAA	CGA
K	1 K	I	1 K	S	2 S	R	D	Q	A	L	A	E	1 R
TGC	CTG	GCA	GCC	CTG	ACT	GAG	TGT	GCT	GCA	AGC	GGG	GAC	GGA
1 C	L	A	1 A	L	T	E	C	A	A	1 S	1 G	D	G

Figura 5 (continuación)

AAC	ATT	CTG	GCT	CTG	GCA	GTC	GAT	GCC	TCC	CGG	GCT	AGA	TGC
N	I	L	A	L	A	V	D	A	S	R	A	R	C
ACT	GTG	GGG	GAA	ATC	ACC	GAC	GCC	CTG	AAG	AAA	GTC	TTC	GGA
T	V	G	E	I	T	D	A	L	K	K	V	F	G
GAG	CAC	AAG	GCC	AAT	GAT	CGG	ATG	GTG	AGC	GGC	GCT	TAT	AGA
E	H	K	A	N	D	R	M	V	S	G	A	Y	R
CAG	GAG	TTC	GGG	GAA	TCT	AAA	GAG	ATT	ACC	AGT	GCC	ATC	AAG
Q	E	F	G	E	S	K	E	I	T	S	A	I	K
AGG	GTG	CAC	AAG	TTC	ATG	GAG	AGA	GAA	GGG	CGA	CGG	CCC	AGG
R	V	H	K	F	M	E	R	E	G	R	R	P	R
CTG	CTG	GIG	GCA	AAG	ATG	GGA	CAG	GAC	GGA	CAT	GAT	CGC	GGA
L	L	V	A	K	M	G	Q	D	G	H	D	R	G
GCA	AAA	GTC	ATT	GCC	ACC	GGG	TTC	GCT	GAC	CTG	GGA	TTT	GAC
A	K	V	I	A	T	G	F	A	D	L	G	F	D
GTG	GAT	ATC	GGC	CCT	CTG	TTC	CAG	ACA	CCA	CGA	GAG	GTC	GCA
V	D	I	G	P	L	F	Q	T	P	R	E	V	A
CAG	CAG	GCA	GTC	GAC	GCT	GAT	GTG	CAC	GCA	GTC	GGA	GTG	TCC
Q	Q	A	V	D	A	D	V	H	A	V	G	V	S
ACT	CTG	GCA	GCT	GGC	CAI	AAG	ACC	CTG	GTG	CCT	GAA	CTG	ATC
T	L	A	A	G	H	K	T	L	V	P	E	L	I
AAA	GAG	CTG	AAC	TCT	CTG	GGC	AGA	CCA	GAC	ATC	CTG	GTC	ATG
K	E	L	N	S	L	G	R	P	D	I	L	V	M
TGC	GGC	GGC	GIG	ATC	CCA	CCC	CAG	GAT	TAC	GAA	TTC	CTG	TTT
C	G	G	V	I	P	P	Q	D	Y	E	F	L	F
GAG	GTC	GGG	GIG	AGC	AAC	GIG	TTC	GGA	CCA	GGA	ACC	AGG	ATC
E	V	G	V	S	N	V	F	G	P	G	T	R	I

Figura: 5 (continuación)

CCT	AAG	GCC	GCA	GTG	CAG	GTC	CTG	GAT	GAT	ATT	GAA	AAG	TGT
P	K	A	A	V	Q	V	L	D	D	I	E	K	C
			2								1		
CTG	GAA	AAG	AAA	CAG	CAG	TCA	GTG	TAA					
L	E	K	K	Q	Q	S	V						

Figura 6

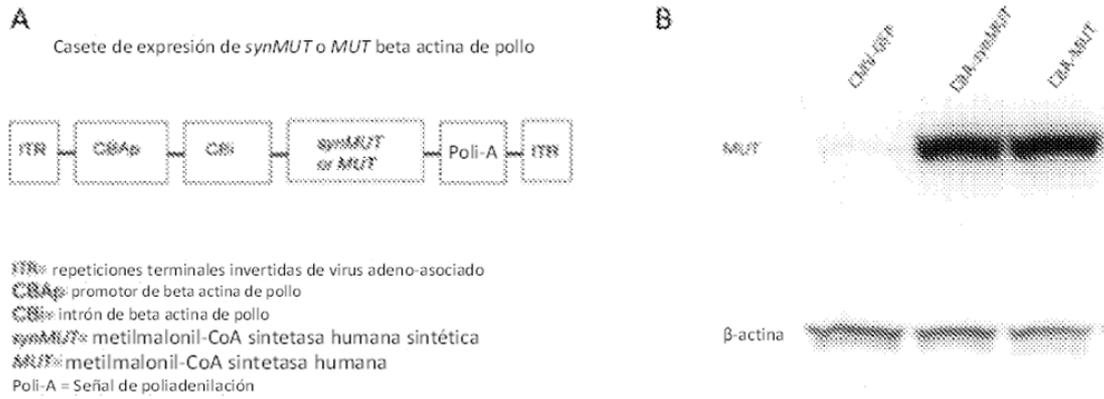


Figura 7

Casete de expresión *synMUT* de virus adeno-asociado



ITR= repeticiones terminales invertidas de virus adeno-asociado

HCR= región de control hepático

hAAT= promotor de alfa-anti-tripsina humano (expresión hepática específica)

***synMUT*= metilmalonil-CoA sintetasa humana sintética**

Poli-A = Señal de poliadenilación

Figura 8

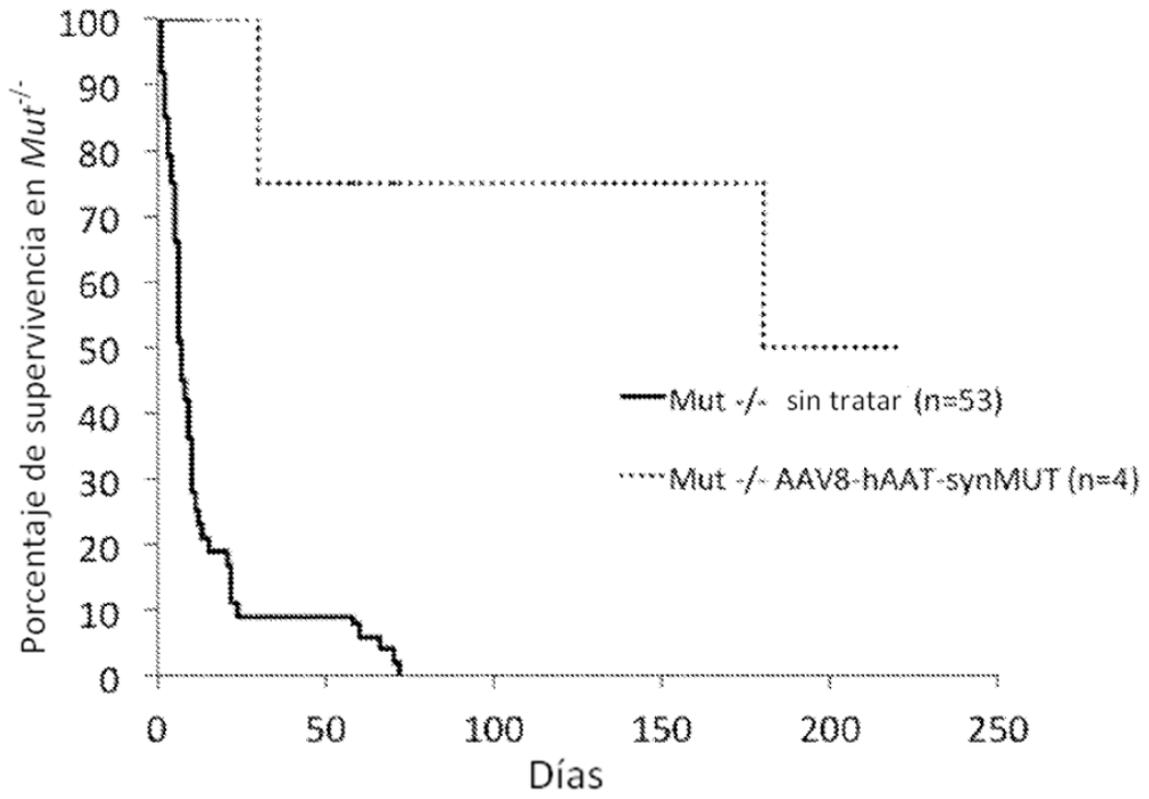


Figura 9

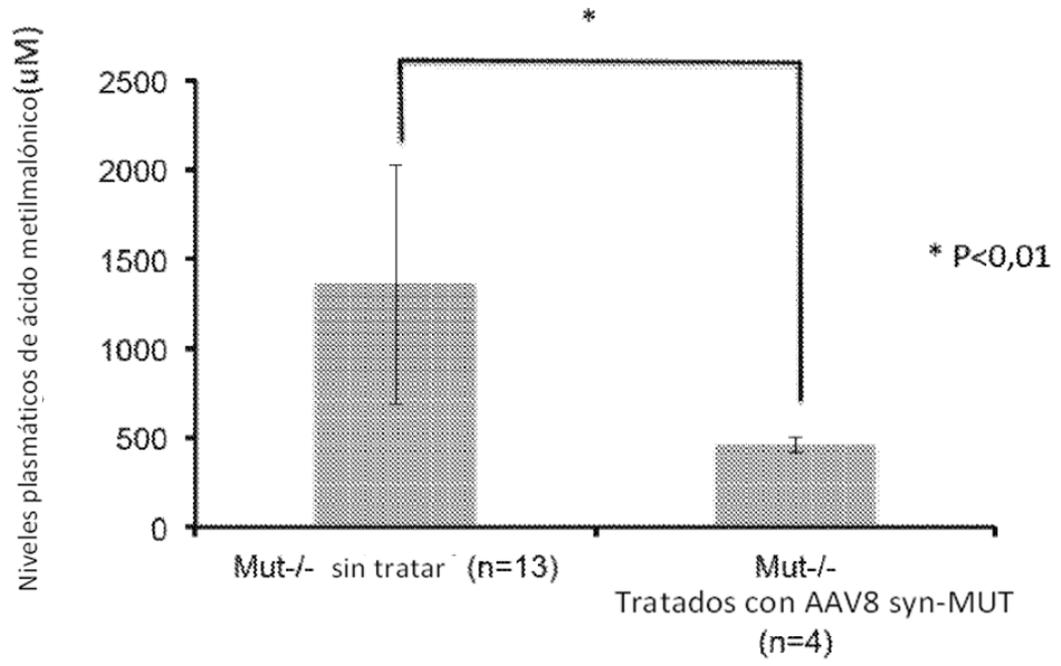


Figura 10

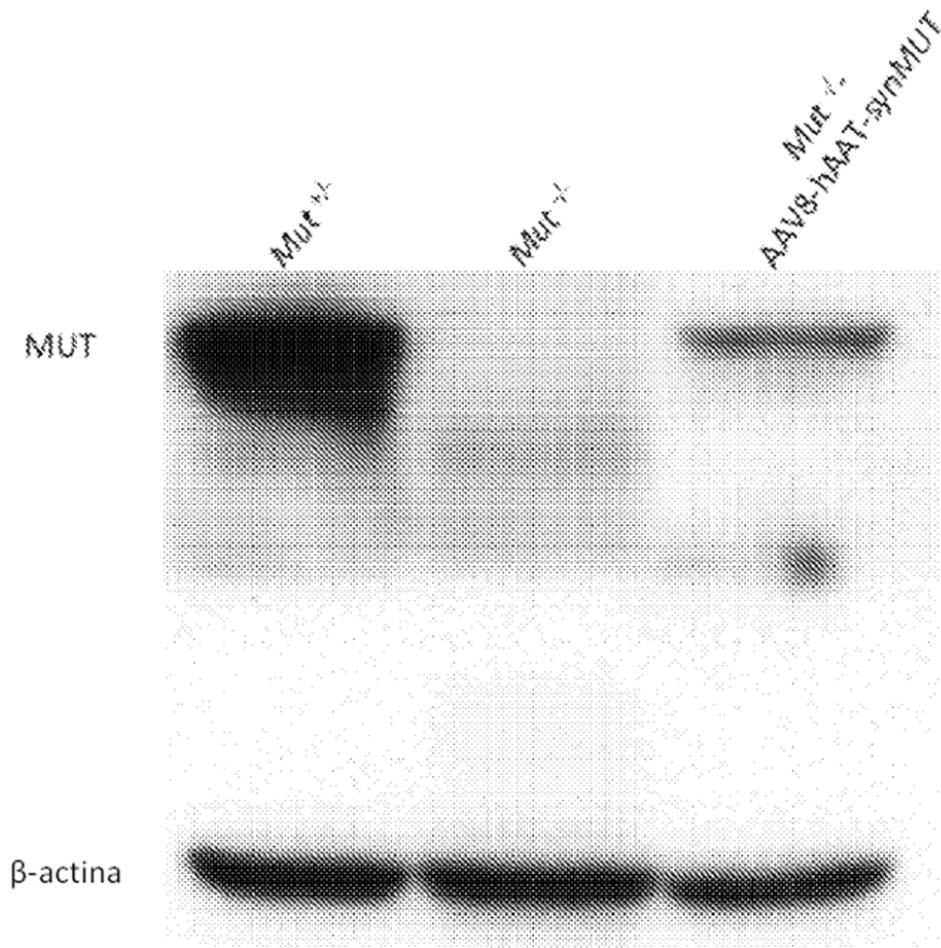


Figura 11

