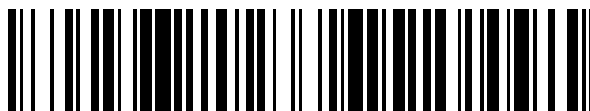


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 680**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 7/01** (2006.01)  
**C12N 15/33** (2006.01)  
**A61K 35/76** (2015.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C12N 15/67** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012 PCT/US2012/034446**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12145624**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12774597 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2699680**

54 Título: **Composiciones basadas en VAAr y métodos para tratar deficiencias de alfa-1 anti-tripsina**

30 Prioridad:

**21.04.2011 US 201161477671 P**

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

**03.04.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS (100.0%)  
One Beacon Street 31st Floor  
Boston, MA 02108, US**

72 Inventor/es:

**FLOTTE, TERENCE;  
MUELLER, CHRISTIAN y  
ZAMORE, PHILLIP DAVID**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 661 680 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

Composiciones basadas en VAAr y métodos para tratar deficiencias de alfa-1 anti-tripsina

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a vectores basados en VAAr y composiciones útiles para tratar enfermedades genéticas.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Numerosas enfermedades están asociadas a mutaciones heredadas o somáticas. En muchos casos, estas mutaciones están presentes en las regiones de transcritos de genes, cuyos productos controlan importantes funciones fisiológicas que incluyen, por ejemplo, la expresión génica, la señalización celular, la estructura de tejidos, y el metabolismo y catabolismo de diversas biomoléculas. Las mutaciones en estos genes, que son a menudo  
15 únicamente cambios en un único nucleótido (por ejemplo, mutaciones interruptoras, mutaciones de aminoácido), pueden tener efectos negativos sobre la expresión, estabilidad y/o función del producto génico resultantes en alteraciones en una o más funciones fisiológicas.

20 Se han identificado numerosas mutaciones diferentes en el gen de la alfa-1 antitripsina (AAT). AAT es una de las anti-proteasas séricas primarias en circulación en seres humanos. AAT inhibe varias serina proteinasas, siendo una de las neutrófilo elastasas fisiológicamente más importantes, así como la inhibición de numerosas metaloproteinasa y otras moléculas proinflamatorias y proapoptóticas. AAT se produce normalmente en hepatocitos y macrófagos, donde las AAT derivadas de hepatocitos forman el volumen de la reserva fisiológica de AAT.

25 Aproximadamente un 4 % de las poblaciones de Norteamérica y Europa del Norte poseen al menos una copia de un alelo mutante, conocido como Pi\*Z (Z-AAT) que es el resultado de una única sustitución del aminoácido lisina por glutamato en la posición 342 en la proteína madura (posición 366 en la proteína precursora). En el estado homocigótico, esta mutación conduce a una grave deficiencia de AAT, y puede dar como resultado dos estados  
30 patológicos distintos: una enfermedad pulmonar que es principalmente debida a la pérdida de la función antiproteasa, y una enfermedad hepática (presente en un grado significativo en aproximadamente un 10-15 % de pacientes) debida a una ganancia tóxica de la función de la proteína mutante Z-AAT.

35 Se han desarrollado productos clínicos de investigación de terapia génica para el aumento del gen de la AAT como potenciales tratamientos para la enfermedad pulmonar utilizando vectores víricos adenoasociados recombinantes (VAAr). Los investigadores han aplicado también tecnologías genéticas en un esfuerzo para regular por defecto los niveles del ARNm de AAT. Una solución fue utilizar ribozimas de tipo cabeza de martillo diseñadas para escindir el ARNm de AAT en un sitio específico. Otra solución implica el uso de la interferencia del ARN para disminuir los niveles del transcrito de ARNm mutante.

40 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a la materia sujeto como se define en las reivindicaciones 1, 14 y 15. Se consiguen ventajas adicionales en las realizaciones indicadas mediante las reivindicaciones dependientes.

45 Se divulgan en el presente documento métodos mejorados basados en terapia génica para el tratamiento de enfermedades genéticas. Se divulgan también en el presente documento composiciones mejoradas mediante terapia génica y la metodología relacionada para tratar enfermedades pulmonares y/o enfermedades hepáticas utilizando los vectores víricos adenoasociados recombinantes. En algunas realizaciones, los métodos utilizan vectores basados en VAAr (por ejemplo, VAAr9, VAAr2, VAAr1) para aumentar la expresión de AAT. En algunas realizaciones, se  
50 proporcionan composiciones y métodos para disminuir la expresión de la proteína Pi\*Z mutante de AAT. En dichas realizaciones, las composiciones y métodos son útiles para detener y/o mejorar el daño hepatocelular y otro daño a tejidos asociados a la AAT mutante.

55 De acuerdo con algunos aspectos de la invención, las composiciones son útiles para inactivar la proteína PiZ aumentando al mismo tiempo los niveles de la proteína M-AAT (la proteína AAT natural). En algunas realizaciones, se proporciona un vector no tóxico de doble función que es capaz de inactivar Z-AAT aumentando a la vez M-AAT. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporcionan métodos y composiciones para la expresión a largo plazo de ARNm terapéuticos que utilizan la plataforma del virus adenoasociado recombinante (VAAr). En algunas realizaciones, las composiciones y los métodos terapéuticos descritos en el presente documento se aprovechan de  
60 la ruta del miARN alterando la secuencia de siembra de los miARN naturales para dirigirse al gen AAT endógeno. En algunas realizaciones, los métodos son más seguros y menos tóxicos que las soluciones basadas en ARNhC.

65 Se divulgan también en el presente documento, composiciones basadas en VAAr y se proporcionan métodos que dirigen simultáneamente agentes de silenciamiento hacia el hígado para disminuir la expresión de Z-AAT y dirigir el aumento de genes a otros sitios. Sin embargo, en algunas realizaciones, el hígado es un tejido diana óptimo para el aumento. En algunas realizaciones, se proporciona una solución basada en un miARN para regular por defecto de

manera estable Z-AAT en hepatocitos. En algunas realizaciones, la solución permite el aumento simultáneo de genes M-AAT a partir del mismo vector de administración del gen de VAAr sin perturbación grave del perfil del miARN hepático global. En algunas realizaciones, el vector específico utilizado es un vector derivado de la cápsida de VAAr9 administrado sistémicamente. Se divulga también en el presente documento, que esta solución tiene una amplia utilidad en trastornos genéticos que se originan a partir de mutaciones dominantes negativas y mutaciones de ganancia de funciones así como para administrar miARN artificiales junto con genes terapéuticos.

Se divulga también en el presente documento, ácidos nucleicos aislados proporcionados. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados comprenden (a) una primera región que codifica uno o más primeros miARN que comprenden un ácido nucleico que tiene suficientes secuencias complementarias con un ARNm endógeno de un sujeto para hibridarse e inhibir la expresión del ARNm endógeno, en el que el ARNm endógeno codifica una primera proteína; y (b) una segunda región que codifica un ARNm exógeno que codifica una segunda proteína, en el que la segunda proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la primera proteína, en el que el uno o más primeros miARN no comprenden un ácido nucleico que tiene suficientes secuencias complementarias para hibridarse e inhibir la expresión del ARNm exógeno, y en el que la segunda región se sitúa en una parte sin traducir de la segunda región. En algunas realizaciones, la parte sin traducir es un intrón. Se divulga también en el presente documento, que la primera región está entre el primer codón del ARNm exógeno y 1000 nucleótidos en la dirección 5' del primer codón.

Se divulgan también en el presente documento, los ácidos nucleicos aislados que comprenden (a) una primera región que codifica uno o más primeros miARN que comprende un ácido nucleico que tiene suficientes secuencias complementarias con un ARNm endógeno de un sujeto para hibridarse e inhibir la expresión del ARNm endógeno, en el que el ARNm endógeno codifica una primera proteína; y (b) una segunda región que codifica un ARNm exógeno que codifica una segunda proteína, en el que la segunda proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la primera proteína, en el que el uno o más primeros miARN no comprenden un ácido nucleico que tiene suficientes secuencias complementarias para hibridarse e inhibir la expresión del ARNm exógeno, y en el que la primera región se sitúa en la dirección 3' de una parte de la segunda región que codifica la cola poliA del ARNm exógeno.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados comprenden además una tercera región que codifica uno o más segundos miARN que comprenden un ácido nucleico que tiene suficientes secuencias complementarias para hibridarse e inhibir la expresión del ARNm endógeno, en el que la tercera región se sitúa en una parte no traducida de la segunda región. En algunas realizaciones, la parte sin traducir es un intrón. En algunas realizaciones, la primera región está entre el último codón del ARNm exógeno y una posición de 1000 nucleótidos en la dirección 3' del último codón. En algunas realizaciones, la tercera región está entre el primer codón del ARNm exógeno y una posición de 1000 nucleótidos en la dirección 5' del primer codón.

En algunas realizaciones de los ácidos nucleicos aislados, la primera región codifica dos primeros miARN. En algunas realizaciones, la primera región codifica tres primeros miARN. En algunas realizaciones, la tercera región codifica tres segundos miARN. En algunas realizaciones, uno o más de los primeros miARN tienen la misma secuencia de ácido nucleico que una o más de los segundos miARN. En algunas realizaciones, cada uno de los primeros miARN tiene la misma secuencia de ácidos nucleicos que uno de los segundos miARN. En algunas realizaciones, la segunda proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la primera proteína. En algunas realizaciones, la segunda proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la primera proteína. En algunas realizaciones, la segunda proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98 % idéntica a la primera proteína. En algunas realizaciones, la segunda proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a la primera proteína. En algunas realizaciones, la segunda proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 100 % idéntica a la primera proteína.

En algunas realizaciones de los ácidos nucleicos aislados, la primera proteína es una proteína alfa 1-antitripsina (AAT). En algunas realizaciones, la proteína AAT es una proteína AAT humana. En algunas realizaciones, la proteína AAT tiene una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 2 o una o más mutaciones de la misma como se identifica en la Tabla 1, por ejemplo, la SEQ ID NO: 3 o 4. En algunas realizaciones, el primer ARNm comprende un ácido nucleico codificado por una secuencia que se muestra en las SEQ ID NOS: 5-16. En algunas realizaciones, el uno o más miARN tiene una secuencia de ácido nucleico codificada por una secuencia procedente del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 17-19 y 21-23. En algunas realizaciones de los ácidos nucleicos aislados, el ARNm exógeno tiene una o más mutaciones silenciosas en comparación con el ARNm endógeno. En algunas realizaciones, el ARNm exógeno tiene una secuencia de ácido nucleico codificada por una secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 20.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados comprenden además repeticiones terminales invertidas (RTI) de unos serotipos de VAA seleccionados entre el grupo que consiste en: VAA1, VAA2, VAA5, VAA6, VAA6.2, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11 y variantes de los mismos. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados comprenden además un promotor unido operativamente con la(s) región(es) que codifican el uno o más primeros miARN, el ARNm exógeno, y/o el uno o más segundos miARN. En determinadas realizaciones, el promotor es un

promotor específico de tejido. En determinadas realizaciones, el promotor es un promotor de la  $\beta$ -actina.

Se divulgan también en el presente documento, los virus adenoasociados recombinantes (VAA) proporcionados que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos aislados divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, los VAA recombinantes comprenden una o más proteínas de la cápsida de uno o más serotipos de VAA seleccionados entre el grupo que consiste en: VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11 y variantes de los mismos.

Se divulgan también en el presente documento, las composiciones proporcionadas que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos aislados divulgados en el presente documento. Se divulgan también en el presente documento, las composiciones proporcionadas que comprenden cualquiera de los VAA recombinantes divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden además un transportador farmacéuticamente aceptable.

Se divulgan también en el presente documento, los kits proporcionados que comprende uno o más recipientes que alojan una composición, un ácido nucleico aislado o un VAAr divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, los kits comprenden además instrucciones escritas para administrar un VAAr a un sujeto.

Se divulgan también en el presente documento, los métodos proporcionados para expresar la proteína alfa 1-antitripsina (AAT). En algunas realizaciones, los métodos comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquier virus adenoasociado recombinante (VAAr) divulgado en el presente documento. En algunas realizaciones, el VAAr se administra con un transportador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones de los métodos, el sujeto tiene o se sospecha que tiene una deficiencia de alfa 1-antitripsina. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una mutación en un gen AAT. En determinadas realizaciones, la mutación codifica una proteína AAT mutante. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además determinar que el sujeto tiene la mutación. En determinadas realizaciones, la mutación es una mutación relacionada en la Tabla 1. En determinadas realizaciones, la mutación es una mutación de aminoácido. En determinadas realizaciones, la mutación da como resultado una sustitución de glutamato a lisina en la posición 366 del aminoácido de acuerdo con la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 3. En determinadas realizaciones, la proteína AAT mutante fracasa en plegarse adecuadamente.

En algunas realizaciones de los métodos, la cantidad eficaz de VAAr el período es de  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ , o  $10^{13}$  copias de genoma. En algunas realizaciones, la administración se lleva a cabo por vía intravascular, intravenosa, intratecal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o intranasal. En determinadas realizaciones, la administración se lleva a cabo mediante inyección en la vena porta hepática.

En algunas realizaciones de los métodos, la administración se lleva a cabo *ex vivo* aislando células o tejido de un sujeto, poniendo en contacto la célula o tejido con una cantidad eficaz de un VAAr, produciendo por tanto células o tejidos, y administrando las células o los tejidos al sujeto. En determinadas realizaciones, el tejido es tejido adiposo. En determinadas realizaciones, las células son citoblastos derivados de tejido adiposo. En algunas realizaciones, se lleva a cabo la administración de células transfectadas por vía intravascular, intravenosa, intratecal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o intranasal. En determinadas realizaciones, se lleva a cabo la administración de células transfectadas mediante el trasplante de células transfectadas en un tejido diana. En determinadas realizaciones, el tejido diana es pulmón o hígado.

En algunas realizaciones de los métodos, el sujeto es un ratón, una rata, un conejo, un perro, un gato, una oveja, un cerdo, un primate no humano o un ser humano. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

En algunas realizaciones de los métodos, tras la administración del VAAr, se determina el nivel de expresión de la primera proteína en el sujeto. En algunas realizaciones, tras la administración del VAAr, se determina el nivel de expresión de la segunda proteína en el sujeto. En algunas realizaciones, se lleva a cabo la administración en dos o más ocasiones. En determinadas realizaciones, se determina el nivel de la primera proteína y/o el nivel de la segunda proteína en el sujeto después de al menos una administración.

En algunas realizaciones de los métodos, el nivel en suero de la primera proteína en el sujeto se reduce en al menos un 85 % tras la administración del VAAr. En algunas realizaciones, el nivel en suero de la primera proteína en el sujeto se reduce en al menos un 90 % tras la administración del VAAr. En algunas realizaciones, el nivel en suero de la primera proteína en el sujeto se reduce en al menos un 95 % tras la administración del VAAr. En algunas realizaciones, el nivel en suero de la primera proteína en el sujeto se reduce en al menos un 85 % en 2 semanas tras la administración del VAAr. En algunas realizaciones, el nivel en suero de la primera proteína en el sujeto se reduce en al menos un 90 % en 2 semanas tras la administración del VAAr. En algunas realizaciones, el nivel en suero de la primera proteína en el sujeto se reduce en al menos un 85 % en 4 semanas de administración del VAAr. En algunas realizaciones, tras 7 semanas de administración del VAAr, el nivel en suero de la primera proteína está a un nivel de al menos un 50 % en comparación con el nivel en sueros de la primera proteína antes de la administración del VAAr. En algunas realizaciones, tras 7 semanas de administración del VAAr, el nivel en suero de la primera proteína está a

un nivel de al menos un 75 % en comparación con el nivel en sueros de la primera proteína antes de la administración del VAAr.

En algunas realizaciones de los métodos, tras la administración del VAAr se evalúa al menos un parámetro del resultado clínico asociado a la deficiencia de AAT en el sujeto. En algunas realizaciones, el al menos un parámetro del resultado clínico evaluado tras la administración del VAAr se compara con el al menos un parámetro del resultado clínico determinado antes de la administración del VAAr para determinar la eficacia del VAAr, en el que al menos una mejora en el parámetro del resultado clínico tras la administración del VAAr indica la eficacia del VAAr. En algunas realizaciones, el parámetro del resultado clínico se selecciona entre el grupo que consiste en: niveles en suero de la primera proteína, niveles en suero de la segunda proteína, presencia de glóbulos de AAT intracelulares, presencia de foci inflamatorios, capacidad respiratoria, capacidad de toser, producción de flema, frecuencia de resfriado de pecho o neumonía, y tolerancia para el ejercicio. En algunas realizaciones, se evalúan los glóbulos de AAT intracelulares o los foci inflamatorios en tejido pulmonar o tejido hepático.

## 15 Breve descripción de los dibujos

**Figura 1** Comparación de ARNh<sub>c</sub> y miARN mediados por inactivación de AAT humana. Se transfectaron simultáneamente células HEK-293 con el plásmido Z-AAT humano y cualquier de un plásmido que expresa 3 ARNh<sub>c</sub> anti-AAT de un promotor U6 o un plásmido que expresa 3 miARN anti-AAT de un promotor híbrido de la beta actina de pollo. (a) Se recogieron los medios de cultivo a las 24, 48 y 72 horas y se analizaron para la concentración de AAT mediante ELISA. (b) A las 72 horas se recogieron y se lisaron para la concentración de AAT mediante ELISA. \* $<0,05$  como se determinó mediante un test de la t de student bilateral sin emparejar.

**Figura 2** silenciamiento *in vivo* AAT humano mediante los miARN expresados por VAAr9. Se inyectaron ratones transgénicos que expresaban el alelo PiZ humano con  $5 \times 10^{11}$  partículas de vector o VAAr9 que expresaba los miARN frente AAT bajo el control del promotor híbrido de la beta-actina de pollo mediante la vena de la cola. Se recogieron los sueros de cada cohorte semanalmente y se utilizaron para evaluar la concentración de Z-AAT mediante ELISA. Se expresaron los datos como promedios de grupo + SEM (n=6).

**Figura 3** Histología del hígado de ratones transgénicos PiZ 5 semanas después de la administración de VAAr9. Los hígados de ratones que recibieron vectores VAAr9 con controles de miARN y GFP se fijaron con formalina y se tiñeron para la AAT o con un ensayo PAS-D. Las secciones de hígados de ratones se tiñeron utilizando un anticuerpo dirigido contra AAT humana de un ratón tratado con (a) 3XmiR *intrínscico* (b) controles de GFP. Secciones de hígado de ratón se tiñeron con un ensayo de ácido de Schiff periódico resistente a diastasa procedente (e y f) de 3XmiR *intrínscicos* o (c y d) controles de GFP. (g) Se llevó a cabo el análisis cuantitativo de imágenes pixeladas de secciones de hígado completas comparando los recuentos de píxeles de los glóbulos positivos para PASD en controles GFP (N=7) con los recuentos de píxeles de los glóbulos positivos para PASN en 3XmiR (N=7) *intrínscicos*.

**Figura 4** Optimización *In vivo* de la administración de miARN de anti-AAT en vectores VAAr9. Se inyectaron ratones transgénicos que expresaban el alelo PiZ humano con  $5 \times 10^{11}$  partículas de vector o VAAr9 que expresaba los miARN frente AAT bajo el control del promotor híbrido de la beta-actina de pollo mediante la vena de la cola. Se recogieron los sueros de cada cohorte semanalmente y se utilizaron para evaluar la concentración de Z-AAT mediante ELISA.

**Figura 5** RT-PCR cuantitativa para miARN artificial *in vivo*. Se utilizó el ARN total de hígados de ratón para evaluar la presencia de 3 miARN artificiales anti-AAT procedentes de ratones que recibieron vectores de miARN-VAAr9. \* $<0,05$  como se determinó mediante un test de la t de student bilateral sin emparejar.

**Figura 6** silenciamiento a largo plazo *in vivo* de AAT humano mediante los miARN expresados por VAAr9. Se inyectaron ratones transgénicos que expresaban el alelo PiZ humano con  $1 \times 10^{12}$  partículas de vector o VAAr9 que expresaba los miARN frente a AAT bajo el control del promotor híbrido de la beta-actina de pollo mediante la vena de la cola. (a) Se recogieron los sueros de cada cohorte semanalmente y se utilizaron para evaluar la concentración de Z-AAT mediante ELISA. (b) se analizaron las AAT procedentes de los lisados de hígados de ratones mediante inmunotransferencia tras la separación monomérica y polimérica. Las Z-AAT de 52 kDa procedían de los hígados procesados y separados en un combinado de monómeros y polímeros. Se llevó a cabo el análisis densitométrico de los combinados (c) monoméricos y (d) poliméricos utilizando el software Image J. Se utilizaron los valores iniciales de los sueros y aquellos recogidos dos semanas después de la administración de VAAr9 para analizar la función hepática como se determinó mediante la concentración de (e) ALT y (f) AST. Se expresaron los datos como promedios de grupo + SEM. \* $<0,05$  como se determinó mediante un test de la t de student bilateral sin emparejar, comparando las cohortes de VAAr9 frente al valor inicial.

**Figura 7** Evaluación *in vitro* del plásmido provírico de doble función. Se transfectaron simultáneamente células HEK-293 con el plásmido Z-AAT humano y cualquiera del plásmido *doble*-6XmiR-CB-AAT, un control de GFP o PBS. Se procesaron células para la determinación del ARN a las 72 horas y se analizaron para la determinación de (a) PiZ-ARNm o (b) PiM ARNm con la qRT-PCR. Se expresaron los datos como promedios de grupo + SEM (n=6). \* $<0,05$  como se determinó mediante un test de la t de student bilateral sin emparejar.

**Figura 8** Inactivación *in vivo* de Z-AAT con aumento simultáneo de M-AAT tras la administración del vector VAAr9 de doble función. Se inyectaron ratones transgénicos que expresaban el alelo PiZ humano con  $1 \times 10^{12}$  partículas de vector o VAAr9 que expresaba los miARN frente a AAT y un ADNc de M-AAT natural etiquetado con cMyc dirigido a de bajo el control del promotor híbrido de la beta-actina de pollo mediante la vena de la cola. (a) Se recogieron los sueros de cada cohorte semanalmente y se utilizaron para evaluar la concentración de Z-

AAT mediante ELISA específico de Z-AAT y los niveles de M-AAT mediante ELISA de CMyc. Se utilizó el ARN total de los hígados de ratones para evaluar la presencia de cualquiera de (b) ARNm de Z-AAT o (c) ARNm de M-AAT mediante qRT-PCR. Se expresaron los datos como promedios de grupo + SEM (n=6). \* <0,05 como se determinó mediante un test de la t de student bilateral sin emparejar.

**Figura 9** El miARN tiene mínimo impacto sobre los perfiles hepáticos del miARN endógeno. Se recogió ARN hepático 3 meses después de la administración de los animales inyectados con los siguientes vectores: 3XmiR-GFP *intrónico*, *PoliA*-3XmiR-GFP, *Doble*-6XmiR-GFP. Se utilizaron CB-GFP junto con la forma de ARN de ratones PiZ sin tratar y ratones C57B16 silvestres para analizar una micromatriz de miARN. Cada grupo consistió en 5 muestras de ARN de ratón y se analizó de forma independiente con una única micromatriz de color (Cy5).

### Descripción detallada de determinadas realizaciones de la invención

Se divulgan en el presente documento composiciones mejoradas mediante terapia génica y los métodos relacionados para tratar deficiencias de alfa-1 antitripsina (AAT denominado también algunas veces SERPINA1) utilizando los vectores víricos adenoasociados recombinantes (VAAR). En algunas realizaciones, se proporciona un vector no tóxico de doble función que es capaz de inactivar AAT mutante aumentando a la vez la expresión de la AAT natural. Los vectores basados en VAAR y los métodos relacionados proporcionan una expresión a largo plazo de los miARN terapéuticos y la expresión de la proteína natural. De acuerdo con otros aspectos, se proporcionan composiciones y métodos basados en VAAR que dirigen simultáneamente agentes de silenciamiento hacia el hígado para disminuir la expresión de Z-AAT y dirigir la expresión génica en otros sitios (por ejemplo, tejido pulmonar). En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones y métodos que son útiles para tratar la deficiencia de AAT inactivando la proteína PiZ (una proteína AAT mutante) aumentando al mismo tiempo a la vez los niveles de la proteína M-AAT (la proteína AAT natural). Se apreciará que las soluciones terapéuticas basadas en VAAR divulgadas en el presente documento pueden aplicarse a otros trastornos genéticos de ganancia de funciones o dominantes negativos tales como la enfermedad de Huntington, que anteriormente no han sido adecuados para una solución de terapia génica de vector único.

Determinados vectores de VAAR proporcionados en el presente documento incorporan secuencias de miARN que se dirigen al gen AAT impulsando a la vez la expresión reforzada del gen AAT natural (un gen AAT natural que no está dirigido por el miARN), consiguiendo de esta manera la inactivación simultánea de la AAT mutante, por ejemplo, en el hígado, con una expresión aumentada de la AAT natural. En un ejemplo, se inyectaron ratones transgénicos que expresan el alelo PiZ humano con los vectores del control o los vectores VAAR9 de doble función que expresan los miARN y un gen AAT reforzado con una etiqueta cMyc. En este ejemplo, los niveles de PiZ en suero se inactivaron consistentemente en un promedio del 80 % de los niveles de los valores iniciales siendo la inactivación estable y persistente durante un periodo de 13 semanas. En un ejemplo, las cohortes que recibieron los vectores de doble función presentaron la inactivación de PiZ AAT secretando a la vez niveles crecientes en suero de la AAT natural como se determinó mediante ELISA específicos de PiZ y PiM. En este ejemplo, la histología del hígado desveló una acumulación globular significativamente disminuida de PiZ AAT plegados incorrectamente en hepatocitos junto con una reducción en las infiltraciones inflamatorias cuando se compararon con los controles.

En un ejemplo, los perfiles de expresión globales del miARN del hígado fueron mínimamente afectados por los miARN artificiales administrados mediante el VAAR, mostrando solo unos pocos miARN diferencias estadísticamente significativas. En un ejemplo, se observó una diferencia en miR-1 que se redujo en los ratones PiZ transgénicos que recibieron vectores VAAR a los niveles normales que se observan en ratones B6 naturales. En un ejemplo, los niveles de miR-122 no se vieron afectados en todos los ratones que recibieron VAAR que expresaban miARN que se dirigía al gen AAT. En consecuencia, en algún ejemplo, los vectores VAAR de doble función son eficaces en la inactivación de PiZ AAT aumentando simultáneamente a la vez la AAT natural sin perturbar los perfiles hepáticos del miARN endógeno.

#### *Deficiencia de alfa-1 antitripsina*

La alfa-1 antitripsina (AAT), conocida también en la técnica como inhibidor de la serpina peptidasa, clado A (SERPINA1), es una proteína que funciona como un inhibidor de la proteinasa (proteasa). La AAT se produce principalmente en el hígado, pero funciona en los pulmones y el hígado, principalmente. Tal como se usa en el presente documento, el término, "deficiencia de alfa-1 antitripsina" se refiere a una dolencia resultante de una deficiencia de la AAT funcional en un sujeto. En algunas realizaciones, un sujeto que tiene una deficiencia de AAT produce cantidades insuficientes de alfa-1 antitripsina. En algunas realizaciones, un sujeto que tiene una deficiencia de AAT produce una AAT mutante. En algunas realizaciones, cantidades insuficientes de AAT o la expresión de AAT mutante dan como resultado un daño al pulmón y/o el hígado de un sujeto. En algunas realizaciones, la deficiencia de AAT conduce a enfisema y/o enfermedad hepática. Normalmente, las deficiencias de AAT son el resultado de uno o más defectos genéticos en el gen AAT. El uno o más defectos pueden estar presentes en una o más copias (por ejemplo, alelos) del gen AAT en un sujeto. Normalmente, Las deficiencias de AAT son más comunes entre los europeos y los norteamericanos descendientes de europeos. Sin embargo, se pueden encontrar deficiencias de AAT también en sujetos de diferentes descendientes.

Los sujetos (por ejemplo, sujetos adultos) con graves deficiencias de AAT es probable que desarrollen enfisema. El

inicio del enfisema se produce a menudo antes de los 40 años en sujetos que tienen deficiencias de AAT. El tabaquismo puede aumentar el riesgo de enfisema en sujetos que tienen deficiencias de AAT. Los síntomas de deficiencias de AAT incluyen insuficiencia respiratoria, con y sin esfuerzo, y otros síntomas comúnmente asociados a enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Otros síntomas de deficiencias de AAT incluyen síntomas de enfermedad hepática grave (por ejemplo, cirrosis), pérdida de peso no intencionada, y sibilancias. Un examen físico puede desvelar un tórax en tonel, sibilancias, o disminución de los sonidos respiratorios en un sujeto que tiene una deficiencia de AAT.

Las siguientes pruebas ilustrativas pueden ayudar con el diagnóstico de un sujeto que tiene una deficiencia de AAT: una prueba de alfa-1 antitripsina en sangre, examen de los gases de la sangre arterial, una radiografía de tórax, una TC del tórax, una prueba genética, y una prueba de la función pulmonar. En algunos casos, un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una deficiencia de AAT se somete a una prueba genética para detectar la presencia de una o más mutaciones en el gen AAT. En algunas realizaciones, una o más de las mutaciones relacionadas en la Tabla 1 se detectan en el sujeto.

En algunos casos, un médico puede sospechar que un sujeto tiene una deficiencia de AAT si el sujeto tiene enfisema en una edad temprana (por ejemplo, antes de los 45 años), un enfisema sin haber fumado nunca o sin haber estado expuesto a toxinas, enfisema con antecedentes familiares de una deficiencia de AAT, enfermedad hepática o hepatitis cuando no se pueden encontrar otra causa, enfermedad hepática o hepatitis y antecedentes familiares de deficiencia de AAT.

En algunas realizaciones, la deficiencia de alfa-1 antitripsina puede dar como resultado dos tipos distintos de patologías: una enfermedad pulmonar que es principalmente debida a la pérdida de la función antiproteasa, y una enfermedad hepática debida a una ganancia de funciones tóxicas de la proteína AAT mutante (por ejemplo PiZ-AAT mutante). Por ejemplo, debido a que el mutante AAT-PiZ presenta una toxicidad hepatocelular por ganancia de funciones que se acumula en el retículo endoplásmico, los tratamientos dirigidos a disminuir los niveles del ARNm de AAT-PiZ pueden mejorar o incluso invertir la patología del hígado. Además, la secreción aumentada de la proteína AAT funcional protege los pulmones de la neutrófilo elastasa y de las enzimas proteolíticas asociadas. Los solicitantes han desarrollado algunos vectores VAAr que proporcionan la administración de microARN dirigidos contra la AAT mutante, en el mismo casete provírico que un gen que codifica la AAT natural. En algunas realizaciones, los microARN se administran utilizando vectores de VAAr que se han utilizando anteriormente en ensayos clínicos.

#### *Ácidos nucleicos aislados*

En general, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados, que pueden ser vectores de VAAr, útiles para tratar una enfermedad genética. Los ácidos nucleicos aislados comprende una o más regiones que codifican uno o más ARN inhibidores que se dirigen a un ARNm endógeno de un sujeto. Los ácidos nucleicos aislados comprenden también normalmente una o más regiones que codifican uno o más ARNm exógenos. La(s) proteína(s) codificada(s) por los uno o más ARNm exógeno(s) puede ser diferente o no en la composición de la secuencia de la(s) proteína(s) codificada(s) por los uno o más ARNm endógeno(s). Por ejemplo, los uno o más ARN endógenos pueden codificar una versión natural y una versión mutante de una proteína concreta, tal como puede ser el caso cuando un sujeto es heterocigótico para una mutación concreta, y el ARNm exógeno puede codificar un ARNm natural de la misma proteína concreta. En este caso, normalmente, la secuencia del ARNm exógeno y el ARNm endógeno que codifican la proteína natural son suficientemente diferentes de tal manera que el ARNm exógeno no está dirigido por el uno o más ARN inhibidores. Esto puede lograrse, por ejemplo, introduciendo una o más mutaciones silenciosas en el ARNm exógeno de tal manera que codifique la misma proteína que el ARNm endógeno pero tenga una secuencia de ácido nucleico diferente. En este caso, el ARNm exógeno puede denominarse "reforzado". Como alternativa, el ARN inhibidor (por ejemplo, miARN) puede dirigirse a las regiones 5' y/o 3' no traducidas del ARNm endógeno. Estas regiones 5' y/o 3' pueden a continuación eliminarse o sustituirse en el ARNm exógeno de tal manera que el ARNm exógeno no esté dirigido por el uno o más ARN inhibidores.

En otro ejemplo, los uno o más ARN endógenos pueden codificar solo versiones mutantes de una proteína concreta, tal como puede ser el caso cuando un sujeto es homocigótico para una mutación concreta, y el ARNm exógeno puede codificar un ARNm natural de la misma proteína concreta. En este caso, la secuencia del ARNm exógeno puede reforzarse como se ha descrito anteriormente, o los uno o más ARN inhibidores pueden diseñarse para discriminar el ARNm endógeno mutado procedente del ARNm exógeno.

En algunos casos, los ácidos nucleicos aislados comprenden una primera región que codifica uno o más primeros miARN inhibidores (por ejemplo, miARN) que comprenden un ácido nucleico que tiene suficientes secuencias complementarias con un ARNm endógeno de un sujeto para hibridarse e inhibir la expresión del ARNm endógeno, en el que el ARNm endógeno codifica una primera proteína. Los ácidos nucleicos incluyen también normalmente una segunda región que codifica un ARNm exógeno que codifica una segunda proteína, en el que la segunda proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la primera proteína, en el que los uno o más ARN inhibidores no comprenden un ácido nucleico que tiene suficientes secuencias complementarias para hibridarse e inhibir la expresión del ARNm exógeno. Se divulga también en el presente documento, que la primera

región puede situarse en cualquier localización adecuada. La primera región puede situarse en una parte no traducida de la segunda región. Se divulga también en el presente documento, que la primera región puede situarse en cualquier parte no traducida del ácido nucleico, incluyendo, por ejemplo, un intrón, una región 5' o 3' no traducida, etc.

5 Como se divulga también en el presente documento, puede ser deseable situar la primera región en la dirección 5' del primer codón del ARNm exógeno. Por ejemplo, la primera región puede situarse entre el primer codón del ARNm exógeno y 2000 nucleótidos en la dirección 5' del primer codón. La primera región puede situarse entre el primer codón del ARNm exógeno y 1000 nucleótidos en la dirección 5' del primer codón. La primera región puede situarse entre el primer codón del ARNm exógeno y 500 nucleótidos en la dirección 5' del primer codón. La primera región puede situarse entre el primer codón del ARNm exógeno y 250 nucleótidos en la dirección 5' del primer codón. La primera región puede situarse entre el primer codón del ARNm exógeno y 150 nucleótidos en la dirección 5' del primer codón.

15 Se divulga también en el presente documento, que la primera región puede situarse en la dirección 3' de una parte de la segunda región que codifica la cola poli-A del ARNm exógeno. La primera región puede estar entre el último codón del ARNm exógeno y una posición de 2000 nucleótidos en la dirección 3' del último codón. La primera región puede estar entre el último codón del ARNm exógeno y una posición de 1000 nucleótidos en la dirección 3' del último codón. La primera región puede estar entre el último codón del ARNm exógeno y una posición de 500 nucleótidos en la dirección 3' del último codón. La primera región puede estar entre el último codón del ARNm exógeno y una posición de 250 nucleótidos en la dirección 3' del último codón. La primera región puede estar entre el último codón del ARNm exógeno y una posición de 150 nucleótidos en la dirección 3' del último codón.

25 El ácido nucleico puede comprender también una tercera región que codifica uno o más segundos ARN inhibidores (por ejemplo, miARN) que comprenden un ácido nucleico que tiene suficientes secuencias complementarias para hibridarse e inhibir la expresión del ARNm endógeno. Como con la primera región, la tercera región puede situarse en cualquier localización adecuada. Por ejemplo, la tercera región puede situarse en una parte no traducida de la segunda región, incluyendo, por ejemplo, un intrón, una región 5' o 3' no traducida, etc. la tercera región puede situarse en la dirección 5' de una parte de la segunda región que codifica el primer codón del ARNm exógeno. La tercera región puede situarse en la dirección 3' de la segunda región que codifica la cola poli-A del ARNm exógeno. En algunos casos, cuando la primera región se sitúa en la dirección 5' del primer codón, la tercera región se sitúa en la dirección 3' de la parte de la segunda región que codifica la cola poli-A del ARNm exógeno, y viceversa.

35 En algunos casos, la primera región y las terceras regiones codifican el mismo conjunto de uno o más ARN inhibidores (por ejemplo, miARN). En otros casos, la primera región y la tercera regiones codifican un conjunto diferente de uno o más ARN inhibidores (por ejemplo, miARN). En algunos casos, los uno o más ARN inhibidores (por ejemplo, miARN) codificados en la primera región diana se dirigen a uno o más de los mismos genes que los uno o más ARN inhibidores (por ejemplo, miARN) codificados por la tercera región. En algunos casos, los uno o más ARN inhibidores (por ejemplo, miARN) codificados por la primera región no se dirigen a cualquiera de los mismos genes que los uno o más ARN inhibidores (por ejemplo, miARN) codificados por la tercera región. Debe apreciarse que los ARN inhibidores (por ejemplo, miARN) que se dirigen a un gen tienen suficiente complementariedad con el gen para unirse e inhibir la expresión (por ejemplo, mediante degradación o inhibición de la traducción) del miARN correspondiente.

45 La primera y la tercera regiones pueden codificar también un número diferente de ARN inhibidores (por ejemplo, miARN). Por ejemplo, la primera región y la tercera regiones pueden codificar de forma independiente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más ARN inhibidores (por ejemplo, miARN). La primera y la tercera regiones no se limitan a comprometer un ARN inhibidor concreto cualquiera, y pueden incluir, por ejemplo, un miARN, un ARNh<sub>c</sub>, un ARN TuD, una esponja de microARN, un ARN de sentido contrario, una ribozima, un aptámero, u otro ARN inhibidor adecuado. En algunos casos, la primera región y/o la tercera región comprende uno o más miARN. Los uno o más miARN pueden comprender una secuencia de ácido nucleico codificada por una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 17-19 y 21-23.

55 Tal como se divulga en el presente documento, la segunda proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la primera proteína. En consecuencia, la segunda proteína puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 88 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos un 99 % o más idéntica a la primera proteína. En algún caso, la segunda proteína difiere de la primera proteína en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos. En algunos casos, una o más de las diferencias entre la primera proteína y la segunda proteína son las sustituciones conservativas de aminoácidos. Como se usa en el presente documento, una "sustitución conservativa de aminoácidos" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera la carga relativa o las características de tamaño de la proteína en la que se realiza la sustitución del aminoácido. Se pueden preparar variantes de acuerdo con los métodos para alterar la secuencia polipeptídica conocida por una persona normalmente experta en la materia tal como se encuentran en las referencias que compilan dichos métodos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones realizadas entre aminoácidos en los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D. Por consiguiente, las sustituciones conservativas de aminoácidos pueden proporcionar variantes funcionalmente equivalentes, u homólogos de una proteína



endógena.

Debe apreciarse que en algunos casos, la segunda proteína puede ser una proteína marcadora (*por ejemplo*, una proteína fluorescente, una proteína de fusión, una proteína etiquetada, *etc.*). Dichas construcciones pueden ser útiles, por ejemplo, para estudiar la distribución de las proteínas codificadas en una célula o en un sujeto y son también útiles para evaluar la eficacia del direccionamiento y la distribución de VAAr en un sujeto.

En algunas realizaciones de los ácidos nucleicos aislados, la primera proteína es una proteína alfa 1-antitripsina (AAT). Se proporciona una secuencia ilustrativa de una AAT natural en la SEQ ID NO: 1 o 2. En consecuencia, en algunos casos, el ARNm endógeno puede comprender la secuencia de ARN especificada por la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5. El ARNm endógeno puede comprender la secuencia de ARN que se especifica por una cualquiera de las secuencias que se muestran en las SEQ ID NOS: 6-16. En algunos casos, la proteína AAT es una proteína AAT humana. La proteína AAT puede tener una secuencia como la que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 2 o una o más mutaciones de la misma como se identifica en la Tabla 1, por ejemplo, la SEQ ID NO: 3 o 4. El ARNm exógeno puede tener una o más mutaciones silenciosas en comparación con el ARNm endógeno. El ARNm exógeno puede comprender la secuencia de ARN especificada por la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 20. La secuencia de ARNm exógeno puede codificar o no una etiqueta peptídica (*por ejemplo*, una etiqueta myc, una etiqueta his, *etc.*) unida a la proteína codificada. A menudo, en una construcción utilizada con propósitos clínicos, la secuencia de ARNm exógeno no codifica una etiqueta peptídica unida a la proteína codificada.

Como se describe adicionalmente a continuación, los ácidos nucleicos aislados pueden comprender repeticiones terminales invertidas (RTI) de unos serotipos de VAA seleccionados entre el grupo que consiste en: VAA1, VAA2, VAA5, VAA6, VAA6.2, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11 y variantes de los mismos. Los ácidos nucleicos aislados pueden incluir también un promotor unido operativamente con los uno o más ARN inhibidores, el ARNm exógeno, y/o el uno o más segundos ARN inhibidores. El promotor puede ser un promotor específico de tejido, un promotor constitutivo o un promotor inducible.

Tabla 1: Mutaciones en la AAT humana - Ingrese la ID del gen: 5265

posición	posición	id del clúster	Función	alelo	resto	posición	posición
94844794	1822	rs78787657	mutación de aminoácido	A	Lys [K]	1	417
			cóntigo de referencia	C	Gln [Q]	1	417
94844797	1819	rs3191200	mutación de aminoácido	C	Pro [P]	1	416
			cóntigo de referencia	A	Thr [T]	1	416
94844842	1774	rs17850837	mutación de aminoácido	A	Lys [K]	1	401
			cóntigo de referencia	C	Gln [Q]	1	401
94844843	1773	rs1303	mutación de aminoácido	C	Asp [D]	3	400
			cóntigo de referencia	A	Glu [E]	3	400
94844855	1761	rs13170	sinónimo	T	Phe[F]	3	396
			cóntigo de referencia	C	Phe [F]	3	396
94844866	1750	rs61761869	mutación de aminoácido	T	Ser [S]	1	393
			cóntigo de referencia	C	Pro [P]	1	393
94844887	1729	rs12233	mutación de aminoácido	T	Ser [S]	1	386
			cóntigo de referencia	C	Pro [P]	1	386
94844912	1704	rs28929473	mutación de aminoácido	T	Phe [F]	3	377
			cóntigo de referencia	A	Leu [L]	3	377
94844926	1690	rs12077	mutación de aminoácido	T	Trp [W]	1	373
			cóntigo de referencia	G	Gly [G]	1	373

ES 2 661 680 T3

94844942	1674	rs1050520	sinónimo	G	Lys [K]	3	367
			cóntigo de referencia	A	Lys [K]	3	367
94844947	1669	rs28929474	mutación de aminoácido	A	Lys [K]	1	366
			cóntigo de referencia	G	Glu [E]	1	366
94844954	1662	rs1050469	sinónimo	G	Thr [T]	3	363
			cóntigo de referencia	C	Thr [T]	3	363
94844957	1659	rs1802961	sinónimo	T	Leu [L]	3	362
			cóntigo de referencia	G	Leu [L]	3	362
94844959	1657	rs1131154	mutación de aminoácido	A	Met [M]	1	362
			cóntigo de referencia	C	Leu [L]	1	362
94844960	1656	rs13868	sinónimo	A	Val [V]	3	361
			cóntigo de referencia	G	Val [V]	3	361
94844961	1655	rs1131139	mutación de aminoácido	C	Ala [A]	2	361
			cóntigo de referencia	T	Val [V]	2	361
94844962	1654	rs72555357	desplazamiento del marco			1	361
			cóntigo de referencia	G	Val [V]	1	361
94844965	1651	rs1802959	mutación de aminoácido	A	Thr [T]	1	360
			cóntigo de referencia	G	Ala [A]	1	360
94844972	1644	rs10427	sinónimo	C	Val [V]	3	357
			cóntigo de referencia	G	Val [V]	3	357
94844975	1641	rs9630	sinónimo	T	Ala [A]	3	356
			cóntigo de referencia	C	Ala [A]	3	356
94844977	1639	rs67216923	desplazamiento del marco			1	356
			desplazamiento del marco	(15pb)		1	356
			cóntigo de referencia	G	Ala [A]	1	356
94845814	1625	rs72555374	desplazamiento del marco			2	351
			cóntigo de referencia	T	Leu [L]	2	351
94845845	1594	rs28929471	mutación de aminoácido	A	Asn [N]	1	341
			cóntigo de referencia	G	Asp [D]	1	341
94845893	1546	rs1802962	mutación de aminoácido	T	Cys [C]	1	325
			cóntigo de referencia	A	Ser [S]	1	325
94845902	1537	rs55704149	mutación de aminoácido	T	Tyr [Y]	1	322
			cóntigo de	G	Asp [D]	1	322

ES 2 661 680 T3

			referencia				
94845914	1525	rs117001071	mutación de aminoácido	T	Ser [S]	1	318
			cóntigo de referencia	A	Thr [T]	1	318
94845917	1521	rs35624994	desplazamiento del marco		Ser [S]	3	316
			desplazamiento del marco	C	Ser [S]	3	316
			cóntigo de referencia	CA	Ser [S]	3	316
94847218	1480	rs1802963	mutación finalizadora	T	xxx [X]	1	303
			cóntigo de referencia	G	Glu [E]	1	303
94847262	1436	rs17580	mutación de aminoácido	T	Val [V]	2	288
			cóntigo de referencia	A	Glu [E]	2	288
94847285	1413	rs1049800	sinónimo	C	Asp [D]	3	280
			cóntigo de referencia	T	Asp [D]	3	280
94847306	1392	rs2230075	sinónimo	T	Thr [T]	3	273
			cóntigo de referencia	C	Thr [T]	3	273
94847351	1347	rs34112109	sinónimo	A	Lys [K]	3	258
			cóntigo de referencia	G	Lys [K]	3	258
94847357	1341	rs8350	mutación de aminoácido	G	Trp [W]	3	256
			cóntigo de referencia	T	Cys [C]	3	256
94847386	1312	rs28929470	mutación de aminoácido	T	Cys [C]	1	247
			cóntigo de referencia	C	Arg [R]	1	247
94847407	1291	rs72552401	mutación de aminoácido	A	Met [M]	1	240
			cóntigo de referencia	G	Val [V]	1	240
94847415	1283	rs6647	mutación de aminoácido	C	Ala [A]	2	237
			cóntigo de referencia	T	Val [V]	2	237
94847452	1246	rs11558264	mutación de aminoácido	C	Gln [Q]	1	225
			cóntigo de referencia	A	Lys [K]	1	225
94847466	1232	rs11558257	mutación de aminoácido	T	Ile [I]	2	220
			cóntigo de referencia	G	Arg [R]	2	220
94847475	1223	rs11558265	mutación de aminoácido	C	Thr [T]	2	217
			cóntigo de referencia	A	Lys [K]	2	217
94849029	1119	rs113813309	sinónimo	T	Asn [N]	3	182
			cóntigo de referencia	C	Asn [N]	3	182
94849053	1095	rs72552402	sinónimo	T	Thr [T]	3	174

ES 2 661 680 T3

			cóntigo de referencia	C	Thr [T]	3	174
94849061	1087	rs112030253	mutación de aminoácido	A	Arg [R]	1	172
			cóntigo de referencia	G	Gly [G]	1	172
94849109	1039	rs78640395	mutación finalizadora	T	xxx [X]	1	156
			cóntigo de referencia	G	Glu [E]	1	156
94849140	1008	rs11558263	mutación de aminoácido	A	Arg [R]	3	145
			cóntigo de referencia	C	Ser [S]	3	145
94849151	997	rs20546	sinónimo	T	Leu [L]	1	142
			cóntigo de referencia	C	Leu [L]	1	142
94849160	988	rs11558261	mutación de aminoácido	A	Ser [S]	1	139
			cóntigo de referencia	G	Gly [G]	1	139
94849201	947	rs709932	mutación de aminoácido	A	His [H]	2	125
			cóntigo de referencia	G	Arg [R]	2	125
94849228	920	rs28931572	mutación de aminoácido	A	Asn [N]	2	116
			cóntigo de referencia	T	Ile [I]	2	116
94849303	845	rs28931568	mutación de aminoácido	A	Glu [E]	2	91
			cóntigo de referencia	G	Gly [G]	2	91
94849325	823	rs111850950	mutación de aminoácido	A	Thr [T]	1	84
			cóntigo de referencia	G	Ala [A]	1	84
94849331	817	rs113817720	mutación de aminoácido	A	Thr [T]	1	82
			cóntigo de referencia	G	Ala [A]	1	82
94849345	803	rs55819880	mutación de aminoácido	T	Phe [F]	2	77
			cóntigo de referencia	C	Ser [S]	2	77
94849364	784	rs11575873	mutación de aminoácido	C	Arg [R]	1	71
			cóntigo de referencia	A	Ser [S]	1	71
94849381	767	rs28931569	mutación de aminoácido	C	Pro [P]	2	65
			cóntigo de referencia	T	Leu [L]	2	65
94849388	760	rs28931570	mutación de aminoácido	T	Cys [C]	1	63
			cóntigo de referencia	C	Arg [R]	1	63
94849466	682	rs11558262	mutación de aminoácido	G	Ala [A]	1	37
			cóntigo de referencia	A	Thr [T]	1	37
94849492	656	rs11558259	mutación de aminoácido	G	Arg [R]	2	28

			cóntigo de referencia	A	Gln [Q]	2	28
94849548	600	rs11558260	sinónimo	T	Ile [I]	3	9
			cóntigo de referencia	C	Ile [I]	3	9
			codón de inicio				1

#### Métodos de uso

5 Se divulgan también en el presente documento métodos para expresar la proteína alfa 1-antitripsina (AAT) en un sujeto. Normalmente, el sujeto tiene o se sospecha que tiene una deficiencia de AAT. Los métodos implican normalmente administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquier virus adenoasociado recombinante (VAAr) que hospeda cualquiera de los ácidos nucleicos aislados divulgados en el presente documento. En general, la "cantidad eficaz" de un VAAr se refiere a una cantidad suficiente para estimular la respuesta biológica deseada. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz se refiere a la cantidad de VAAr eficaz para transducir una célula o tejido *ex vivo*. En otras realizaciones, la cantidad eficaz se refiere a la cantidad eficaz para dirigir la administración de VAAr a un sujeto. Como apreciarán las personas normalmente expertas en la materia, la cantidad eficaz del VAAr recombinante de la invención varía dependiendo de dichos factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, la farmacocinética de los producto de expresión, la dolencia que se está tratando, el modo de administración, y el sujeto. Normalmente, el VAAr se administra con un transportador farmacéuticamente aceptable.

15 El sujeto puede tener una mutación en un gen AAT. La mutación puede dar como resultado una expresión disminuida de la proteína AAT natural (normal). El sujeto puede ser homocigótico para la mutación. El sujeto puede ser heterocigótico para la mutación. La mutación puede ser una mutación de aminoácido. La mutación puede ser una mutación finalizadora. La mutación puede ser una mutación relacionada en la Tabla 1. La mutación puede dar como resultado la expresión de una proteína AAT mutante. La proteína mutante puede ser un mutante con ganancia de funciones o un mutante con pérdida de funciones. La proteína AAT mutante puede ser incapaz de inhibir la actividad de la proteasa. La proteína AAT mutante puede fracasar en plegarse adecuadamente. La proteína AAT mutante puede dar como resultado la formación de agregados de proteínas. La proteína AAT mutantes puede dar como resultado la formación de glóbulos de AAT intracelulares. La mutación puede dar como resultado una sustitución de glutamato a lisina en la posición 366 del aminoácido de la proteína precursora de acuerdo con la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID NO: 3. En la proteína madura, esta misma mutación se produce en la posición 342 del aminoácido (SEQ ID NO: 4). Los métodos pueden implicar también determinar si el sujeto tiene una mutación. Por consiguiente, los métodos pueden implicar obtener un genotipo del gen AAT en el sujeto.

30 En algunos casos, tras la administración del VAAr, se determina el nivel de expresión de la primera proteína y/o la segunda proteína en el sujeto. La administración puede llevarse a cabo en una o más ocasiones. Cuando la administración se lleva a cabo en una o más ocasiones, el nivel de la primera proteína y/o el nivel de la segunda proteína en el sujeto se determinan a menudo después de al menos una administración. En algunos casos, el nivel en suero de la primera proteína en el sujeto se reduce en al menos un 85 % tras la administración del VAAr. El nivel en suero de la primera proteína en el sujeto puede reducirse en al menos un 90 % tras la administración del VAAr. El nivel en suero de la primera proteína en el sujeto puede reducirse en al menos un 95 % tras la administración del VAAr. Sin embargo, en algunos casos, el nivel en suero de la primera proteína en el sujeto se reduce en al menos un 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, o al menos el 80 % tras la administración del VAAr.

40 El nivel (*por ejemplo*, el nivel en suero) de la primera proteína en el sujeto puede reducirse en al menos un 85 % en 2 semanas tras la administración del VAAr. El nivel en suero de la primera proteína en el sujeto puede reducirse en al menos un 90 % en 2 semanas tras la administración del VAAr. El nivel en suero de la primera proteína en el sujeto puede reducirse en al menos un 85 % en 4 semanas de administración del VAAr. La reducción puede observarse en un plazo de 1 día, en un plazo de 2 días, en un plazo de 3 días, en un plazo de 4 días, en un plazo de 5 días, en un plazo de 6 días, en un plazo de 1 semana, en un plazo de 2 semanas, en un plazo de 3 semanas, en un plazo de 4 semanas o más.

50 La reducción en el nivel de la de la primera proteína puede sostenerse durante al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 7 semanas, al menos 8 semanas, al menos 9 semanas, al menos 10 semanas, al menos 11 semanas o más. En algunos casos, tras 7 semanas de administración del VAAr, el nivel en suero de la primera proteína está a un nivel de al menos un 50 % en comparación con el nivel en sueros de la primera proteína antes de la administración del VAAr. En determinados casos, tras 7 semanas de administración del VAAr, el nivel en suero de la primera proteína está a un nivel de al menos un 75 % en comparación con el nivel en sueros de la primera proteína antes de la administración del VAAr.

En algunos casos, tras la administración del VAAr se evalúa al menos un parámetro del resultado clínico asociado a

la deficiencia de AAT en el sujeto. Normalmente, el parámetro del resultado clínico evaluado tras la administración del VAAr se compara con el parámetro del resultado clínico determinado en un momento antes de la administración del VAAr para determinar la eficacia del VAAr. A menudo, una mejora en el parámetro del resultado clínico tras la administración del VAAr indica la eficacia del VAAr. Se puede utilizar cualquier parámetro de resultado clínico adecuado. Normalmente, el parámetro del resultado clínico es indicativo de los uno o más síntomas de una deficiencia de AAT. Por ejemplo, el parámetro del resultado clínico se puede seleccionar entre el grupo que consiste en: niveles en suero de la primera proteína, niveles en suero de la segunda proteína, presencia de glóbulos de AAT intracelulares, presencia de foci inflamatorios, capacidad respiratoria, capacidad de toser, producción de flema, frecuencia de resfriado de pecho o neumonía, y tolerancia para el ejercicio. Los glóbulos de AAT intracelulares o foci inflamatorios se evalúan en tejidos afectados por la deficiencia de AAT, incluyendo, por ejemplo, tejido pulmonar o tejido hepático.

#### VAA recombinantes

En algunos aspectos, la invención proporciona VAA aislados. Como se usa en el presente documento con respecto a los VAA, el término "aislado" se refiere a un VAA que se ha aislado de su entorno natural (*por ejemplo*, de una célula hospedadora, tejido, o sujeto) o se ha producido de forma artificial. Los VAA aislados pueden producirse utilizando métodos recombinantes. Dichos VAA se denominan en el presente documento "VAA recombinantes". Los VAA recombinantes (VAAr) tienen preferentemente capacidades de direccionamiento específicas de tejidos, de tal manera que un transgén del VAAr se administrará específicamente a uno o más tejido(s) predeterminados. La cápsida del VAA es un importante elemento en la determinación de estas capacidades de direccionamiento específicas de tejidos. De este modo, se puede seleccionar un VAAr que tiene una cápsida adecuada para el tejido que constituye el objetivo. En algunas realizaciones, el VAAr comprende una proteína de la cápsida que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a uno cualquiera de VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11 y variantes de los mismos. Los VAA recombinantes transportan normalmente un ácido nucleico aislado de la invención.

Son bien conocidos en la técnica los métodos para obtener VAA recombinantes que tienen una proteína de la cápsida deseada (Véase, por ejemplo, el documento US 2003/0138772). Las proteínas de la cápsida de VAA que se pueden usar en los VAAr de la invención incluyen, por ejemplo, las divulgadas en G. Gao, et al., *J. Virol*, 78(12):6381-6388 (junio de 2004); G. Gao, y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(10):6081-6086 (13 de mayo de 2003); documentos US 2003-0138772, US 2007/0036760, US 2009/0197338, y WO 2010/138263. Normalmente, los métodos implican cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápsida de VAA o fragmento de la misma; un gen *rep* funcional; un vector VAA recombinante compuesto por repeticiones terminales invertidas (RTI) de VAA y un transgén; y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento del vector VAA recombinante en las proteínas de la cápsida de VAA.

Se pueden proporcionar los componentes que se van a cultivar en la célula hospedadora para empaquetar un vector VAAr en una cápsida de VAA a la célula hospedadora en *trans*. Como alternativa, se pueden proporcionar uno cualquiera o más de los componentes requeridos (por ejemplo, un vector de VAA recombinante, secuencias *rep*, secuencias *cap*, y/o funciones auxiliares) por una célula hospedadora estable que se ha diseñado mediante ingeniería genética para contener uno o más de los componentes requeridos utilizando los métodos conocidos por los expertos en la materia. De forma más adecuada, dicha célula hospedadora estable contendrá los componente(s) requeridos bajo el control de un promotor inducible. Sin embargo, los componente(s) requeridos pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo. Se proporcionan en el presente documento ejemplos de promotores inducibles y constitutivos adecuados. En otra alternativa más, una célula hospedadora estable seleccionada puede contener componente(s) seleccionados bajo el control de un promotor constitutivo y otros componente(s) seleccionados bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, se puede generar una célula hospedadora estable que se deriva de células 293 (que contienen funciones E1 auxiliares bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contienen las proteínas *rep* y/o *car* bajo el control de promotores inducibles. Un experto en la materia puede generar otras células hospedadoras estables adicionales.

Pueden administrarse el vector VAA recombinante, las secuencias *rep*, las secuencias *cap*, y las funciones auxiliares requeridas para producir el VAAr de la invención a la célula hospedadora empaquetada utilizando cualquier elemento genético adecuado (vector). El elemento genético seleccionado puede administrarse mediante cualquier método adecuado, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Son conocidos por los expertos en la manipulación de ácidos nucleicos los métodos utilizados para construir cualquier realización de la presente invención e incluyen la ingeniería genética, ingeniería recombinante, y técnicas sintéticas. Véase, *por ejemplo*, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. De forma similar, son bien conocidos los métodos para generar viriones de VAAr y la selección de un método adecuado no es una limitación de la presente invención. Véase, *por ejemplo*, K. Fisher et al, *J. Virol.*, 70:520-532 (1993) y patente de Estados Unidos n.º 5.478.745.

En algunas realizaciones, se pueden producir VAA recombinantes utilizando el método de transfección triple (*por ejemplo*, como se describe en detalles en la patente de Estados Unidos n.º 6.001.650). Normalmente, los VAA recombinantes se producen transfectando una célula hospedadora con un vector VAA recombinante (que

comprende un transgén) que se va a empaquetar en partículas VAA, un vector VAA de función auxiliar, y un vector de función accesoria. Un vector VAA de función auxiliar codifica las secuencias de "función auxiliar del VAA" (es decir, rep y cap), que funcionan en *trans* para la reproducción productora y la encapsidación del VAA. Preferentemente, el vector VAA de función auxiliar soporta una producción eficaz del vector VAA sin generar ningunos viriones del VAA natural detectables (es decir, viriones del VAA que contienen los genes rep y cap funcionales). Los ejemplos no limitantes adecuados para el uso con la presente invención pueden incluir pHLp19, descrito en la patente de Estados Unidos n.º 6.001.650, y el vector pRep6cap6, descrito en la patente de Estados Unidos n.º 6.156.303. El vector de función accesoria codifica las secuencias de nucleótidos para las funciones víricas no derivadas de VAA y/o las funciones celulares tras las cuales, VAA es dependiente de la replicación (es decir, "funciones accesorias"). Las funciones accesorias incluyen aquellas funciones requeridas para la replicación de VAA, incluyendo, sin limitación, aquellos restos implicados en la activación de la transcripción génica de VAA, el corte y empalme del ARNm de VAA específico de etapa, replicación del ADN de VAA, síntesis de productos de expresión de cap, y ensamblaje de la cápsida de VAA. Las funciones accesorias basadas en virus se pueden derivar de cualesquiera virus auxiliares conocidos tales como adenovirus, herpesvirus (otros diferentes del virus del herpes simple de tipo 1), y virus vaccinia.

Se divulgan también en el presente documento células hospedadoras transfectadas. El término "transfección" se utiliza para referirse a la captación del ADN extraño por una célula, y una célula se ha "transfectado" cuando el ADN exógeno se ha introducido en el interior de la membrana celular. Se conocen generalmente en la técnica numerosas técnicas de transfección. Véase, *por ejemplo*, Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, y Chu et al. (1981) *Gene* 13:197. Se pueden usar dichas técnicas para introducir uno o más ácidos nucleicos exógenos, tales como un vector de integración de nucleótidos y otras moléculas de ácidos nucleicos, en células hospedadoras adecuadas.

Una "célula hospedadora" se refiere a cualquier célula que alberga, o es capaz de albergar, una sustancia de interés. A menudo, una célula hospedadora es una célula de mamífero. Se puede utilizar una célula de mamífero como un receptor de una construcción auxiliar de VAA, un plásmido de un minigen de VAA, un vector de función accesoria, u otro ADN de transferencia asociado a la producción de VAA recombinantes. La expresión incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. De este modo, una "célula hospedadora" como se usa en el presente documento puede referirse a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una única célula precursora puede no ser necesariamente completamente idéntica en la morfología o el complemento del ADN total que la célula precursora original, debido a mutación natural, accidental, o deliberada.

Se divulgan también en el presente documento células aisladas. Como se usa en el presente documento con respecto a una célula, el término "aislado" se refiere a una célula que se ha aislado de su entorno natural (*por ejemplo*, de un tejido o sujeto). Como se usa en el presente documento, la expresión "línea celular" se refiere a una población de células capaz de un crecimiento continuo o prolongado y de la división *in vitro*. A menudo, las líneas celulares son poblaciones clonales derivadas de una única célula precursora. Se sabe además en la técnica que se pueden producir cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o la transferencia de dichas poblaciones clonales. Por lo tanto, las células derivadas de la línea de células referida pueden no ser precisamente idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea de células referida incluye dichas variantes. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula recombinante" se refiere a una célula en la que se ha introducido un segmento de ADN exógeno, tal como un segmento que conduce a la transcripción de un polipéptido biológicamente activo o la producción de un ácido nucleico biológicamente tal como un ARN.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" incluye cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, cromosoma artificial, virus, virión, etc., que es capaz de replicación cuando se asocia a los elementos de control adecuados y que puede transferir secuencias génicas entre células. De este modo, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores víricos. En algunas realizaciones, se contemplan vectores útiles por ser aquellos vectores en los que el segmento de ácido nucleico que se va a transcribir se sitúa bajo el control de la transcripción de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o introducida en la maquinaria sintética, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. Las frases "situado operativamente" "bajo control" o "bajo el control de la transcripción" significan que el promotor está en la localización y orientación correcta en relación con el ácido nucleico para controlar el inicio de la ARN polimerasa y la expresión del gen. La frase "vector o construcción de expresión" significa cualquier tipo de construcción genética que contiene un ácido nucleico en el que parte o toda la secuencia que codifica el ácido nucleico es capaz de transcribirse. En algunas realizaciones, la expresión incluye la transcripción del ácido nucleico, por ejemplo, para generar un producto polipeptídico biológicamente activo o un ARN inhibidor (por ejemplo, ARNhc, miARN) de un gen transcrito.

Los métodos anteriores para el empaquetado de vectores recombinantes en las cápsidas de VAA deseadas para producir los VAAr de la invención no se entiende que sean limitantes y otros métodos adecuados serán evidentes para los técnicos expertos.

*Vectores de VAA recombinantes*

Los ácidos nucleicos aislados de la invención pueden ser vectores de VAA recombinantes. El vector de VAA recombinantes puede empaquetarse en una proteína de la cápsida y administrarse a un sujeto y/o administrarse a una célula diana seleccionada. Los "vectores de VAA recombinantes (VAAr) están normalmente compuestos de, como mínimo, por un transgén y sus secuencias reguladoras, y las repeticiones terminales invertidas (RTI) 5' y 3' de VAA. El transgén puede comprender, como se divulga en otras parte del presente documento, una o más regiones que codifican uno o más ARN inhibidores (por ejemplo, miARN) que comprenden un ácido nucleico que se dirige a un ARNm endógeno de un sujeto. El transgén puede comprender también una región que codifica un ARNm exógeno que codifica una proteína (por ejemplo, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la proteína codificada por el ARNm endógeno), en el que uno o más ARN inhibidores no se dirigen al ARNm endógeno.

Las secuencias de VAA del vector comprenden normalmente las secuencias 5' y 3' de repeticiones terminales invertidas que actúan en cis (Véase, *por ejemplo*, B. J. Carter, en "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, págs. 155 168 (1990)). Las secuencias de RTI tienen aproximadamente 145 pb de longitud. Preferentemente, de forma sustancial las secuencias completas que codifican las RTI se utilizan en la molécula, aunque es permisible algún grado de modificación menor de estas secuencias. La capacidad de modificar estas secuencias de RTI están comprendidas en las capacidades del experto en la materia. (Véase, *por ejemplo*, textos tales como Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989); y K. Fisher et al., J Virol., 70:520 532 (1996)). Un ejemplo de dicha molécula empleada en la presente invención es un plásmido "que actúa en cis" que contiene el transgén, en el que la secuencia del transgén seleccionado y los elementos reguladores asociados están flanqueados por las secuencias 5' y 3' de RTI de VAA. Las secuencias de RTI de VAA pueden obtenerse de cualquier VAA conocido, incluyendo los tipos de VAA de mamíferos identificados actualmente.

Además de los elementos mayores identificados anteriormente para el vector de VAA recombinante, el vector incluye también elementos de control convencionales que están unidos operativamente con elementos del transgén de una manera que permite su transcripción, traducción y/o expresión en una célula transfectada con el vector o infectada con el virus producido por la invención. Como se usa en el presente documento, las secuencias "unidas operativamente" incluyen las secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a distancia para controlar el gen de interés. Las secuencias de control de la expresión incluyen un inicio de la transcripción adecuado, las secuencias de terminación, del promotor y del potenciador; las señales de procesamiento del ARN eficaces tales como las señales de corte y empalme y las señales de poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (*es decir*, secuencia consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción del producto codificado. Se conocen en la técnica y se pueden utilizar numerosas secuencias de control de la expresión, incluyendo promotores que son nativos, constitutivos, inducibles y/o específicos de tejidos.

Como se usa en el presente documento, se dice que una secuencia de ácido nucleico (*por ejemplo*, una secuencia de codificación) y las secuencias reguladoras están unidas de manera operativa cuando se unen covalentemente de tal manera que colocan la expresión de la transcripción de la secuencia de ácido nucleico bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Si se desea que las secuencias de ácidos nucleicos se traduzcan en una proteína funcional, se dice que dos secuencias de ADN están unidas operativamente si la inducción de un promotor en las secuencias 5' reguladoras da como resultado la transcripción de la secuencia de codificación y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación de desplazamiento de marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora de dirigir la transcripción de las secuencias de codificación, o (3) interfiere con la capacidad de transcribir el ARN correspondiente para traducirse en una proteína. De este modo, una región promotora se uniría operativamente a una secuencia de ácido nucleico si la región promotora fuera capaz de efectuar la transcripción de la secuencia de ADN de tal manera que el transcrito resultante pueda traducirse en la proteína o el polipéptido deseados. De manera similar, dos o más regiones de codificación se unen de manera operativa cuando se unen de tal manera que su transcripción a partir de un promotor común da como resultado la expresión de dos o más proteínas que se han traducido en marco. En algunas realizaciones, las secuencias unidas operativamente dan como resultado una proteína de fusión. En algunas realizaciones, las secuencias de codificación unidas operativamente dan como resultado un ARN funcional (*por ejemplo*, miARN).

Para los ácidos nucleicos que codifican las proteínas, se inserta generalmente una secuencia de poliadenilación tras las secuencias del transgén y antes de la secuencia 3' de RTI de VAA. Una construcción VAAr útil en la presente invención puede contener también un intrón, localizado deseablemente entre la secuencia promotora/potenciadora y el transgén. Una posible secuencia intrón se deriva de SV-40 y se denomina secuencia intrón T de SV-40. Cualquier intrón puede proceder del gen de la  $\beta$ -actina. Otro elemento de vector que se puede usar es un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica en las células hospedadoras puede variar entre especies, tejidos o tipos de células, pero deberá en general incluir, según sea



necesario, secuencias 5' no transcritas y 5' no traducidas implicadas en el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tales como la secuencia TATA, la secuencia de protección, la secuencias CAAT, los elementos potenciadores, y similares. Especialmente, dichas secuencias reguladoras 5' no transcritas incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control de la transcripción del gen unido operativamente.

5 Las secuencias reguladoras pueden incluir también secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en la dirección 5' según se desee. Los vectores de la invención pueden incluir opcionalmente secuencias 5' líderes o secuencias señal. La elección y el diseño de un vector adecuado está comprendida en la capacidad y el criterio de una persona normalmente experta en la materia.

10 Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el virus del sarcoma de Rous retrovírico (VSR), el promotor LTR (opcionalmente, con el potenciador del VSR), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente, con el potenciador del CMV), el promotor del SV40, y el promotor de la dihidrofolato reductasa. Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y se pueden regular por compuestos suministrados de forma exógena, factores ambientales tales como temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, *por ejemplo*, fase aguda, un estado de diferenciación concreto de la célula, o únicamente en la replicación de células.

15 Los promotores inducibles y los sistemas inducibles están disponibles a partir de varias fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito otros muchos sistemas y una persona experta en la materia puede seleccionarlos fácilmente. Los ejemplos de promotores inducibles regulados por promotores suministrados de forma exógena incluyen el promotor de la metalotioneína (MT) de oveja inducible mediante cinc, el promotor vírico del tumor de mama (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de la polimerasa T7, el promotor de la ecdisona de insecto, el sistema represible por tetraciclina, el sistema inducible por tetraciclina, el sistema inducible por RU486 y el sistema inducible por rapamicina. Otros tipos adicionales de promotores inducibles que pueden ser útiles en el contexto son aquellos que están regulados por un estado fisiológico específico, *por ejemplo*, temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación concreto de la

20 célula, o únicamente en la replicación de células. En otra realización, se utilizará el promotor nativo, o un fragmento del mismo, para el transgén. En una realización adicional, se pueden usar también otros elementos de control de la expresión nativos, tales como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak, para imitar la expresión nativa.

30 En algunas realizaciones, las secuencias reguladoras imparten capacidades de expresión génica específicas de tejidos. En algunos casos, las secuencias reguladoras específicas de tejidos se unen a factores de transcripción específicos de tejidos que induce la transcripción de una manera específica del tejido. Dichas secuencias reguladoras específicas de tejidos (*por ejemplo*, promotores, potenciadores, *etc.*) son bien conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de la  $\beta$ -actina de pollo.

35 En algunas realizaciones, se incorporan uno o más sitios de unión para uno o más de los miARN en un transgén de un vector VAAr, para inhibir la expresión del transgén e uno o más tejidos de un sujeto que alberga los transgenes, *por ejemplo*, tejidos no hepáticos, tejidos no pulmonares. El técnico experto apreciará que se pueden seleccionar los sitios de unión para controlar la expresión de un transgén en un tejido de manera específica. Los sitios diana del miARN en el ARNm pueden estar en la 5' UTR, la 3' UTR o en la región de codificación. Normalmente, el sitio diana está en la 3' UTR del ARNm. Además, el transgén puede diseñarse de tal manera que múltiples miARN regulen el ARNm reconociendo el mismo o múltiples sitios. La presencia de múltiples sitios de unión al miARN puede dar como resultado una acción cooperativa de múltiples RISC y proporciona una inhibición muy eficaz de la expresión. La secuencia del sitio diana puede comprender un total de 5-100, 10-60, o más nucleótidos. La secuencia del sitio diana puede comprender al menos 5 nucleótidos de la secuencia del sitio de unión al gen diana.

40

45

En algunas realizaciones, la capacidad de clonación del vector de ARN recombinantes puede estar limitada y un sitio de codificación deseado puede implicar la sustitución completa del genoma de 4,8 kilobases del virus. Los genes grandes pueden, por lo tanto, en algunos casos, no ser adecuados para el uso en un vector de VAA recombinante normalizado. El técnico experto apreciará que están disponibles opciones en la técnica para superar una capacidad de codificación limitada. Por ejemplo, las RTI de VAA de los dos genomas pueden hibridarse para formar concatámeros de cabeza a cola, duplicando casi la capacidad del vector. La inserción de sitios de corte y empalme permite la eliminación de las RTI del transcrito. Serán evidentes para el técnico experto otras opciones para superar una capacidad de clonación limitada.

50

#### 55 *Administración de VAA recombinante*

Los VAAr se administran en cantidades suficientes para transfectar las células de un tejido deseado y para proporcionar suficientes niveles de transferencia y expresión génica sin efectos adversos excesivos. Las rutas de administración convencional y farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no de forma limitativa, la administración directa al tejido seleccionado (*por ejemplo*, tejido hepático, tejido pulmonar) y la administración por vía subcutánea, intrapancreática, intranasal, parenteral, intravenosa, intramuscular, intratecal, intracerebral, oral, intraperitoneal, mediante inhalación o mediante otras rutas. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea. La administración de determinados VAAr a un sujeto puede ser, por ejemplo, mediante administración en el torrente sanguíneo del sujeto. La administración en el torrente sanguíneo puede ser mediante inyección en una vena, una arteria, o cualquier otro conducto vascular.

60

65

En determinadas circunstancias será deseable administrar las construcciones terapéuticas basadas en VAAr en composiciones farmacéuticas formuladas de manera adecuada, divulgadas en el presente documento tanto por vía subcutánea, intrapancreática, intranasal, parenteral, intravenosa, intramuscular, intratecal, intracerebral, oral, intraperitoneal, o mediante inhalación.

5 Un experto en la materia puede apreciar que la administración deseable de construcciones terapéuticas basadas en VAAr puede incluir también la administración *ex vivo*. En algunas realizaciones, la administración *ex vivo* comprende (1) el aislamiento de células o tejido(s) de interés de un sujeto, (2) poner en contacto las células o tejido(s) con los VAAr en cantidades suficientes para transfectar las células o tejidos para proporcionar niveles suficientes de transferencia génica sin efectos adversos excesivos, y (3) transferir las células o tejidos posteriormente al sujeto. En algunas realizaciones, las células o tejidos pueden cultivarse *ex vivo* durante algunos días, antes y/o después de la transfección.

15 Las células o tejidos pueden aislarse de un sujeto mediante cualquier método adecuados. Por ejemplo, las células o tejidos pueden aislarse mediante cirugía, biopsia (por ejemplo, biopsia de un tejido de la piel, tejido pulmonar, tejido hepático, tejido adiposo) o una serie de fluidos biológicos tal como sangre. En algunas realizaciones, las células se aíslan de médula ósea. En algunas realizaciones, las células se aíslan de tejido adiposo. En algunas realizaciones, las células se aíslan de un lipoaspirado. Se conocen en la materia los métodos adecuados para aislar células de tejido adiposo para la transfección *ex vivo*. Véase, *por ejemplo*, Kuroda, M., et al., (2011), Journal of Diabetes Investigation, 2: 333-340; Kouki Morizono, et al. Human Gene Therapy. Enero de 2003, 14(1): 59-66; y Patricia A. Zuk, Viral Transduction of Adipose-Derived Stem Cells, Methods in Molecular Biology, 1, Volumen 702, Adipose-Derived Stem Cells, Parte 4, Páginas 345-357.

25 En algunas realizaciones, las células aisladas comprenden citoblastos, citoblastos pluripotentes, citoblastos derivados de lipoaspirados, células hepáticas (por ejemplo, hepatocitos), hemocitoblastos, citoblastos mesenquimales, células estromales, células hematopoyéticas, células sanguíneas, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, u otras células adecuadas. En algunas realizaciones, las células que se van a transfectar son citoblastos pluripotentes inducidos preparados a partir de células aisladas de un sujeto.

30 En una realización, las células o tejido(s) se transducen a una multiplicidad de infección (MOI) de al menos 10 unidades infecciosas (u.i.) de un VAAr por célula (por ejemplo, 10, 100, 1,000, 5,000, 10,000, 100,000 o más u.i.) o en un número de copias víricas funcionalmente equivalente. En una realización, las células o tejido(s) se transducen a una MOI de 10 a 10.000 u.i. Las rutas para la transferencia de las células o tejido(s) transfectados en un sujeto incluyen, aunque no de forma limitativa, subcutánea, intrapancreática, intranasal, parenteral, intravenosa, intravascular, intramuscular, intratecal, intracerebral, intraperitoneal, o mediante inhalación. En algunas realizaciones, las células transfectadas se administran mediante inyección en la vena porta hepática. En algunas realizaciones, las células transfectadas se administran por vía intravascular. Los métodos para la administración *ex vivo* de VAAr son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Naldini, L. Nature Reviews Genetics (2011) 12, 301-315, Li, H. et al. Molecular Therapy (2010) 18, 1553-1558, y Loiler et al. Gene Therapy (2003) 10, 1551-1558).

40 *Composiciones de VAA recombinantes*

Los VAAr pueden administrarse a un sujeto en composiciones de acuerdo con cualquiera de los métodos adecuados conocidos en la técnica. Los VAAr, suspendidos preferentemente en un transportador fisiológicamente compatible (*por ejemplo*, en una composición), pueden administrarse a un sujeto, *por ejemplo*, un ser humano, ratón, rata, gato, perro, ovejas, conejo, caballo, vaca, cabra, cerdo, cobaya, hámster, pollo, pavo, o un primate no humano (por ejemplo, un macaco). Las composiciones de la invención pueden comprender un VAAr solo o en combinación con uno o más virus diferentes (por ejemplo, un segundo VAAr codificante que tiene uno o más transgenes diferentes).

50 Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente transportadores adecuados a la vista de la indicación para la cual se dirige el VAAr. Por ejemplo, un transportador adecuado incluye una solución salina, que puede formularse con varias soluciones tamponantes

(*por ejemplo*, solución salina tamponada con fosfato). Otros transportadores ilustrativos incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de cacahuete, aceite de sésamo y agua. Otros más serán evidentes al técnico experto.

60 Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden contener, además de los VAAr y el(los) transportador(es), otros ingredientes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes, o estabilizantes químicos. Los conservantes ilustrativos adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, los parabenos, etil vainillina, glicerina, fenol, y paraclorofenol. Los estabilizantes químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

65 La dosis de viriones de VAAr requerida para conseguir un efecto deseado o "efecto terapéutico", *por ejemplo*, las unidades de dosis en genomas de vectores/por kilogramo de peso corporal (gv/kg), variarán en función de varios factores, incluyendo, aunque no de forma limitativa: la ruta de administración del VAAr, el nivel de expresión del gen

o el ARN requerido para conseguir un efecto terapéutico, la enfermedad o trastorno específico que se está tratando, y la estabilidad del producto génico o de ARN. Un experto en la materia puede determinar fácilmente un intervalo de dosis del virión de VAAr para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno concreto basándose en los factores anteriormente mencionados, así como otros factores que son bien conocidos en la técnica. Una cantidad eficaz del VAAr está generalmente en el intervalo de entre aproximadamente 10 µl a aproximadamente 100 ml de solución que contiene entre aproximadamente  $10^9$  a  $10^{16}$  copias de genoma por sujeto. Se pueden utilizar otros volúmenes de solución. El volumen utilizado dependerá normalmente, entre otras cosas, del tamaño del sujeto, la dosis del VAAr, y la ruta de administración. Por ejemplo, para la administración intravenosa, se puede usar un volumen en el intervalo de 10 µl a 100 µl, 100 µl a 1 ml, 1 ml a 10 ml, o más. En algunos casos, es adecuada una dosificación entre aproximadamente  $10^{10}$  a  $10^{12}$  copias del genoma del VAAr por sujeto. En algunas realizaciones, el VAAr se administra a una dosis de  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{14}$ , o  $10^{15}$  copias de genoma por sujeto. En algunas realizaciones, el VAAr se administra a una dosis de  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ , o  $10^{14}$  copias de genoma por kg.

En algunas realizaciones, las composiciones de VAAr se formulan para reducir la agregación de partículas de VAA en la composición, particularmente, cuando están presentes concentraciones de VAAr elevadas (*por ejemplo*,  $\sim 10^{13}$  CG/ml o más). Son bien conocidos en la técnica los métodos para reducir la agregación de los VAAr e, incluyen, por ejemplo, la adición de tensioactivos, el ajuste del pH, el ajuste de la concentración salina, *etc.* (Véase, *por ejemplo*, Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171-178)

La formulación de excipientes y soluciones transportadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la técnica, así como el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones concretas descritas en el presente documento en varios regímenes de tratamiento. Normalmente, estas formulaciones pueden contener al menos aproximadamente un 0,1 % de principio activo o más, aunque el porcentaje del(de los) principio(s) activo(s) puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente 1 o 2 % y aproximadamente 70 % u 80 % o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de principio activo en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, la ruta de administración, la vida media del producto, así como otras consideraciones farmacológicas serán contemplados por un experto en la materia de preparar dichas formulaciones farmacéuticas, y como tales, pueden ser deseables varias dosificaciones y regímenes de tratamiento.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos. En muchos casos, la forma es estéril y fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (*por ejemplo*, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede lograrse la absorción prolongada de la composición inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración de una solución acuosa inyectable, por ejemplo, la solución puede tamponarse de forma adecuada, si es necesario, y el diluyente líquido se vuelve en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, se puede emplear un medio acuoso estéril que conocerán los expertos en la materia. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se añade tanto a 1000 ml de fluido de hipodermocilisis como se inyecta en el sitio propuesto de la infusión, (véase, por ejemplo "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la dolencia del hospedador. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el hospedador individual.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el VAAr activo en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados en el presente documento, según sea necesario, seguido de esterilización por filtrado. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y criodesecado, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de

los mismos previamente esterilizada por filtración.

Las composiciones de VAAr divulgadas en el presente documento pueden también formularse o forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o dichos ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas a partir de grupos carboxilo libres pueden derivarse también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína, y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en varias formas farmacéuticas tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos, y similares.

Como se usa en el presente documento, "transportador" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes de retraso de la absorción, tampones, soluciones transportadoras, suspensiones, coloides, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Pueden incorporarse también principios activos complementarios en las composiciones. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen reacciones alérgicas o reacciones adversas similares cuando se administran a un hospedador.

Se pueden usar vehículos de administración tales como liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en células hospedadoras adecuadas. En particular, transgenes administrados por el vector VAAr se pueden formular para la administración tanto encapsulados en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, o una nanopartícula o similar.

Dichas formulaciones pueden preferirse para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos de las construcciones de VAAr divulgadas en el presente documento. La formación y el uso de liposomas es generalmente conocido por los expertos en la materia. Recientemente, se desarrollaron liposomas con estabilidad en suero y tiempos medios de circulación mejorados (Patente de Estados Unidos n.º 5.741.516). Adicionalmente, se han descrito diversos métodos de preparación de liposomas y de preparaciones similares a liposomas como transportadores potenciales de fármacos (Patentes de Estados Unidos n.º 5.567.434; 5.552.157; 5.565.213; 5.738.868 y 5.795.587).

Se han usado con éxito liposomas en numerosos tipos de células que son normalmente resistentes a la transfección mediante otros procedimientos. Además, los liposomas está libres de limitaciones en la longitud del ADN que son típicas de sistemas de administración basados en virus. Los liposomas se han usado eficazmente para introducir genes, fármacos, agentes radioterapéuticos, virus, factores de transcripción y efectores alostéricos en varias líneas celulares cultivadas y animales. Además, se han completado con éxito algunos ensayos clínicos que examinan la eficacia de la administración de fármacos mediada por liposomas.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (denominadas también vesículas multilamelares (MLV). Las MLV tienen generalmente diámetros desde 25 nm a 4 µm. La sonicación de las MLV da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

Como alternativa, se pueden usar formulaciones de nanocápsulas del VAAr. Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar sustancias de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de un tamaño de alrededor de 0,1 µm) deben diseñarse usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Se contemplan para el uso nanopartículas de polialquilcianoacrilato biodegradables que cumplen estos requerimientos.

Además de los métodos de administración descritos anteriormente, se contemplan también las siguientes técnicas como métodos alternativos de administrar las composiciones de VAAr a un hospedador. Se ha utilizado y descrito la sonoforesis (es decir, los ultrasonidos) en la patente de Estados Unidos n.º 5.656.016 como un dispositivo para potenciar la velocidad y la eficacia de permeación del fármaco en y a través del sistema circulatorio. Otras alternativas a la administración de fármacos contempladas son la inyección intraósea (patente de Estados Unidos n.º 5.779.708), dispositivos de microchip (Patente de Estados Unidos n.º 5.797.898), formulaciones oftálmicas (Bourlais et al., 1998), matrices transdérmicas (patentes de Estados Unidos números 5.770.219 y 5.783.208) y administración controlada por retroalimentación (patente de Estados Unidos n.º 5.697.899).

*Kits y composiciones relacionadas*

Los ácidos nucleicos aislados, las composiciones, vectores de VAAr, los VAAr, etc. descritos en el presente documento pueden, en algunas realizaciones, ensamblarse en kits farmacéuticos o diagnósticos o de investigación para facilitar su uso en aplicaciones terapéuticas, diagnósticas o de investigación. Un kit puede incluir uno o más recipientes que alojan los componentes de la invención y las instrucciones para el uso. Específicamente, dichos kits pueden incluir uno o más agentes descritos en el presente documento, junto con instrucciones que describen la aplicación prevista y el uso adecuado de estos agentes. En determinadas realizaciones, los agentes en un kit pueden estar en una formulación y dosificación farmacéuticas adecuadas para una aplicación concreta y para un método de administración de los agentes. Los kits para propósitos de investigación pueden contener los componentes en concentraciones o cantidades adecuadas para realizar diversos experimentos.

El Kit puede diseñarse para facilitar el uso de los métodos descritos en el presente documento por los investigadores y puede tomar muchas formas. Cada una de las composiciones del kit, cuando sea aplicable, puede proporcionarse en forma líquida (por ejemplo, en solución), o en forma sólida, (por ejemplo, un polvo seco). En determinados casos, algunas de las composiciones pueden ser constituibles o procesables de otra forma (por ejemplo, en una forma activa), por ejemplo, mediante la adición de un disolvente adecuado u otra especie (por ejemplo, agua o un medio de cultivo celular), que puede proporcionarse o no con el kit. Como se usa en el presente documento, "instrucciones" puede definir un componente de instrucción y/o promoción, y normalmente implica instrucciones escritas sobre o asociadas al envase de la invención. Las instrucciones pueden incluir también cualquier instrucción oral o electrónica proporcionada de cualquier forma, de tal manera que un usuario reconocerá claramente que las instrucciones se van a asociar al kit, por ejemplo, audiovisual (*por ejemplo*, cinta, DVD, etc.), Internet, y/o comunicaciones basadas en web, etc. las instrucciones escritas pueden estar en una forma prescrita por un organismo gubernamental regulador de la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyas instrucciones pueden reflejar también la homologación por el organismo de la fabricación, uso o venta para la administración animal.

El kit puede contener uno cualquiera o más de los componentes descritos en el presente documento en uno o más recipientes. Como ejemplo, en una realización, el kit puede incluir instrucciones para mezclar uno o más componentes del kit y/o aislar y mezclar una muestra y aplicar a un sujeto. El kit puede incluir un recipiente que aloja los agentes descritos en el presente documento. Los agentes pueden estar en la forma de un líquido, gel o sólido (polvo). Los agentes pueden prepararse de forma estéril, envasarse en una jeringuilla y enviarse refrigerados. Como alternativa, pueden alojarse en un vial o en otro recipiente para el almacenamiento. Un segundo recipiente puede tener otros agentes preparados de forma estéril. Como alternativa, el kit puede incluir los principios activos premezclados y enviados en una jeringuilla, un vial, tubo, u otro recipiente. El kit puede tener uno o más o todos los componentes requeridos para administrar los agentes a un sujeto, tal como una jeringuilla, dispositivos de aplicación tópica o IV tubos con aguja y bolsa.

Las realizaciones ilustrativas de la invención se describirán con más detalle en los siguientes ejemplos. Estas realizaciones son ilustrativas de la invención, que un experto en la materia reconocerá que no está limitada a las realizaciones ilustrativas.

**Ejemplos**

En la extensión que los Ejemplos contienen materia sujeto que no está comprendida en el alcance de las reivindicaciones, que la materia sujeto está incluida meramente a fines de referencia.

*Introducción a los Ejemplos*

La deficiencia en alfa-1 antitripsina (AAT) es una de las enfermedades más comúnmente heredadas en Norteamérica, con una frecuencia portadora de aproximadamente 4 % en la población de Estados Unidos. La mutación más común surge como un cambio de un único par de bases (Glu342Lys, Pi\*Z, SEQ ID 4) y conduce a la síntesis de la proteína Z-AAT mutante, que se polimeriza y acumula en los hepatocitos, impidiendo su secreción eficaz. La deficiencia relativa posterior de la AAT en suero predispone a la enfermedad pulmonar crónica. Doce a 15 % de los pacientes Pi\*ZZ homocigóticos desarrolla una significativa enfermedad hepática, que varía de la hepatitis neonatal, ictericia colestásica y cirrosis al inicio de cirrosis en adultos y carcinoma hepatocelular. Se considera que la lesión hepática es una consecuencia de la acumulación patológica de polímeros de proteína Z-AAT mutante en el retículo endoplásmico de los hepatocitos.

Las estrategias para aliviar la enfermedad hepática se centran en disminuir la presencia de la proteína Z-AAT mutante en los hepatocitos mediante tanto la reducción de la expresión de la proteína mutante, como el aumento de su proteólisis o secreción. Se han llevado a cabo los estudios *in vivo* de un ARN interferente pequeño específico de alelo (ARNip) dirigido contra Pi\*Z AAT en el modelo de ratón transgénico de deficiencia AAT. Los estudios *in vitro* usando clones de ARNhc impulsados por U6 en las estructuras principales de los virus adenoasociados recombinantes (VAAr) han identificado una secuencia eficaz de un ARNip específico de alelo (denominado p10) que puede reducir los niveles de la proteína Pi\*Z AAT minimizar la inactivación de la Pi\*M AAT normal. Utilizando la cápsida de VAA8, se empaquetó rAAV-U6-p10 y se administró mediante inyección en la vena porta hepática en

- ratones transgénicos Pi\*Z para dirigir el direccionamiento in vivo del hígado. Un ARNip no específico empaquetado en VAA8 administrado de forma similar, rAAV-U6-NC, sirvió como control (NC). Los datos histológicos de estos estudios desvelaron zonas de eliminación completa o parcial de la proteína Z-AAT en el hígado 10 días después de la inyección en la cohorte p10. El análisis de los niveles de Z-AAT en suero muestra una reducción cinéticamente significativa durante 4 semanas después de la inyección en la cohorte p10 cuando se comparó con la cohorte del control NC. Para examinar la especificidad del alelo, se administró simultáneamente Pi\*M-AAT empaquetado en VAA8 con cada construcción de ARNhc. Para los grupos p10 + Pi\*M y NC + Pi\*M, hubo una expresión considerable de AAT en el hígado por la tinción histológica y no hubo diferencias significativas en los niveles de AAT en suero.
- La mutación Pi\*Z (Glu342Lys) en el exón 5 de la alfa-1 antitripsina (AAT) produce una deficiencia de AAT en plasma (A1AD) que expone el tejido pulmonar a un ataque proteolítico descontrolado y puede dar como resultado un enfisema. La AAT mutante de Pi\*Z se retiene en los hepatocitos y produce una enfermedad hepática en ~12 % de pacientes con la deficiencia. La administración de copias naturales de AAT no aborda la patología hepática, por lo tanto, las estrategias de regulación por defecto, incluyendo el ARNip se han dirigido al mensaje de la AAT en los hepatocitos. debido a que el mutante AAT-PiZ presenta una toxicidad hepatocelular por ganancia de funciones que se acumula en el retículo endoplásmico, la disminución de los niveles del ARNm de AAT-Pi\*Z (y por tanto, la proteína) pueden mejorar o incluso invertir la patología hepática. Además, la secreción aumentada de la proteína AAT funcional protegerá teóricamente los pulmones de la neutrófilo elastasa y de las enzimas proteolíticas asociadas.
- Las estrategias descritas en el presente documento incluyen el desarrollo de tratamientos mediados por VAAr para aumentar los niveles en suero de la AAT normal y regular por defecto el miARN que utiliza la AAT mutante. Para conseguir la expresión y la secreción de la AAT natural a la vez que se reducen simultáneamente los niveles de AAT-PiZ. Se seleccionaron tres secuencias de miARN que se dirigen al gen AAT en algunas realizaciones y se clonaron en dos localizaciones diferentes del casete de expresión. La primera localización está en el intrón del promotor CB que impulsa la expresión de GFP, y la segunda localización está entre la secuencia poliA y el extremo 3' del gen, se creó también una construcción adicional con miARN en ambas localizaciones. Estas tres construcciones se empaquetaron en VAAr8 y se administraron a ratones transgénicos que expresaban la forma mutante de AAT (hAAT Pi\*Z) humana a  $6 \times 10^{11}$  partículas de vector por ratón mediante la vena de la cola. Estos experimentos mostraron aproximadamente de 60 % a 80 % de reducción en la proteína AAT secretada en suero de ratones cuando se comparó con el grupo al que se inyectó el vector CB-GFP del control. Se determinó que la construcción 3XD era la más eficaz para la inactivación de hAAT, en algunas realizaciones. La inmunohistología del hígado mostró también el aclaramiento de la proteína hAAT Pi\*Z a las 4 semanas después de la administración del vector. La utilización de la secuencia de AAT con cambios de pares de bases silenciosos para evitar el silenciamiento del miARN permite la regulación en exceso de la expresión del gen AAT natural inactivando simultáneamente a la vez los niveles de proteína mutante con una única construcción del vector de VAAr.

#### *Materiales y métodos*

- empaquetamiento y purificación de VAAr9:** Se generaron los vectores VAA9 recombinantes utilizados en este estudio, se purificaron y se titularon mediante el UMass Gene Therapy Vector Core como se ha descrito anteriormente.

- Cultivo y transfección celular:** Se cultivaron células HEK-293 en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero de feto de bovino al 10 % y 100 mg/l de penicilina-estreptomomicina (Gemini Bio-products n.º Cat 400-109, Woodland, CA). Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Los plásmidos se transfectaron transitoriamente utilizando Lipofectamine 2000 (n.º de Cat 1 1668-027 Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de los cultivos celulares o las lisis de células se recogieron de acuerdo con ello.

#### *ELISAS de AAT en suero*

- ELISA DE AAT humana:** Se detectaron los niveles totales de la proteína AAT mediante ELISA. Placas de 96 pocillos de unión extra alta, (Immulon 4, n.º de cat 3855 Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) se revistieron con 100 µl de anticuerpo de cabra dirigido contra hAAT (diluido 1:500; n.º de cat 55111MP Biomedicals, Irvine CA) en tampón de Voller durante la noche a 4 °C. Tras el bloqueo con leche en polvo desnatada al 1 % en PBS-T, se crearon las curvas patrón por duplicado (hAAT; n.º de cat 16-16-011609, Athens Research and Technology, Athens, Georgia), y muestras desconocidas diluidas en serie se incubaron en la placa a temperatura ambiente durante 1 h, se incubó un segundo anticuerpo, anticuerpo de cabra dirigido contra hAAT (HRP) (diluido 1:5000, n.º de cat ab7635-5, Abcam Inc, Cambridge, MA) a temperatura ambiente durante 1 h. La placa se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS)-Tween 20 entre las reacciones. Tras la reacción con sustrato de peroxidasa de TMB (KPL, Inc, Gaithersburg, Maryland) se detuvieron las reacciones añadiendo 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (n.º de cat A300-500 Fisher, Pittsburg, PA). Se leyeron las placas a 450 nm en un lector de microplacas VersaMax (Molecular Devices).

- ELISA DE Z-AAT:** Se detectaron los niveles de proteínas Z-AAT humanas mediante ELISA utilizando anticuerpo de revestimiento (anticuerpo de ratón dirigido contra alfa-1-antitripsina-Z diluido 1:100, clon F50.4.1 del anticuerpo

monoclonal n.º de cat MON5038, Cell Sciences, Inc., Canton, MA). Se crearon las curvas patrón utilizando suero de ratón PIZ con BSA al 5 % (n.º de cat B4287 Sigma, St. Louis, MO). Muestras desconocidas diluidas en serie se incubaron en la placa a 37 °C durante 1 h, con anticuerpo secundario y tras seguir la etapa fueron iguales que el ELISA de la AAT humana patrón descrito anteriormente, excepto que el anticuerpo secundario se diluyó en BSA al 5 % y se incubó en la placa a 37 °C durante 1 h.

*ELISA de c-Myc:* Se cuantificaron los niveles de la etiqueta C-Myc mediante un método similar al que se ha descrito anteriormente. Las placas se revistieron con un anticuerpo contra c-Myc (anticuerpo de cabra dirigido contra c-Myc diluido 1:1000, MA n.º de cat AB19234 Abcam, Cambridge MA), a continuación se bloquearon las placas con BSA al 5 % a 37 °C durante 1 h. Se generaron las curvas patrón a partir de sobrenadantes recogidos de células transfectadas con c-Myc-AAT.

#### *RT-PCR en tiempo real*

*Extracción de ARN:* El tejido de hígado de ratón congelado rápidamente se molió con una mano de mortero y un mortero y se utilizó para extraer el ARN pequeño o total utilizando el kit de aislamiento del miARN ARN mirVana (n.º de cat AM1560 Ambion, Austin, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

*qRT-PCR de microRNA:* se cebó el microARN y se transcribió de forma inversa con el kit de transcripción inversa TaqMan MicroRNA (n.º de cat 4366596, Applied Biosystems Foster City, CA). Se llevó a cabo la PCR cuantitativa por duplicado en cebadores de RT-miARN específicos de gen y Applied Biosystems diseñó los ensayos de la PCR, utilizando la mezcla TaqMan Gene Expression Master (n.º de cat 436916, Applied Biosystems, Foster City, CA) en un instrumento de la PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA).

*qRT-PCR de PIM y PIZ:* Se cebó el ARN total con oligo(dT) y se transcribió de forma inversa con el kit SuperScript III First-Strand Synthesis para la RT-PCR (n.º de Cat 18989-51, Invitrogen, Carlsbad, CA). Se llevó a cabo la PCR cuantitativa mediante parejas de cebadores específicas de gen. PIM y PIZ comparten los cebadores, pero difieren en las sondas. Cebador directo CCAAGGCCGTGCATAAGG (SEQ ID NO: 29), Cebador inverso: GGCCCCAGCAGCTTCAGT (SEQ ID NO: 30), sonda PIZ: 6FAM-CTGACCATCGACAAGA-MGBNFQ (SEQ ID NO: 31) y la sonda PIM: 6FAM-CTGACCATCGACGAGA-MGBNFQ (SEQ ID NO: 32), Se llevaron a cabo las reacciones utilizando la mezcla TaqMan Gene Expression Master (n.º de cat 436916, Applied Biosystems, Foster City, CA) en un instrumento de la PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA).

*Ratones transgénicos Z-AAT y administración de VAAr9:* Se han descrito anteriormente los ratones transgénicos PiZ utilizados en este estudio<sup>8</sup>. Se llevaron a cabo todos los procedimientos animales de acuerdo con las directrices del Institutional Animal Care and Use Committee de la University of Massachusetts Medical School. Se administró el vector VAA9 recombinante mediante inyección en la vena de la cola de ratón. Se llevaron a cabo las inyecciones en las venas de los vasos más accesibles que corren a lo largo de la longitud de ambos aspectos laterales de la cola agarrando la cola en el extremo distal. Se llevaron a cabo los sangrados mediante preinyección en la vena facial y cada semana, después de la administración del VAAr9 en la vena de la cola hasta la finalización de los estudios.

*Histología del hígado:* Para la determinación de los cambios histológicos, se fijaron las muestras de hígado en formalina tamponada neutra al 10 % (Fisher Scientific), y se incluyeron en parafina. Se tiñeron secciones (5 µm) con hematoxilina y eosina y ácido de Schiff periódico (PAS) con o sin digestión de diastasa.

Se llevó a cabo la inmunohistoquímica para hAAT tal como se ha descrito anteriormente<sup>14</sup>, en resumen, se desparafinaron secciones de tejido (5 µm), se rehidrataron, y se bloquearon para la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol durante 10 minutos. Para detectar la expresión de hAAT, se incubaron secciones de tejido con anticuerpo primario, anticuerpo de conejo dirigido contra AAT humana (1:800; RDI/Fitzgerald Industries, Concord, MA), durante la noche a 4 °C. Se detectó la tinción utilizando los kits ABC-Rb-HRP y DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

*Análisis de imágenes para histología.* Los portas se tiñeron para PASD para eliminar el glicógeno. Se crearon imágenes digitales completas de los portas utilizando Aperio CS ScanScope (V, CA) y se analizaron utilizando el algoritmo de recuento de píxeles positivos (versión 9). Los glóbulos positivos para PASD se expresaron como la proporción de píxeles positivos fuertes a píxeles totales utilizando un valor hue de 0,9, una anchura de hue de 0,15 y un umbral de saturación del color de 0,25. El umbral de intensidad para la positividad fuerte se ajustó a un límite superior de 100.

*Análisis del monómero y el polímero de la proteína Z-AAT.* Para la separación de las proteínas soluble/insoluble, se añadieron 10 mg del hígado completo a 2 ml de tampón a 4 °C (50 mmol/l Tris-HCl (pH 8,0), 150 mmol/l de NaCl, 5 mmol/l de KCl, 5 mmol/l de MgCl<sub>2</sub>, Triton X-100 al 0,5 %, y 80 µl de solución madre de inhibidor completo de la proteasa). Se homogeneizó el tejido en un homogeneizador Dounce preenfriado durante 30 repeticiones, a continuación se sometió a vortización vigorosamente. Una alícuota de 1 ml se pasó a través de una boquilla de calibre 28 10 veces. Se determinó la concentración de proteína total de la muestra, y se distribuyó en alícuotas una muestra de proteínas hepáticas totales de 5-µg y se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a 4 °C. El

sobrenadante (fracción (S) soluble) se retiró inmediatamente en tubos recientes; se tuvo un extremo cuidado en evitar la perturbación del aglomerado (fracción (I) insoluble). El aglomerado de polímeros insolubles (fracción I) se desnaturizó y solubilizó mediante la adición de 10 l de tampón de lisis celular enfriado (Triton X-100 al 1 %, desoxicolato al 0,05 %, 10 mmol/l de EDTA en solución salina tamponada con fosfato), se sometió a vortización durante 30 segundos, se sonicó en hielo durante 10 minutos y se sometió a vortización. A cada muestra soluble e insoluble, se añadieron 2,5 de tampón de muestra (50 %, 5 de tampón de muestra (dodecil sulfato de sodio al 5 %, glicerol al 50 %, 0,5 mol/l de Tris (pH 6,8)), mercaptoetanol al 10 %, ddH<sub>2</sub>O al 40 %) a un volumen del 50 % del volumen de la muestra. Las muestras se sometieron a ebullición y se cargaron para la electroforesis en gel con gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE); cantidades iguales de la proteína total hepática se cargaron por pares solubles-insolubles en experimentos cuantitativos. Se llevó a cabo la densitometría utilizando el software Image J (NIH, Bethesda, MD).

*Químicas del suero:* Se analizaron las muestras de suero mediante el UMass Mouse Phenotyping Center Analytical Core, utilizando el Analizador de Química Clínica NExCT (Alfa Wassermann Diagnostic Technologies, West Caldwell, NJ). Se analizó el suero para la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes.

*Análisis de Expresión de la micromatriz de miARN:* Se aislaron 8 µg del ARN total a partir de hígados de ratón congelados rápidamente utilizando el kit de aislamiento del miARN mirVana (Ambion). El diseño experimental incluyó seis grupos con muestras de ARN de 5 ratones cada uno que se evaluaron en matrices de un único color para un total de 30 micromatrices independientes. En resumen, el ARN se marcó con Cy5 y se hibridó en chips microfluídicos µParaFlo de micromatriz de doble canal (LC Sciences) que contenían sondas de miARN para miARN maduros de ratón disponibles en la base de datos Sanger miRBase (Release 16.0) como se ha descrito anteriormente<sup>15</sup>. Cada una de las sondas de detección punteadas consistió en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de miARN específico y un separador sin nucleótidos largos que se extendió a la secuencia específica lejos de la superficie del chip. Se recogieron imágenes de fluorescencia utilizando un barrido láser (GenePix 4000B, Molecular Device) y se digitalizaron utilizando un software de análisis de imágenes Array-Pro (Media Cybernetics). Se analizaron los datos incluyendo la sustracción del fondo, utilizando un método LOWESS (regresión ponderada localmente) sobre los datos sustraídos del fondo como se ha descrito anteriormente<sup>16</sup>. La normalización es para eliminar las variaciones relacionadas con el sistema, dichas variaciones en la cantidad de muestra, y las diferencias en la ganancia de señales de los escáneres. Se determinó la detección para ser positiva solo si los transcritos tenían una intensidad de la señal superior a 3x (SD de fondo) y una mancha VC<0,5. La VC como se calculó por (SD)/(intensidad de la señal), y en la que las sondas de repetición en la matriz produjeron señales de al menos un 50 % de las sondas de repetición por encima del nivel de detección. Los datos se representaron como un Log<sub>2</sub> de la transformación. Los datos se filtraron adicionalmente para eliminar los miARN con valores de intensidad (normalizados) por debajo de un valor umbral de 32 a través de todas las muestras. Se llevaron a cabo los test de la t entre los grupos de muestra del "control" y el "test" donde los valores T se calcularon para cada miARN, y los valores p se calcularon a partir de la distribución t teórica. Si p< 0,05, se representa gráficamente como una mancha roja en una gráfica de dispersión log.

*Los miARN artificiales son tan eficaces como los ARNhc en la regulación por defecto de la alfa-1 antitripsina in vitro*

Se ha demostrado una eficaz inactivación de Z-AAT *in vivo* e *in vitro* utilizando ARNhc expresado a partir de un promotor pol III U6 utilizando VAAr8. A fin de determinar si una solución alternativa y potencialmente más segura podría emplearse utilizando la expresión del miARN impulsada por la polimerasa II, se clonaron tres miARN distintos que se dirigían al gen AAT humano en el intrón de un promotor híbrido de la beta-actina de pollo (CB) que impulsa la expresión de GFP (Tabla 2 y Figura 1). Se llevó a cabo una comparación *in vitro* de los ARNhc impulsados por U6 utilizados anteriormente frente a los miARN impulsados por pol II en las líneas de células que expresaban el gen Pi\*Z AAT humano. Inicialmente, se observó un retraso en la inactivación de Z-AAT con los miARN a las 24 h, pero se observó una reducción eventual comparable de ~35 % en la proteína AAT secretada en 48 y 72 h para ambas construcciones en comparación con los controles de GFP (Figura 1a). Se observó una reducción similar en los niveles intracelulares de la proteína AAT evaluados a partir de aglomerados celulares a las 72 h (Figura 1b).

*Los niveles de miARN expresados en VAAr9 median en la inactivación eficaz de VAA in vivo*

Basándose en los hallazgos *in vitro*, la construcción con las tres secuencias de miARN *intrónico* (3XmiR *intrónico*) junto con las otras tres construcciones de miARN individuales dirigidas contra la Z-AAT se empaquetaron en VAAr y se ensayaron *in vivo* en los ratones transgénicos PiZ. Cinco grupos de ratones de 5 semanas de edad recibieron: rAAV9-CB-GFP, 3xmiR-GFP*intrónico* rAAV9-CB o vector con uno cualquiera de los miARN individuales mediante una inyección en la vena de la cola con 5,0x 10<sup>11</sup> partículas de vector (vps) de VAA9r. Se sangraron ratones semanalmente durante un total de 5 semanas para comprobar los niveles de Z-AAT en circulación y se sacrificaron en el día 35 posterior a la administración de un VAAr. Como se muestra en la Figura 2, los ratones recibieron 3X miARN *intrónicos* (3XmiR *intrónico*) que tenía en promedio una disminución sostenida del 50-60 % en los niveles de AAT en suero en comparación con los valores de los criterios iniciales mientras que los ratones que recibieron los únicos miARN *intrónicos* tuvieron un promedio de inactivación del 30 % en comparación con los ratones que recibieron el vector GFP del control.



Para evaluar el efecto que estaba teniendo la inactivación mediada por miARN a nivel del órgano, los hígados de estos ratones se evaluaron 5 semanas después de la administración del VAAr para la abundancia de la Z-AAT intracelular. Como se puede apreciar a partir de las inmunotinciones hepáticas de la AAT humana en la Figura 3, hubo una marcada disminución en la tinción positiva para AAT en los hígados que pertenecen a ratones en el grupo tratado con 3XmiR-GFP de VAAr9 *intrónico*. Además de la drástica reducción en la tinción positiva para AAT, hubo de igual forma una drástica disminución en los glóbulos de AAT intracelulares como se determinó por una tinción positiva PAS resistente a la diastasa (PASD). De forma importante, la reducción en la tinción PASD y hAAT se acompañó por una reducción en los foci inflamatorios en el grupo de GFP (Figura 3). Esto sugiere que la reducción en la acumulación de hAAT en los hígados de ratones PiZ puede aliviar la inflamación como se evidenció por la reducción en las infiltraciones inflamatorias.

*El inicio y el grado de inactivación son dependientes de la localización del miARN en el casete de expresión*

Aunque la administración de 3 miARN en el intrón del promotor CB fue satisfactoria en disminuir la expresión de Z-AAT, estuvo poco claro si la localización de los miARN en el casete de expresión tuvo cualquier efecto sobre su eficacia. Se investigó si la clonación de 3 miARN entre el extremo 3' del gen GFP y la cola poliA tendría un efecto sobre la cinética de la inactivación de AAT. Se evaluó igualmente si la clonación de los 3 miARN en ambas localizaciones aumentaría (*por ejemplo*, duplicaría) la cantidad de miARN que se produce y conduce a una potenciación adicional de la inactivación de AAT. Como en los experimentos anteriores, ratones Z-AAT transgénicos recibieron  $5 \times 10^{11}$  partículas de vector de vectores VAAr9 que expresaban los miARN tanto del intrón (3XmiR *intrónico*), la región poliA (PolyA-3XmiR) o en ambas localizaciones en una vez (Doble-6XmiR) (véase el diagrama en la Figura 4). El análisis de los niveles de Z-AAT en suero desveló que en cuatro semanas the *PoliA-3XmiR* y Doble-6XmiR fueron más eficaces que el vector *3XmiR intrónico* al aclarar los niveles de Z-AAT en suero en un 85-70 %, y, en algunos casos, en hasta un 95 % con el vector Doble-6XmiR (Figura 4). Se llevó a cabo el análisis de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real del tejido hepático procedente de estos ratones para evaluar la abundancia de cada uno de los tres vectores artificiales derivados de miRs (910, 914, 943). Como se ha indicado en la figura 5, los vectores PolyA-3XmiR y Doble-6XmiR produjeron aproximadamente dos veces más copias de cada uno de los miR (Figura 5).

Habiendo conseguido una inactivación a corto plazo clínicamente significativa de más del 50 % de los niveles de la proteína Z-AAT, fue necesario determinar si se sostendría su inactivación durante largos periodos de tiempo. Se administraron una vez de nuevo las tres construcciones de vectores se administraron mediante la vena de la cola a un título ligeramente mayor de  $1,0 \times 10^{12}$  partículas de vector por ratón y se controlaron los niveles de Z-AAT en suero semanalmente durante 3 meses. El inicio de la inactivación de los tres vectores varió en 7 semanas, el vector *Doble-6XmiR* consiguió un 90 % de inactivación 2 semanas después de la administración, el *PoliA-3XmiR* alcanzó esta marca en la tercera semana mientras que el *3XmiR intrónico* permaneció en el intervalo de 50-65 % de inactivación durante las primeras 7 semanas (Figura 6a). Se llevó a cabo el análisis adicional de los homogenados de hígado para determinar si esta reducción estaba en los combinados de monómeros o polímeros de Z-AAT en todos los grupos. Las fracciones de Z-AAT de monómeros y polímeros se separaron en condiciones no desnaturizantes tras lo cual, las fracciones se desnaturizaron y se evaluaron cuantitativamente mediante inmunotinción. Se observó una reducción en todos los grupos en el combinado monomérico 3 meses después del tratamiento del miARN. El análisis densitométrico de las bandas mostró significativas diferencias en el *PoliA-3XmiR* y Doble-6XmiR en comparación con ratones tratados con un vector del control (Figura 6 b-d). Esta inactivación observada a las dos semanas en la Figura 6a estuvo acompañada por una reducción significativa en la ALT y AST en suero en el grupo *Doble-6XmiR* con claras tendencias de disminución en los otros dos grupos que expresan un miR anti-AAT (Figura 6e y 6f). Aunque los niveles de Z-AAT aumentaron ligeramente en los animales de los grupos *Doble-6XmiR* y *PoliA-3XmiR* entre las semanas 7 y 13, los tres vectores se estabilizaron a un nivel sostenido de aproximadamente un 75 % de inactivación de Z-AAT durante el resto del estudio (Figura 6).

*Administración in vitro de los miARN contra Z-AAY y corrección génica con M-AAT utilizando un único vector*

Un vector de doble función que aumentaría simultáneamente los niveles de proteína de la proteína M-AAT natural, abordando por tanto la enfermedad hepática producida por la ganancia de funciones *tóxica* de los polímeros Z-AAT y la *pérdida de funciones* producida por M-AAT en circulación, se evaluó. Para conseguir esto, se substituyó el gen GFP con un gen AAT natural que tenía cambios de pares de bases silenciosos en los sitios diana del miARN, haciéndolo de esta manera impermeable a la inactivación mediada por miARN. Se transfectaron simultáneamente células HEK-293 con dos plásmidos, uno de los plásmidos expresó Z-AAT y el otro fue cualquiera del *Doble-6XmiR-GFP*, *Doble-6XmiR-AAT* (que contienen el gen AAT reforzado, inactivado-impermeable) o un control. Las células transfectadas se incubaron durante 72 h y se recogió el ARN de los aglomerados celulares para un análisis de la RT-PCR de los transcritos Z-AAT y M-AAT. El análisis de los niveles del ARNm de Z-AAT desveló los *Doble-6XmiR-GFP* y *Doble-6XmiR-AAT* produjo una inactivación significativa de hasta 37 veces en las copias de ARNm de Z-AAT mRNA en comparación para las células transfectada de forma simulada (Figura 7a). Además, la RT-PCR cuantitativa de los transcritos de MAAT naturales procedentes del mismo combinado de ARN, desveló que la construcción *Doble-6XmiR-AAT* reguló en exceso la expresión de M-AAT en más de 100 veces sobre los niveles endógenos observados en las células transfectadas del control (Figura 7b).

*Administración in vivo de vectores de doble función*

Tomando en consideración los hallazgos *in vitro* así como el inicio más rápido y la variabilidad disminuida en la inactivación observada con los vectores *Doble-6XmiR* y *PoliA-3XmiR* (Figura 6), se ensayaron ambas configuraciones como vectores de doble función *in vivo*. Tres cohortes de siete ratones cada una se dosificaron con  $1,0 \times 10^{12}$  partículas de vector con cualquiera de un control de GFP, *Doble-6XmiR-CB-AAT* o vectores *PoliA-3XmiR-CB-AAT* de VAAr9. Se recogió el suero semanalmente de los ratones durante 13 semanas y se analizó para los niveles de X-AAT en suero con un ELISA específico de PiZ y para los niveles de M-AAT con un ELISA que detectaba la etiqueta CMYC en el ADNc de M-AAT. Los cambios en los niveles de Z-AAT en suero fueron comparables a los experimentos anteriores, con una inactivación sostenida alrededor del 75-85 % para ambos vectores (Figura 8a, panel inferior). Se observó un inicio más rápido de la inactivación con el vector *Doble-6XmiR* pero el vector *PolyA-3XmiR* alcanzó una inactivación similar en la cuarta semana. A medida que progresó la inactivación de Z-AAT, se observó un aumento simultáneo en la M-AAT en circulación de ratones que recibieron los vectores de doble función (Figura 8a, panel superior).

Sorprendentemente, aunque la inactivación de ambos vectores fue similar cuatro semanas después de la administración, la producción de M-AAT fu sustancialmente diferente. El vector *PoliA-3XmiR-CB-AAT* produjo 8-10 veces más M-AAT que el vector *Doble-6XmiR-CB-AAT*. Se extrajo el ARN del hígado de estos ratones al final del estudio para cuantificar los niveles de ARNm de Z-AAT y M-AAT. Se produjo una repentina disminución en el ARNm de Z-AAT en ambas cohortes de ratones que recibieron vectores con miARN en comparación con ratones que recibieron un control de rAAV9-CB-GFP (Figura 8B). Se llevó a cabo también la RT-PCR para M-AAT, para verificar la producción de M-AAT al nivel del ARN y para determinar si la diferencia en la producción de M-AAT entre los vectores de doble función estaba relacionada con la transcripción del ARNm. A pesar de la clara diferencia en los niveles de proteína M-AAT en suero, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ARNm de M-AAT entre los dos grupos (Figura 8 C). Esto indica que el procesamiento y la traducción del ARNm, pero no el nivel de la transcripción puede verse afectado en el grupo *Doble-6XmiR-CB-AAT*, en algunos casos.

*Análisis de los perfiles globales del miARN hepático tras la administración de mi ARN artificiales con VAAr9*

Se llevó a cabo un análisis de la micromatriz de los miARN endógenos de rató procedentes del tejido hepático para los 6 grupos de ratones con 5 ratones por grupo en 30 chips microfluídicos separados utilizando las muestras obtenidas de los experimentos de inactivación a largo plazo de Z-AAT (Figura 6) junto con los 5 ratones AAT transgénicos sin tratar y los 5 ratones C57/BL6. A fin de determinar las diferencias basales impartidas por el gen Z-AAT humano en ratones, se llevó a cabo una comparación inicial entre ratones PiZ sin tratar y ratones C57BL6 silvestres. Como se muestra en la Figura 9a y en la Tabla 3, hubo solo 4 diferencias estadísticamente significativas entre estos ratones con únicamente miR-1 que tenían una relación log<sub>2</sub> mayor de 2, regulándose en exceso en ratones PiZ. Se compararon los efectos de rAAV9-CB-GFP, rAAV9-*Doble-6XmiR-CB-GFP*, rAAV9-*PolyA-3XmiR-CB-GFP* y la transducción en hígado del rAAV9-*3XmiR-CB-GFP* *intrónico* en los perfiles del miARN hepático. Sorprendentemente, la expresión de los MiARN derivados del vector artificial tuvo un mínimo impacto sobre los perfiles globales del miARN (véase la Figura 9b-d). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones PiZ sin tratar y los ratones tratados con VAAr9 en 2-6 miARN expresados de forma diferencial. De estos miARN expresados de forma diferencial, el que tuvo el cambio más grande fue miR-1 donde se la regulación de nuevo a los niveles observados en el C57B16. Esta corrección de la regulación en exceso de miR-1 en ratones PiZ se observó en todos los grupos, incluyendo los ratones que recibieron solo rAAV9-GFP. Por lo tanto, parece ser dependiente de la administración de VAAr9 y no de la administración de miAR artificial.

Los resultados presentados en estos ejemplos describen un enfoque terapéutico combinatorio para el tratamiento de enfermedades tanto hepáticas como pulmonares que presentan deficiencia de alfa-1 antitripsina. Este enfoque terapéutico está basado en un único vector VAA de doble función para administrar ambos miARN que dirigen AAT para el aclaramiento del ARNm mutante junto con un ADNc de AAT resistente a miARN para el aumento de la proteína natural. Los datos presentados en el presente documento respaldan este enfoque, ya que las actividades moduladoras de los miARN se demuestran tanto en los experimentos con cultivos celulares, como *in vivo* después de numerosos experimentos con administración de vectores AAVr9 pseudotipificados en la vena de la cola. Dependiendo de la configuración de los miARN, se consiguió de una forma consistente una inactivación a largo plazo de Z-AAT en suero en circulación en un intervalo del 50-95 %. Además, en el caso de los vectores de doble función, esta inactivación va acompañada de una expresión y secreción igualmente sostenida del M-AAT natural.

La inactivación de la proteína Z-AAT mutante se observó en ratones transgénicos PiZ usando un vector VAAr8 que expresa ARNhc impulsados por U6. Los experimentos con cultivos celulares iniciales determinaron que, en 72 horas, la eficacia de los miARN utilizados en este estudio era comparable a la de los ARNhc (Figura 1). Los experimentos *in vivo* descritos en el presente documento corroboran este hallazgo, ya que se observó una disminución significativa de Z-AAT tras la administración del vector VAAr9 rAAV9-CB-*intrónico*3xmiR-GFP (Figura 2). Estos experimentos también destacan un efecto mejorado que se obtuvo usando 3 miARN con diferentes secuencias diana, ya que ninguno de los vectores con un solo miARN consiguió el nivel de inactivación observada cuando se administraron juntos (Figura 2). Otro efecto biológico además de la reducción de Z-AAT en suero que se observó incluyó una

disminución significativa y extensa en la acumulación de Z-AAT dentro de los hepatocitos y una reducción de los foci de linfocitos inflamatorios dentro del hígado (Figura 3).

5 Sorprendentemente, la eficacia del miARN anti-AAT mejoró alterando la ubicación del miARN dentro del casete de expresión. Los experimentos realizados a corto plazo demostraron que la expresión de los miARN del extremo 3' del gen GFP, en lugar de los procedentes del intrón del promotor CB, producen un aumento del 25 % en las capacidades de silenciamiento de los miARN u también a una disminución significativa en la variabilidad de este efecto. Además, la duplicación de la dosis eficaz de miARN por vector, expresando los miARN desde ambas ubicaciones, condujo a un inicio más rápido de la inactivación de Z-AAT (Figura 4). Por otra parte, se observó un aumento en la producción de miARN en ambos vectores *PolyA-3XmiR-CB-GFP* y *Doble-6XmiR-CB-GFP* en comparación con el vector *rAAV9-intrónico3xmiR-GFP*. Esto indica que, en algunas realizaciones, el procesamiento del miARN desde el intrón del promotor CB puede no ser tan eficaz como desde el extremo 3' del gen GFP. En otras realizaciones, los experimentos a largo plazo demostraron que las diferencias cinéticas iniciales en la inactivación procedente de los tres vectores disminuye con el tiempo y en un plazo de ocho semanas, el *3xmiR intrónico-GFP* disminuye en variabilidad y aumenta en eficacia de silenciamiento.

La potencia y estabilidad de la disminución de Z-AAT en suero observada *in vivo* sugiere que cualquiera de estos valores disminuye los niveles de Z-AAT en pacientes Pi\*ZZ hasta niveles terapéuticos, incluso por debajo de los observados en pacientes Pi\*MZ heterocigóticos. Sin embargo, en algunos casos, se conseguiría un beneficio clínico máximo de un aumento simultáneo de M-AAT en circulación. A este respecto, se diseñaron vectores de funcionalidad doble para suministrar también un ADNc de M-AAT resistente a miARN. Los experimentos con cultivos celulares demostraron la factibilidad de esta estrategia, como se muestra por una disminución del ARNm específico de Z-AAT con un aumento simultáneo de M-AAT usando un único plásmido provírico (Figura 7). Estos experimentos respaldaron un estudio *in vivo* de los vectores de función doble. Los resultados de estos experimentos confirmaron los datos *in vitro*, demostrando claramente la factibilidad de la inactivación y aumento concomitante de la proteína mutante y natural, respectivamente. Estos experimentos también revelaron que la doble configuración de los miARN tiene un inicio más rápido de la inactivación de Z-AAT, pero la eficacia global con el tiempo era comparable al vector *PolyA-3XmiR-CB-AAT* vector. Además de una mejora en la cinética de inactivación del vector *Doble-6XmiR-CB-AAT*, también se observó una disminución en la producción de M-AAT (Figura 8a). Inicialmente, se teorizó que esto podría ser un resultado de la disminución en la producción de ARNm de M-AAT debido a la presencia de miARN dentro del intrón de esta construcción, pero como se muestra en la Figura 8c, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en el ARNm de M-AAT entre estos dos grupos. Aunque la transcripción y la estabilidad del ARNm no se ve afectada por la presencia de los miARN en el interior del intrón, su traducción a proteínas puede quedar impedida, como se observa en la disminución de los niveles de M-AAT en circulación en el suero de estos ratones.

A tener en cuenta para la terapia clínica es el efecto de la expresión de un miARN artificial sobre los perfiles del miARN endógenos del órgano diana. Para determinar si el VAAr9 expresaba miARN anti-AAT alteraban los perfiles del miARN en el hígado, se cuestionaron los hígados de 30 ratones al final del estudio descrito en la Figura 6 con una micromatriz de miARN. Como puede observarse en la Figura 9, ni la administración de rAAV9-GFP ni la de los vectores que expresaban miARN tuvieron un impacto significativo sobre los perfiles de miARN. De manera destacable, mir-122, que es el miARN más producido en el hígado quedó inalterado en cualquier grupo. Aunque se ha descubierto que algunos miARN se expresaban en niveles estadísticamente diferentes entre los grupos, estaban principalmente en el límite de las 2 veces de cambio con una excepción. Curiosamente, mir-1 pareció tener de forma consistente más de 2 veces de cambio con la intervención de VAAr9. En el caso de este miARN, las veces de cambio con la intervención del VAAr estuvieron en la dirección de revertir los niveles a los encontrados en los ratones C57BL6 silvestres (Figura 9a). De este modo, en resumen, los perfiles de miARN quedaron inalterados y, en algunos casos, 'corregidos' de vuelta a los niveles naturales con la administración del VAAr9.

Estos hallazgos indican que otras patologías que requieren la combinación entre un aumento de un alelo funcional y la supresión de un alelo mutante se pueden abordar de una forma similar. Uno de estos ejemplos es la enfermedad de Huntington (HD), en la que los alelos mutantes producen una enfermedad autosómica dominante grave, pero en la que una inactivación específica de alelo solamente sería factible si el alelo funcional se modificara para transmitir resistencia a una inactivación basada en miARN. Esto significa que estas manipulaciones dan como resultado perturbaciones mínimas en los perfiles de miARN endógeno. Esto es potencialmente importante para tener en cuenta la seguridad de los enfoques basados en miARN con un solo agente, que sería de utilidad en otras terapias con antivirales, por ejemplo, terapias dirigidas contra el VHB o el VHC. Como en el caso de las enfermedades genéticas anteriormente citadas, existen dolencias en las que la regulación por defecto de los genes diana durante periodos de tiempo prolongados puede suponer una ventaja. Por lo tanto, la aparición de una plataforma de miARN basada en VAAr como medio de abordar estos problemas también sería útil.

60

Tabla 2 Secuencias de miARN artificiales

miRNA910 (SEQ ID NO: 21) 5'- TAAGCTGGCAGACCTTCTGTCGTTTTGGCCACTGAGTGACGACAGAAGCTGCCA GCTTA
miRNA914 (SEQ ID NO: 22) 5'- AATGTAAGCTGGCAGACCTTCGTTTTGGCCACTGACTGACGAAGGTCTCAGCTT ACATT
miRNA943 (SEQ ID NO: 23) 5'- ATAGGTTCCAGTAATGGACAGGTTTGGCCACTGACTGACCTGTCCATCTGGAAC CTAT

Tabla 3 Cambios estadísticamente significativos en los perfiles de los miARN hepáticos

		Grupo 1	Grupo 2	
		B6 Control	PiZ Control	
Nombre del indicador	valor p	Intensidad media (n=5)	Intensidad media (n=5)	Log2 (G2/G1)
mmu-miR-762	2,39E-02	525	1.099	1,07
mmu-miR-23a	4,03E-02	1.247	1.593	0,35
mmu-miR-1	4,95E-02	126	2.776	4,46
mmu-miR-341 *	4,97E-02	4.340	2.287	-0,92
		PiZ-GFP	PiZ Control	
mmu-miR-1	6,03E-03	5	2,776	9,13
mmu-miR-148a	7,48E-03	1.841	1.058	-0,80
mmu-miR-720	9,33E-03	1.264	3.440	1,44
mmu-miR-30c	1,03E-02	2.830	1.757	-0,69
mmu-miR-146a	1,71E-02	362	175	-1,05
mmu-miR-30d	4,64E-02	627	454	-0,47
		PiZ PoliA	Piz Control	
mmu-miR-2145	1,40E-02	573	114	-2,32
mmu-miR-1	2,82E-02	22	2.776	6,95
mmu-miR-690	2,41E-02	3,071	534	-2,52
mmu-miR-720	4,31E-02	1.816	3.440	0,92
mmu-miR-146a	1,53E-02	445	175	-1,35
mmu-miR-1	3,04E-02	115	2.776	4,59

5 REFERENCIAS

1. Propst, T. et al. Prevalence of hepatocellular carcinoma in alpha-1-antitrypsin deficiency. J Hepatol 21, 1006-11 (1994).
2. Sivasothy, P., Dafforn, T.R., Gettins, P.G. & Lomas, D.A. Pathogenic alpha 1-antitrypsin polymers are formed by reactive loop-beta-sheet A linkage. J Biol Chem 275, 33663-8 (2000).
3. Lomas, D.A., Evans, D.L., Finch, J.T. & Carrell, R.W. The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver [see comments]. Nature 357, 605-7 (1992).
4. Brantly, M.L. et al. Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 alpha1-antitrypsin (AAT) vector in AAT-deficient adults. Hum Gene Ther 17, 1177-86 (2006).
5. Flotte, T.R. et al. Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-

- antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther* 15, 93-128 (2004).
6. Zern, M.A. et al. A novel SV40-based vector successfully transduces and expresses an alpha 1-antitrypsin ribozyme in a human hepatoma-derived cell line. *Gene Ther* 6, 114-20 (1999).
7. Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11 (1998).
- 5 8. Cruz, P.E. et al. In vivo post-transcriptional gene silencing of alpha-1 antitrypsin by adeno-associated virus vectors expressing siRNA. *Lab Invest* 87, 893-902 (2007).
9. Grimm, D. et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537-41 (2006).
- 10 10. McBride, J.L. et al. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 5868-73 (2008).
11. Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. & Hannon, G.J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-5 (2004).
12. Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. & Bartel, D.P. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18, 1187-97 (2004).
- 15 13. Gao, G.P. et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11854-9 (2002).
14. Li, H. et al. Ex vivo transduction and transplantation of bone marrow cells for liver gene delivery of alpha1-antitrypsin. *Mol Ther* 18, 1553-8 (2010).
- 20 15. Gao, X., Gulari, E. & Zhou, X. In situ synthesis of oligonucleotide microarrays. *Biopolymers* 73, 579-96 (2004).
16. Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M. & Speed, T.P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19, 185-93 (2003).
17. Naldini, L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nature Reviews Genetics* 12, 301-315 (2011).
- 25 18. Loiler, S.A., Conlon, T.J., Song, S., Tang, Q., Warrington, K.H., Agarwai, A., Kapturczak, M., Li, C., Ricordi, C., Atkinson, M.A., Muzyczka, N., and Flotte, T.R. Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver *Gene Therapy* (2003) 10, 1551-1558).

30 Como se usa en el presente documento, los términos "aproximadamente" o "casi" en referencia a un número deben tomarse generalmente para incluir números comprendidos en un intervalo de 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, o 20 % en cualquier dirección (mayor o menor) respecto del número salvo que se indique otra cosa o sea evidente otra cosa según el contexto (salvo donde dicho número fuera menor del 0 % o excediera un 100 % del un posible valor).

35 El uso de términos ordinales tales como "primero", "segundo", "tercero", etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de una reivindicación no denota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia, u orden de un elemento reivindicado respecto de otro, o un orden temporal para llevar a cabo los actos de un método, sino que se utilizan simplemente como etiquetas para distinguir un determinado elemento que tiene un determinado nombre de otro elemento que tiene el mismo nombre (salvo por el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de la reivindicación.

40

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> University of Massachusetts  
Flotte, Terence  
45 Mueller, Christian

<120> COMPOSICIONES BASADAS EN VAAR Y MÉTODOS PARA TRATAR DEFICIENCIAS DE ALFA-1 ANTI-TRIPSINA

50 <130> U0120.70052WO00

<140> Sin asignación, aún  
<141> 20/04/2012

55 <150> US 61/477.671  
<151> 21/04/2011

<160> 32

60 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 418  
<212> PRT

65 <213> Homo sapiens

ES 2 661 680 T3

<400> 1

Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys  
 1 5 10 15

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala  
 20 25 30

Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn  
 35 40 45

Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln  
 50 55 60

Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser  
 65 70 75 80

Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr  
 85 90 95

His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro  
 100 105 110

Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn  
 115 120 125

Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu  
 130 135 140

ES 2 661 680 T3

Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys  
145 150 155 160

Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu  
165 170 175

Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys  
180 185 190

Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu  
195 200 205

Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val  
210 215 220

Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val  
225 230 235 240

Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys  
245 250 255

Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala  
260 265 270

Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu  
275 280 285

Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp  
290 295 300

Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr  
305 310 315 320

Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe  
325 330 335

Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys  
340 345 350

Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly  
355 360 365

Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile  
370 375 380

Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu

ES 2 661 680 T3

385					390						395					400
Gln	Asn	Thr	Lys	Ser	Pro	Leu	Phe	Met	Gly	Lys	Val	Val	Asn	Pro	Thr	
				405					410					415		

Gln Lys

- <210> 2
- <211> 394
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2



ES 2 661 680 T3

Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu  
 20 25 30  
 Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr  
 35 40 45  
 Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu  
 50 55 60  
 Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe  
 85 90 95  
 Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu  
 100 105 110  
 Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp  
 115 120 125  
 Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr  
 130 135 140  
 Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr  
 145 150 155 160  
 Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu  
 165 170 175  
 Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly

ES 2 661 680 T3

			180						185						190
Lys	Trp	Glu	Arg	Pro	Phe	Glu	Val	Lys	Asp	Thr	Glu	Glu	Glu	Asp	Phe
		195					200					205			
His	Val	Asp	Gln	Val	Thr	Thr	Val	Lys	Val	Pro	Met	Met	Lys	Arg	Leu
	210						215				220				
Gly	Met	Phe	Asn	Ile	Gln	His	Cys	Lys	Lys	Leu	Ser	Ser	Trp	Val	Leu
225					230					235					240
Leu	Met	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asn	Ala	Thr	Ala	Ile	Phe	Phe	Leu	Pro	Asp
				245					250					255	
Glu	Gly	Lys	Leu	Gln	His	Leu	Glu	Asn	Glu	Leu	Thr	His	Asp	Ile	Ile
			260					265					270		
Thr	Lys	Phe	Leu	Glu	Asn	Glu	Asp	Arg	Arg	Ser	Ala	Ser	Leu	His	Leu
		275					280					285			
Pro	Lys	Leu	Ser	Ile	Thr	Gly	Thr	Tyr	Asp	Leu	Lys	Ser	Val	Leu	Gly
	290					295					300				
Gln	Leu	Gly	Ile	Thr	Lys	Val	Phe	Ser	Asn	Gly	Ala	Asp	Leu	Ser	Gly
305					310					315					320
Val	Thr	Glu	Glu	Ala	Pro	Leu	Lys	Leu	Ser	Lys	Ala	Val	His	Lys	Ala
				325					330					335	
Val	Leu	Thr	Ile	Asp	Glu	Lys	Gly	Thr	Glu	Ala	Ala	Gly	Ala	Met	Phe
			340					345					350		
Leu	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Ser	Ile	Pro	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Lys
		355					360					365			
Pro	Phe	Val	Phe	Leu	Met	Ile	Glu	Gln	Asn	Thr	Lys	Ser	Pro	Leu	Phe
	370					375					380				
Met	Gly	Lys	Val	Val	Asn	Pro	Thr	Gln	Lys						
385					390										

<210> 3  
 <211> 418  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

5

ES 2 661 680 T3

**Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys**

1					5						10					15			
Cys	Leu	Val	Pro	Val	Ser	Leu	Ala	Glu	Asp	Pro	Gln	Gly	Asp	Ala	Ala				
			20					25					30						
Gln	Lys	Thr	Asp	Thr	Ser	His	His	Asp	Gln	Asp	His	Pro	Thr	Phe	Asn				
		35					40					45							
Lys	Ile	Thr	Pro	Asn	Leu	Ala	Glu	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Tyr	Arg	Gln				
	50					55					60								
Leu	Ala	His	Gln	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Ile	Phe	Phe	Ser	Pro	Val	Ser				
65					70					75					80				
Ile	Ala	Thr	Ala	Phe	Ala	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Ala	Asp	Thr				
				85					90					95					
His	Asp	Glu	Ile	Leu	Glu	Gly	Leu	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Pro				
			100					105					110						
Glu	Ala	Gln	Ile	His	Glu	Gly	Phe	Gln	Glu	Leu	Leu	Arg	Thr	Leu	Asn				
		115					120					125							
Gln	Pro	Asp	Ser	Gln	Leu	Gln	Leu	Thr	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Phe	Leu				
	130					135					140								
Ser	Glu	Gly	Leu	Lys	Leu	Val	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Lys				
145					150					155					160				
Leu	Tyr	His	Ser	Glu	Ala	Phe	Thr	Val	Asn	Phe	Gly	Asp	Thr	Glu	Glu				
				165					170					175					
Ala	Lys	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Tyr	Val	Glu	Lys	Gly	Thr	Gln	Gly	Lys				
			180					185					190						
Ile	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Glu	Leu	Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Phe	Ala	Leu				
		195					200					205							
Val	Asn	Tyr	Ile	Phe	Phe	Lys	Gly	Lys	Trp	Glu	Arg	Pro	Phe	Glu	Val				
	210					215					220								
Lys	Asp	Thr	Glu	Glu	Glu	Asp	Phe	His	Val	Asp	Gln	Val	Thr	Thr	Val				
225					230					235					240				
Lys	Val	Pro	Met	Met	Lys	Arg	Leu	Gly	Met	Phe	Asn	Ile	Gln	His	Cys				
				245					250					255					

ES 2 661 680 T3

Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala  
 260 265 270

Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu  
 275 280 285

Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp  
 290 295 300

Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr  
 305 310 315 320

Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe  
 325 330 335

Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys  
 340 345 350

Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Lys Lys Gly  
 355 360 365

Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile  
 370 375 380

Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu  
 385 390 395 400

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr  
 405 410 415

Gln Lys

5 <210> 4  
 <211> 394  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 4

Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His  
 1 5 10 15

Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu  
 20 25 30

Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr  
 35 40 45

ES 2 661 680 T3

Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu  
 50 55 60

Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu  
 65 70 75 80

Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe  
 85 90 95

Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu  
 100 105 110

Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp  
 115 120 125

Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr  
 130 135 140

Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr  
 145 150 155 160

Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu  
 165 170 175

Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly  
 180 185 190

Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe  
 195 200 205

His Val Asp Gln Val Thr Thr Val Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu  
 210 215 220

Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu  
 225 230 235 240

Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp  
 245 250 255

Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile  
 260 265 270

Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu  
 275 280 285

Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly  
 290 295 300

ES 2 661 680 T3

Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly  
305 310 315 320

Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala  
325 330 335

Val Leu Thr Ile Asp Lys Lys Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe  
340 345 350

Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys  
355 360 365

Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe  
370 375 380

Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys  
385 390

<210> 5  
<211> 1257  
<212> ARN  
<213> Homo sapiens

5

<400> 5

ES 2 661 680 T3

augccgucuu cugucucgug gggcauccuc cugcuggcag gccugugcug ccuggucccu 60  
 gucucccugg cugaggaucc ccagggagau gcugcccaga agacagauac aucccaccau 120  
 gaucaggaucc acccaaccuu caacaagaucc accccaacc uggcugaguu cgccuucagc 180  
 cuauaccgcc agcuggcaca ccaguccaac agcaccaaua ucuucucuc cccagugagc 240  
 aucgcuacag ccuuugcaau gcucucccug gggaccaagg cugacacuca cgaugaauc 300  
 cuggagggcc ugaauuucaa ccucacggag auuccggagg cucagaucua ugaaggcuuc 360  
 caggaacucc uccguaccuu caaccagcca gacagccagc uccagcugac caccggcaau 420  
 ggccuguucc ucagcgaggg ccugaagcua guggauaagu uuuuggagga uguuaaaaag 480  
 uuguaccacu cagaagccuu cacugucaac uucggggaca ccgaagaggc caagaaacag 540  
 aucaacgauu acguggagaa ggguacucua gggaaaauug uggauuuggu caaggagcuu 600  
 gacagagaca caguuuuugc ucuggugaau uacaucucuu uuaaaggcaa augggagaga 660  
 cccuuugaag ucaaggacac cgaggaagag gacuuccacg uggaccaggu gaccaccgug 720  
 aaggugccua ugauagaagcg uuuaggcaug uuuaacaucc agcacuguaa gaagcugucc 780  
 agcugggugc ugcugaugaa auaccugggc aaugccaccg ccaucucuu ccugccugau 840  
 gaggggaaac uacagcaccu ggaaaaukaa cucaccacg auaucaucac caaguuccug 900  
 gaaaauugaag acagaagguc ugccagcuua cauuuaccca aacuguccau uacuggaacc 960  
  
 uaugaucuga agagcguccu gggucaacug ggcaucacua aggucucag caauggggcu 1020  
 gaccucuccg gggucacaga ggaggcacc cugaagcucu ccaaggccgu gcauaaggcu 1080  
 gugcugacca ucgacgagaa agggacugaa gcugcugggg ccauguuuuu agaggccaau 1140  
 cccaugucua uccccccga ggucaaguuc aacaaaccuu uugucucuu aaugauugaa 1200  
 caaaauacca agucuccccu cuucauggga aaagugguga auccaccca aaaauaa 1257

<210> 6  
 <211> 3220  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

ES 2 661 680 T3

acaaugacuc	cuuucgguaa	gugcagugga	agcuguacac	ugcccaggca	aagcguccgg	60
gcagcguagg	cgggcgacuc	agaucaccagc	caguggacuu	agccccuguu	ugcuccuccg	120
auaacugggg	ugaccuuggu	uaauauucac	cagcagccuc	ccccguugcc	ccucuggauc	180
cacugcuuaa	auacggacga	ggacagggcc	cugucuccuc	agcuucaggc	accaccaacug	240
accugggaca	gugaaucgac	aaugccgucu	ucugucucgu	ggggcauccu	ccugcuggca	300
ggccugugcu	gccugguccc	ugucucccug	gcugaggau	cccagggaga	ugcugcccag	360
aagacagaua	caucccacca	ugaucaggau	caccacaaccu	ucaacaagau	cacccccaac	420
cuggcugagu	ucgccuucag	ccuauaccgc	cagcuggcac	accaguccaa	cagcaccaau	480
aucuucuucu	ccccagugag	caucgcuaca	gccuuugcaa	ugcucucccu	ggggaccaag	540
gcugacacuc	acgaugaaau	ccuggagggc	cugaauuua	accucacgga	gauuccggag	600
gcucagauc	augaaggcuu	ccaggaacuc	cuccguacc	ucaaccagcc	agacagccag	660
cuccagcuga	ccaccggcaa	uggccuguuc	cucagcgagg	gccugaagcu	aguggauaag	720
uuuuuggagg	auguuaaaaa	guuguaccac	ucagaagccu	ucacugucua	cuucggggac	780
accgaagagg	ccaagaaaca	gaucaacgau	uacguggaga	aggguacuca	agggaaaauu	840
guggauuugg	ucaaggagcu	ugacagagac	acaguuuuug	cucuggugaa	uuacaucuu	900
uuuaaaggca	aaugggagag	acccuuugaa	gucaaggaca	ccgaggaaga	ggacuuccac	960
guggaccagg	ugaccaccgu	gaaggugccu	augaugaagc	guuuaggcau	guuuacauc	1020
cagcacugua	agaagcuguc	cagcugggug	cugcugauga	aauaccuggg	caaugccacc	1080
gccaucuucu	uccugccuga	ugaggggaaa	cuacagcacc	uggaaaauga	acucaccacc	1140
gauaucauca	ccaaguuccu	ggaaaugaa	gacagaaggu	cugccagcuu	acauuuacc	1200
aaacugucca	uuacuggaac	cuaugaucug	aagagcgucc	ugggucaacu	gggcaucacu	1260
aaggucuuca	gcaauggggc	ugaccucucc	ggggucacag	aggaggcacc	ccugaagcuc	1320
uccaaggccg	ugcauaaggc	ugugcugacc	aucgacgaga	aagggacuga	agcugcuggg	1380



ES 2 661 680 T3

gccauguuuu uagaggccau acccaugucu aucccccccg aggucaaguu caacaaaccc 1440  
uuugucuucu uaaugauuga acaaaauacc aagucucucc ucuucauggg aaaaguggug 1500  
aaucccacc aaaaauaacu gccucucgcu ccucaacccc uccccuccau ccucggcccc 1560  
cucccuggau gacauuaaag aaggguuag cuggucccug ccugcaugug acuguaaac 1620  
ccucccaugu uuucucugag ucucccuug ccugcugagg cuguaugugg gcuccaggua 1680  
acagugcugu cuucgggccc ccugaacugu guucauggag caucuggcug gguaggcaca 1740  
ugcugggcuu gaauccaggg gggacugaau ccucagcuua cggaccuggg cccaucuguu 1800  
ucuggagggc uccagucuuu cuuguccugu cuuggagucc ccaagaagga aucacagggg 1860  
aggaaccaga uaccagccau gaccccaggc uccaccaagc aucuucaugu cccccugcuc 1920  
auccccacu cccccacc cagaguugcu cauccugcca gggcuggcug ugcccacccc 1980  
aaggcugccc uccugggggc ccagaacug ccugaucgug ccguggccca guuuuguggc 2040  
aucugcagca acacaagaga gaggacaau uccuccucuu gaccgcugu caccuaacca 2100  
gacucgggcc cugcaccucu caggcacuuc uggaaauga cugaggcaga uucuuccuga 2160  
agcccauucu ccauggggca acaaggacac cuauucuguc cuuguccuuc caucgcugcc 2220  
ccagaaagcc ucacauaucu ccguuuagaa ucaggucccu ucuccccaga ugaaggagg 2280  
ggucucugcu uuguuuucuc uaucuccucc ucagacuuga ccaggcccag caggcccag 2340  
aagaccauua ccuauauacc cuucuccucc cuagucacau ggccauaggc cugcugaugg 2400  
cucaggaagg ccauugcaag gacuccucag cuaugggaga ggaagcacau cacccauuga 2460  
cccccgcaac cccuccuuu ccuccucuga gucccgacug gggccacaug cagccugacu 2520  
ucuuugugcc uguugcuguc ccugcagucu ucagagggcc accgcagcuc cagugccacg 2580  
gcaggaggcu guuccugaau agccccugug guaagggccca ggagaguccu uccauccucc 2640  
aaggcccugc uaaaggacac agcagccagg aagucccug gggcccuagc ugaaggacag 2700  
ccugcucccu ccgucucucac caggauggc cuuguccuau ggaaggcacu gcccacucc 2760  
aaacuaaucu aggaaucacu gucuaaccac ucacugucou gaauuguguac uuaaaggau 2820  
agguugaguc auaccaaaau gugauuucga uaguucaaaa uggugaaau agcaauucua 2880  
caugauucag ucuaaucaau ggauaccgac uguuucccac acaagucucc uguucucua 2940  
agcuuacuca cugacagccu uucacucucc acaaaucacu uaaagauaug gccaucacca 3000  
agccccuag gaugacacca gaccugagag ucugaagacc uggauccaag uucugacuuu 3060  
ucccccugac agcuguguga ccuucguga gucgccaaac cucucugagc cccagucuu 3120  
gcuaguaaga ccugccuuug aguugguau auguucuaagu uagauaaca aauguuuaa 3180  
cccauuaaga cagagaauaa auagaacuac auuucuuuca 3220

## ES 2 661 680 T3

<210> 7  
<211> 3513  
<212> ARN  
<213> Homo sapiens

5

<400> 7

ES 2 661 680 T3

ugggcaggaa cugggcacug ugcccagggc augcacugcc uccacgcagc aaccucaga 60  
 guccugagcu gaaccaagaa ggaggagggg gucgggccuc cgaggaaggc cuagccgcug 120  
 cugcugccag gaauuccagg ugggaggggc ggcaaccucc ugccagccuu caggccacuc 180  
 uccugugccu gccagaagag acagagcuug aggagagcuu gaggagagca ggaaagggcg 240  
 gcaguaaguc uucagcauca ggcauuuugg ggugacucag uaaaugguag aucuugcuac 300  
 caguggaaca gccacuaagg auucugcagu gagagcagag ggccagcuaa gugguacucu 360  
 cccagagacu gucugacuca cgccaccccc uccaccuugg acacaggacg cugugguuuc 420  
 ugagccaggu acaaugacuc cuuucgcagc cucccccguu gcccucucug auccacugcu 480  
 uaaaucgga cgaggacagg gccucuguc cucagcuuca ggcaccacca cugaccuggg 540  
 acagugaauc gacaaugccg ucuucugucu cguggggcau ccuccugcug gcaggccugu 600  
 gcugccuggu ccugucucc cuggcugagg aucccaggg agaugcugcc cagaagacag 660  
 auacaucca ccaugaucag gaucacccaa ccuucacaa gaucaccccc aaccuggcug 720  
 aguucgccuu cagccuauac cgccagcugg cacaccaguc caacagcacc aaauucuucu 780  
 ucuccccagu gagcaucgcu acagccuuug caaugcucuc ccuggggacc aaggcugaca 840  
 cucacgauga aauccuggag ggccugaauu ucaaccucac ggagauuccg gaggcucaga 900  
 uccaugaagg cuuccaggaa cuccucogua ccucaacca gccagacagc cagcuccagc 960  
 ugaccaccgg caauggccug uuccucagcg agggccugaa gcuaguggau aaguuuuugg 1020  
 aggauguuaa aaaguuguac cacucagaag ccuucacugu caacuucggg gacaccgaag 1080  
 aggccaaгаа acagaucaac gauuacgugg agaaggguac ucaagggaaa auuguggauu 1140  
 uggucaagga gcuugacaga gacacaguuu uugcucuggu gaauuacauc uucuuuaaag 1200  
 gcaaauugga gagaccuuu gaagucaagg acaccgagga agaggacuuc cagugggacc 1260  
 aggugaccac cgugaaggug ccuauaugaга agcguuuagg cauguuuaac auccagcacu 1320  
 guaagaagcu guccagcugg gugcugcuga ugaaauaccu gggcaaugcc accgccaucu 1380  
 ucuuccugcc ugaugagggg aaacuacagc accuggaaaa ugaacucacc caggauuca 1440  
 ucaccaaguu ccuggaaaau gaagacagaa ggucugccag cuuacauuaa cccaaacugu 1500  
 ccuuucugg aaccuauгаu cugaagagcg uccuggguca acugggcauc acuaaggucu 1560  
 ucagcaugg ggcugaccuc uccgggguca cagaggaggc accccugaag cucuccaagg 1620  
 ccgugcauaa ggcugugcug accaucgagc agaaagggac ugaagcugcu ggggccaugu 1680  
 uuuuagaggc cauaccaug ucuaucccc ccgaggucuaa guucaacaaa cccuuugucu 1740

ES 2 661 680 T3

ucuaaugau ugaacaaaau accaagucuc cccucuucan gggaaaagug gugaauccea 1800  
 cccaaaaua acugccucuc gcuccucaac cccucccuc caucccuggc cccucuccug 1860  
 gaugacauua aagaaggguu gagcuggucc cugccugcau gugacuguaa auccucucca 1920  
 uguuuucucu gagucuccu uugccugcug aggcuguaug ugggcuccag guaacagugc 1980  
 ugucuucggg ccccugaac uguguucaug gagcaucugg cuggguaggc acaugcuggg 2040  
 cuugaaucca ggggggacug aauccucagc uuacggaccu gggcccacuc guuucuggag 2100  
 ggcuccaguc uuccuugucc ugucuuggag ucccacaaga ggaucacag gggaggaacc 2160  
 agauaccagc caugacccca ggcuccacca agcaucuca ugucucccug cucaucuccc 2220  
 acucuccccc acccagaguu gcucauccug ccagggcugg cugugcccac cccaaggcug 2280  
 cccuccuggg gggcccagaa cugccugauc guggccuggc ccaguuuugu ggcaucugca 2340  
 gcaacacaag agagaggaca auguccucu cuugaccgc ugucaccuaa ccagacucgg 2400  
 gccugcacc ucucaggcac uucuggaaaa ugacugaggc agauucucc ugaagcccau 2460  
 ucuccauggg gcaacaagga caccuauucu guccuugucc uuccaucgcu gcccagaaa 2520  
 gccucacaua ucuccguuaa gaucagguc ccuucuccc agaugaagag gagggucucu 2580  
 gcuuuguuuu cucuauucc uccucagacu ugaccaggcc cagcaggccc cagaagacca 2640  
 uuaccuaua uccuucucc uccuaguca cauggccaua ggccugcuga uggcucagga 2700  
 aggccauugc aaggacuccu cagcuauugg agaggaagca caucacccau ugacccccgc 2760  
 aaccucucc uuuccuccuc ugagucccga cuggggccac augcagccug acuucuuugu 2820  
 gccuguugcu guccugcag ucuucagagg gccaccgcag cuccagugcc acggcaggag 2880  
 gcuguuccug aauagcccu gugguaaggg ccaggagagu ccuuccauc uccaaggccc 2940  
 ugcuaaagga cacagcagcc aggaagucc cugggccccu agcugaagga cagccugcuc 3000  
 ccuccgucuc uaccaggaau ggccuugucc uauggaaggc acugcccac cccaaacuaa 3060  
 ucuaggauc acugucuaac cacucacugu caugaaugug uacuaaagg augagguuga 3120  
 gucauaccaa auagugauuu cgauaguuca aaauggugaa auuagcauu cuacaugauu 3180  
 cagucuaauc aauggauacc gacuguuucc cacacaaguc uccuguucuc uuaagcuuac 3240  
 ucacugacag ccuucacuc uccacaaaau cauaaagau auggccauca ccaagcccc 3300  
 uaggaugaca ccagaccuga gagucugaag accuggauc aaguucugac uuuuccccc 3360  
 gacagcugug ugaccuucgu gaagucgcca aaccucucug agcccaguc auugcuagua 3420  
 agaccugccu uugaguuggu augauguuca aguuagauaa caaaauguuu auacccauuu 3480  
 gaacagagaa uaaauagaac uacauuucu gca 3513

<210> 8

<211> 3236  
<212> ARN  
<213> Homo sapiens

5 <400> 8

ES 2 661 680 T3

ugggcaggaa cugggcacug ugcccagggc augcacugcc uccacgcagc aaccucaga 60  
 guccugagcu gaaccaagaa ggaggagggg gucggggccuc cgaggaaggc cuagccgcug 120  
 cugcugccag gaauuccagg uuggaggggc ggcaaccucc ugccagccuu caggccacuc 180  
 uccugugccu gccagaagag acagagcuug aggagagcuu gaggagagca ggaaaggugg 240  
 gacauugcug cugcugcuca cucaguucca caggacaaug ccgucuucug ucucgugggg 300  
 cauccuccug cuggcaggcc ugugcugccu ggucccuguc ucccuggcug aggaucceca 360  
 gggagaugcu gccagaaga cagauacauc ccaccaugau caggauacc caaccucaa 420  
 caagauacc cccaaccugg cugaguucgc cuucagccua uaccgccagc uggcacacca 480  
 guccaacagc accaauaucu ucuucucucc agugagcauc gcuacagccu uugcaaugcu 540  
 cucccugggg accaaggcug acacucacga ugaaaucug gaggggccuga auuucacccu 600  
 cacggagauu ccggaggcuc agauccauga aggcuuccag gaacuccucc guaccucaa 660  
 ccagccagac agccagcucc agcugaccac cggcaauggc cuguuccuca gcgagggccu 720  
 gaagcuagug gauaaguuuu uggaggauu uaaaaaguug uaccacucag aagccuucac 780  
 ugucaacuuc ggggacaccg aagaggccaa gaaacagauc aacgauuacg uggagaaggg 840  
 uacucaaggg aaaaugugug auuuggucaa ggagcuugac agagacacag uuuuugcucu 900  
 ggugaauuac aucuucuuua aaggcaaug ggagagaccu uuugaaguca aggacaccga 960  
 ggaagaggac uuccacgug accaggugac caccgugaag gugccuuga ugaagcguuu 1020  
 aggcauguuu acauccagc acuguaagaa gcuguccagc ugggugcugc ugaugaaaua 1080  
 ccugggcaau gccaccgcca ucuucuuccu gccugaugag gggaaacuac agcaccugga 1140  
 aaaugaacuc acccacgaa ucaucaccaa guuccuggaa aaugaagaca gaaggucugc 1200  
 cagcuuacau uuacccaaac uguccaauac uggaaccuau gaucugaaga gcguccuggg 1260  
 ucaacugggc aucacuaag ucuucagcaa uggggcugac cucuccgggg ucacagagga 1320  
 ggcacccug aagcucucca aggccgugca uaaggcugug cugaccaucg acgagaaagg 1380  
 gacugaagcu gcuggggcca uguuuuuaga ggccaauacc augucuaucc cccccaggu 1440  
 caaguucaac aaaccuuug ucuucuuau gauugaacaa aaaccaagu cucccucuu 1500  
 caugggaaaa guggugaau ccacccaaaa auaacugccu cucgcuccuc aaccucucc 1560  
 cuccauccecu ggccccucc cuggaugaca uuaaagaagg guugagcugg ucccugccug 1620  
 caugugacug uaaaucucc ccauguuuuc ucugagucuc ccuuugccug cugaggcugu 1680  
 augugggcuc cagguaacag ugucugucuc gggccccug aacuguguuc auggagcauc 1740

ES 2 661 680 T3

uggcugggua ggcacaugcu gggcuugaau ccagggggga cugaauccuc agcuuacgga 1800  
 ccugggcca ucuguuucug gagggcucca gucuuccuug uccugucuug gaguccccaa 1860  
 gaaggaauca caggggagga accagauacc agccaugacc ccaggcucca ccaagcaucu 1920  
 ucaugucccc cugcucaucc cccacucccc cccaccaga guugcucauc cugccagggc 1980  
 uggcugugcc caccccaagg cugcccuccu gggggcccca gaacugccug aucgugccgu 2040  
 ggcccaguuu uguggcaucu gcagcaaac aagagagagg acaauguccu ccucuugacc 2100  
 gcugucacc uaaccagacu cgggcccugc accucucagg cacuucugga aaugacuga 2160  
 ggagauucu uccugaagcc cauucuccau ggggcaaca ggacaccuau ucuguccuug 2220  
 uccuuccauc gcugccccag aaagccucac auaucuccu uuagaaucag gucccuucuc 2280  
 cccagaugaa gaggaggguc ucugcuuugu uuucucuauc uccuccucag acuugaccag 2340  
 gccagcagg cccagaaga ccauuaccu auauccuuc uccuccuag ucacauggcc 2400  
 auaggccugc ugauggcuca ggaaggccau ugcaaggacu ccucagcuau gggagaggaa 2460  
 gcacaucacc cauugacccc cgcaacccu cccuuuccuc cucugagucc cgacuggggc 2520  
 cacaugcagc cugacuucuu ugugccuguu gcugucccug cagucuucag agggccaccg 2580  
 cagcuccagu gccacggcag gaggcuguuc cugaauagcc ccugugguaa gggccaggag 2640  
 aguccuucca uccuccaagg cccugcuaaa ggacacagca gccaggaagu cccugggcc 2700  
 ccuagcugaa ggacagccug cucccuccgu cucuaccagg aauggccuug uccuauaggaa 2760  
 ggcacugccc caucccaaac uaaucuagga aucacugucu aaccacucac ugucaugaa 2820  
 gugacuuaa aggaugaggu ugagucauac caaauguga uuucgauagu ucaaaauggu 2880  
 gaaauagca auucuacaug auucagucua aucaauaggau accgacuguu ucccacacaa 2940  
 gucuccuguu cucuuaagcu uacucacuga cagocuuuca cucuccacaa auacauuaaa 3000  
 gauauggcca ucaccaagcc cccuaggau acaccagacc ugagagucug aagaccugga 3060  
 uccaaguucu gacuuuucc ccugacagcu gugugaccuu cgugaagucg ccaaaccucu 3120  
 cugagcccca gucauugcua guaagaccug ccuugaguu gguaugaugu ucaaguuaga 3180  
 uaacaaaug uuuauacca uuagaacaga gaauaaauag aacuacauuu cuugca 3236

<210> 9  
 <211> 3532  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 9

5

# ES 2 661 680 T3

ugggcaggaa	cugggcacug	ugcccagggc	augcacugcc	uccacgcagc	aaccucaga	60
guccugagcu	gaaccaagaa	ggaggagggg	gucgggccuc	cgaggaaggc	cuagccgcug	120
cugcugccag	gaauuccagg	uuggaggggc	ggcaaccucc	ugccagccuu	caggccacuc	180



ES 2 661 680 T3

uccugugccu gccagaagag acagagcuug aggagagcuu gaggagagca ggaaaggugg	240
gacauugcug cugcugcuca cucaguucca cagggcgga guaagucuuc agcaucaggc	300
auuuuggggu gacucaguaa augguagauc uugcuaccag uggaacagcc acuaaggauu	360
cugcagugag agcagagggc cagcuaagug guacucuccc agagacuguc ugacucacgc	420
cacccccucc accuuggaca caggacgcug ugguuucuga gccagcagcc uccccguug	480
ccccucugga uccacugcuu aaauacggac gaggacaggg ccucugucucc ucagcuucag	540
gcaccaccac ugaccuggga cagugaaucg acaaugccgu cuucugucuc gugggcauc	600
cuccugcugg caggccugug cugccugruc ccugucuccc uggcugagga uccccagga	660
gaugcugccc agaagacaga uacaucaccac caugaucagg aucacccaac cuucaacaag	720
aucaccccca accuggcuga guucgccuuc agccuauacc gccagcuggc acaccagucc	780
aacagcacca auaucuucu cuccccagug agcaucgcua cagccuuugc aaugcucucc	840
cuggggacca aggcugacac ucacgaugaa auccuggagg gccugaauu caaccucacg	900
gagauuccgg aggcucagau ccaugaaggc uuccaggaac uccuccguac ccucaaccag	960
ccagacagcc agcuccagcu gaccaccggc aauggccugu uccucagcga gggccugaag	1020
cuaguggaua aguuuuugga ggauguuaaa aaguuguacc acucagaagc cuucacuguc	1080
aacuucgggg acaccgaaga ggccaagaaa cagaucacg auuacgugga gaaggguacu	1140
caagggaaaa uuguggauuu ggucaaggag cuugacagag acacaguuuu ugcucuggug	1200
aauuacaucu ucuuuaaagg caaaugggag agaccuuug aagucaagga caccgaggaa	1260
gaggacuucc acguggacca ggugaccacc gugaaggugc cuaugaugaa gcguuuaggc	1320
auguuuaaca uccagcacug uaagaagcug uccagcuggg ugcugcugau gaaauaccug	1380
ggcaaugcca ccgccaucuu cuuccugccu gaugagggga aacuacagca ccuggaaaau	1440
gaacucaccc acgauaucau caccaaguuc cuggaaaaug aagacagaag gucugccagc	1500
uuacauuuac ccaaacuguc cauucugga accuauauc ugaagagcgu ccugggucaa	1560
cugggcauca cuaaggucuu cagcaauggg gcugaccucu ccggggucac agaggaggca	1620
ccccugaagc ucuccaaggc cgugcauaag gcugugcuga ccaucgacga gaaagggacu	1680
gaagcugcug gggccauguu uuuagaggcc auacccaugu cuaucacccc cgaggucaag	1740
uucaacaaac ccuuugucuu cuuaaugauu gaacaaaaua ccaagucucc ccucuucaug	1800
ggaaaagugg ugaauccac ccaaaaaua cugccucucg cuccucaacc ccucccucc	1860
aucccuggcc ccuucccugg augacauuaa agaaggguug agcugguccc ugccugcaug	1920
ugacuguaaa uccucuccau guuuucucug agucucccuu ugccugcuga ggcuguaugu	1980
gggcuccagg uaacagugcu gucuucgggc cccugaacu guguucaugg agcaucuggc	2040
uggguaggca caugcugggc uugaauccag gggggacuga auccucagcu uacggaccug	2100

ES 2 661 680 T3

ggcccacucug uuucuggagg gcuccagucu uccuuguccu gucuuggagu cccaagaag 2160  
 gaaucacagg ggaggaacca gauaccagcc augaccccag gcuccacca gcaucuucan 2220  
 guccccugc ucaucccca cucccccca ccagaguug cucauccugc cagggcuggc 2280  
 ugugcccacc ccaaggcugc ccuccugggg gcccagAAC ugccugaucg ugccguggcc 2340  
 caguuuugug gcaucugcag caacacaaga gagaggaca uguccuccuc uugacccgcu 2400  
 gucaccuaac cagacucggg ccucgaccu cucaggcacu ucuggaaaau gacugaggca 2460  
 gauucuuccu gaagcccau cuccaugggg caacaaggac accuauucug uccuuguccu 2520  
 uccaucgcug cccagaaag ccucacauau cuccguuuag aaucaggucc cuucucccca 2580  
 gaugaagagg agggucucug cuuuguuuuc ucuauucuccu ccucagacu gaccaggccc 2640  
 agcaggcccc agaagaccu uaccuauau cccuucuccu cccuagucac auggccauag 2700  
 gccugcugau ggcucaggaa ggccauugca aggacuccuc agcuauugga gaggaagcac 2760  
 aucacccau gacccccgca acccucccu uuccuccuc gagucccgac uggggccaca 2820  
 ugcagccuga cuucuuugug ccuguugcug ucccugcagu cuucagaggg ccaaccgagc 2880  
 uccagugcca cggcaggagg cuguuccuga auagcccug ugguaagggc caggagaguc 2940  
 cuuccaucu ccaaggccu gcuaaaggac acagcagcca ggaaguccc ugggcccua 3000  
 gcugaaggac agccugcucc cuccgucuc accaggaug gccuuguccu auggaaggca 3060  
 cugcccac ccaaacuau cuaggaauca cugucuaacc acucacuguc augaauugug 3120  
 acuaaagga ugagguugag ucauaccaa uagugauuuc gauagucaa aauggugaaa 3180  
 uuagcaauuc ucaugauuc agucuaauca auggauaccg acuguuucc acacaaguc 3240  
 ccuguucuc uaagcuacu cacugacagc cuuucacuc ccacaaauac auuaaagaua 3300  
 uggccaucac caagccccu aggaugacac cagaccugag agucugaaga ccuggaucca 3360  
 aguucugacu uuucccccug acagcugugu gaccuucgug aagucgcca accucucuga 3420  
 gcccaguca uugcuagua gaccugccu ugaguuggua ugaugucaa guuagauaac 3480  
 aaaauguua uaccuauag aacagagaau aaauagaacu acuuuucug ca 3532

<210> 10  
 <211> 3340  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 10

5

ES 2 661 680 T3

ugggcaggaa	cugggcacug	ugcccagggc	augcacugcc	uccacgcagc	aaccucaga	60
guccugagcu	gaaccaagaa	ggaggagggg	gucgggccuc	cgaggaaggc	cuagccgcug	120
cugcugccag	gaauuccagg	uuggaggggc	ggcaaccucc	ugccagccuu	caggccacuc	180
uccugugccu	gccagaagag	acagagcuug	aggagagcuu	gaggagagca	ggaaaggugg	240

ES 2 661 680 T3

gacauugcug cugcugcuca cucaguucca cagcagccuc ccccguugcc ccucuggauc 300  
cacugcuuaa auacggacga ggacagggcc cugucuccuc agcuucaggc accaccacug 360  
accugggaca gugaaucgac aaugccgucu ucugucucgu ggggcauccu ccugcuggca 420  
ggccugugcu gccugguccc ugucucccug gcugaggaucc cccagggaga ugcugcccag 480  
aagacagaua cauccacca ugaucaggau caccacaaccu ucaacaagau ccccccaac 540  
cuggcugagu ucgccuucag ccuauaccgc cagcuggcac accaguccaa cagcaccuau 600  
aucuucuucu ccccagugag caucgcuaca gccuuugcaa ugcucuccu ggggaccaag 660  
gcugacacuc acgaugaaau ccuggagggc cugaauuua accucacgga gauuccggag 720  
gcucagaucc augaaggcuu ccaggaacuc cuccguacc ucaaccagcc agacagccag 780  
cuccagcuga ccaccggcaa uggccuguuc cucagcgagg gccugaagcu aguggauaag 840  
uuuuuggagg auguaaaaa guuguaccac ucagaagccu ucacuguaa cuucggggac 900  
accgaagagg ccaagaaaca gaucaacgau uacguggaga aggguaucua agggaaaauu 960  
guggauuugg ucaaggagcu ugacagagac acaguuuuug cucuggugaa uuacaucuuc 1020  
uuuaaaggca aaugggagag acccuuugaa gucaaggaca ccgaggaaga ggacuuccac 1080  
guggaccagg ugaccaccgu gaaggugccu augaugaagc guuuaggcau guuuuacauc 1140  
cagcacugua agaagcuguc cagcugggug cugcugauga aauaccuggg caaugccacc 1200  
gccaucuucu uccugccuga ugaggggaaa cuacagcacc uggaaauga acucacccac 1260  
gauaucauca ccaaguuccu ggaaaaugaa gacagaaggu cugccagcuu acauuuacc 1320  
aaacugucca uuacuggaac cuaugaucug aagagcgucc ugggucaacu gggcaucacu 1380  
aaggucuuca gcaauggggc ugaccucucc ggggucacag aggaggcacc ccugaagcuc 1440  
uccaaggccg ugcauaaggc ugugcugacc aucgacgaga aaggagcuga agcugcuggg 1500  
gccauguuuu uagaggccau acccaugucu aucccccccg aggucaaguu caacaaacc 1560  
uuugucuucu uaaugauuga acaaaauacc aagucuccc ucuucauggg aaaaguggug 1620  
aauccaccc aaaaauaacu gccucucgcu ccucaacccc ucccuuccau ccuggccccc 1680  
cucccuggau gacauuaaag aaggguuagag cuggucccug ccugcaugug acuguaaauc 1740  
ccucccaugu uuucucugag ucucccuuug ccugcugagg cuguaugugg gcuccaggua 1800  
acagugcugu cuucgggccc ccugaacugu guucauggag caucuggcug gguaggcaca 1860  
ugcugggcuu gaauccaggg gggacugaau ccucagcuua cggaccuggg cccaucuguu 1920  
ucuggagggc uccagucuuu cuuguccugu cuuggagucc ccaagaagga aucacagggg 1980  
aggaaccaga uaccagccau gaccccaggc uccaccaagc aucuucaugu cccccugcuc 2040  
auccccacu cccccacc cagaguugcu cauccugcca gggcuggcug ugcccacccc 2100

ES 2 661 680 T3

aaggcugccc uccugggggc cccagaacug ccugaucgug ccguggccca guuuuguggc 2160  
aucugcagca acacaagaga gaggacaaug uccuccucuu gacccgcugu caccuaacca 2220  
gacucggggc cugcaccucu caggcacuuc uggaaaauga cugaggcaga uucuuccuga 2280  
agcccauucu ccauggggca acaaggacac cuauucuguc cuuguccuuc caucgcugcc 2340  
ccagaaagcc ucacauaucu ccguuuagaa ucaggucccu ucucuccaga ugaagaggag 2400  
ggucucugcu uuguuuucuc uaucuccucc ucagacuuga ccaggcccag caggcccag 2460  
aagaccuua cccuauaucc cuuccuccucc cuagucacau ggccauaggc cugcugaugg 2520  
cucaggaagg ccauugcaag gacuccucag cuaugggaga ggaagcacau caccuauuga 2580  
ccccgcaac cccuccuuu ccuccucuga gucccgacug gggccacaug cagccugacu 2640  
ucuuugugcc uguugcuguc ccugcagucu ucagagggcc accgcagcuc cagugccacg 2700  
gcaggaggcu guuccugaau agccccugug gaaagggcca ggagaguccu uccauccucc 2760  
aaggcccugc uaaaggacac agcagccagg aaguccccug ggccccuagc ugaaggacag 2820  
ccugcucccu ccgucucua caggaauggc cuuguccuau ggaaggcacu gccccauccc 2880  
aaacuaaucu aggaaucau gucuaaccac ucacugucau gaauguguac uuaaaggau 2940  
agguugaguc auaccaaaau gugauuucga uaguucaaa uggugaaau agcaauucua 3000  
caugauucag ucuaaucau ggauaccgac uguuucccacc acaagucucc uguucucua 3060  
agcuuacuca cugacagccu uucacucucc acaaauacau uaaagauaug gccaucacca 3120  
agccccuag gaugacacca gaccugagag ucugaagacc uggauccaag uucugacuuu 3180  
ucccccugac agcuguguga ccuucgugaa gucgccaaac cucucugagc cccagucuuu 3240  
gcuaguaaga ccugccuuug aguugguau auguucagu uagauaaca aauguuuaa 3300  
cccauagaa cagagaauaa auagaacua auuucugca 3340

<210> 11  
<211> 3495  
<212> ARN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 11

5

ES 2 661 680 T3

ugggcaggaa	cugggcacug	ugcccagggc	augcacugcc	uccacgcagc	aaccucaga	60
guccugagcu	gaaccaagaa	ggaggagggg	gucgggccuc	cgaggaaggc	cuagccgcug	120
cugcugccag	gaauuccagg	uuggaggggc	ggcaaccucc	ugccagccuu	caggccacuc	180
uccugugccu	gccagaagag	acagagcuug	aggagagcuu	gaggagagca	ggaaagggcg	240
gcaguaaguc	uucagcauca	ggcauuuugg	ggugacucag	uaaugguag	aucuugcuac	300
caguggaaca	gccacuaagg	auucugcagu	gagagcagag	ggccagcuaa	gugguacucu	360
cccagagacu	gucugacuca	cgccaccccc	uccaccuugg	acacaggacg	cugugguuuc	420

ES 2 661 680 T3

ugagccagca gccucccccg uugccccucu ggauccacug cuuaaaauacg gacgaggaca	480
gggcccuguc uccucagcuu caggcaccac cacugaccug ggacagugaa ucgacaaugc	540
cgucuucugu cucguggggc auccuccugc uggcaggccu gugcugccug gucccugucu	600
cccuggcuga ggauccccag ggagaugcug cccagaagac agauacauc caccaugauc	660
aggaucaccc aaccuucaac aagaucaccc ccaaccuggc ugaguucgcc uucagccuau	720
accgccagcu ggcacaccag uccaacagca ccaauaucuu cuucucccca gugagcaucg	780
cuacagccuu ugcaaugcuc ucccugggga ccaaggcuga cacucacgau gaaauccugg	840
agggccugaa uuucaaccuc acggagauuc cggaggcuca gauccaugaa ggcuuccagg	900
aacuccuccg uaccucuac cagccagaca gccagcucca gcugaccacc ggcaauggcc	960
uguuccucag cgagggccug aagcuagugg anaaguuuu ggaggauuu aaaaaguugu	1020
accacucaga agccuucacu gucaacuucg gggacaccga agaggccaag aaacagauca	1080
acgauuacgu ggagaagguu acucaagggg aaauugugga uuuggucaag gagcuugaca	1140
gagacacagu uuuugcucug gugaauuaca ucuucuuuaa aggcaaaugg gagagacccu	1200
uugaagucaa ggacaccgag gaagaggacu uccacgugga ccaggugacc accgugaagg	1260
ugccuaugau gaagcguuuu ggcauguuuu acauccagca cuguaagaag cuguccagcu	1320
gggugcugcu gaugaaauac cuggggcaaug ccaccgccau cuucuuuccug ccugaugagg	1380
ggaaacuaca gcaccuggaa aaugaacuca cccacgauau caucaccaag uuccuggaaa	1440
augaagacag aagguucugc agcuuacauu uacccaaacu guccauuacu ggaaccuau	1500
aucugaagag cguccugggg caacugggca ucacuaaggu cuucagcaau ggggcugacc	1560
ucuccggggu cacagaggag gcaccccuga agcucuccaa ggccgugcau aaggcugugc	1620
ugaccaucga cgagaaaggg acugaagcug cuggggccau guuuuuagag gccauaccca	1680
ugucuauccc ccccgagguc aaguucaaca aaccuuugu cuucuuauug auugaacaaa	1740
auaccaaguc ucccucuuuc augggaaaag uggugaaucc cacccaaaa uaacugccuc	1800
ucgcuccuca accccucccc uccaucccug gccccuccc uggaugacau uaaagaagg	1860
uugagcuggu cccugccugc augugacugu aaaucccucc cauguuuuu cugagucucc	1920
cuuugccugc ugaggcugua ugugggcucc agguaacagu gcugucuucg ggccccuga	1980
acuguguuca uggagcaucu ggcuggguag gcacaugcug ggcuugaau caggggggac	2040
ugaauccuca gcuuacggac cugggccc au cuguuucugg agggcuccag ucuuccuugu	2100
ccugucuugg aguccccaag aaggaauac aggggaggaa ccagauacca gccaugaccc	2160
caggcuccac caagcaucuu caugucccc ugcucaucc ccacuccccc ccaccagag	2220
uugcuaucc ugccagggcu ggcugugccc accccaagge ugccuccug ggggccccag	2280
aacugccuga ucgugccgug gcccaguuuu guggcaucug cagcaacaca agagagagga	2340

ES 2 661 680 T3

caauguccuc cucuugaccc gcugucaccu aaccagacuc gggcccugca ccucucaggc 2400  
 acuucuggae aaugacugag gcagauucuu ccugaagccc auucuccaug gggcaacaag 2460  
 gacaccuauu cuguccuugu ccuuccaucg cugccccaga aagccucaca uaucuccguu 2520  
 uagaauccagg ucccuucucc ccagaugaag aggagggucu cugcuuuguu uucucuauuc 2580  
 ccuccucaga cuugaccagg cccagcaggc cccagaagac cauuaccua uaucccuuc 2640  
 ccuccuagu cacauggcca uaggccugcu gauggcucag gaaggccauu gcaaggacuc 2700  
 cucagcuauu ggagaggaag cacaucaccu auugaccccc gcaaccccuc ccuuuccucc 2760  
 ucugaguccc gacuggggcc acaugcagcc ugacuucuuu gugccugug cugucccugc 2820  
 agucuucaga gggccaccgc agcuccagug ccacggcagg aggcuguucc ugaauagccc 2880  
 cugugguaag gggcaggaga guccuuccau ccuccaagggc ccugcuaaaag gacacagcag 2940  
 ccaggaaguc cccuggggcc cuagcugaag gacagccugc ucccuccguc ucuaccagga 3000  
 auggccuugu ccuauuggaag gcacugcccc aucccaaacu aaucuaaggaa ucacugucua 3060  
 accacucacu gucaugaauu uguacuuaaa ggauagagguu gagucauacc aaauagugau 3120  
 uucgauaguu caaaauggug aaauuagcaa uucuaauga uucagucuaa ucaauuggaua 3180  
 ccgacuguuu cccacacaag ucuccuguuu ucuaaagcuu acucacugac agccuuucac 3240  
 ucuccacaaa uacauuaaag auauuggccau caccaagccc ccuaggauga caccagaccu 3300  
 gagagucuga agaccuggau ccaaguucug acuuuucucc cugacagcug ugugaccuuc 3360  
 gugaagucgc caaaccucuc ugagccccag ucauugcuag uaagaccugc cuuugaguug 3420  
 guaugauguu caaguuagau aacaaaugu uuauaccuau uagaacagag aaauaauga 3480  
 acuacauuuc uugca 3495

5 <210> 12  
 <211> 3492  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 12



ES 2 661 680 T3

ugggcaggaa	cugggcacug	ugcccagggc	augcacugcc	uccacgcagc	aaccucaga	60
guccugagcu	gaaccaagaa	ggaggagggg	gucgggccuc	cgaggaaggc	cuagccgcug	120
cugcugccag	gaauuccagg	uuggaggggc	ggcaaccucc	ugccagccuu	caggccacuc	180
uccugugccu	gccagaagag	acagagcuug	aggagagcuu	gaggagagca	ggaaagggcg	240
gcaguaaguc	uucagcauca	ggcauuuugg	ggugacucag	uaaauuguag	aucuugcuac	300
caguggaaca	gccacuaagg	auucugcagu	gagagcagag	ggccagcuaa	gugguacucu	360
cccagagacu	gucugacuca	cgccaccccc	uccaccuugg	acacaggacg	cugugguuuc	420
ugagccagcc	uccccguug	ccccucugga	uccacugcuu	aaauacggac	gaggacaggg	480

ES 2 661 680 T3

cccugucucc ucagcuucag gcaccaccac ugaccuggga cagugaaucg acaaugccgu 540  
 cuucugucuc guggggcauc cuccugcugg caggccugug cugccugguc ccugucucc 600  
 uggcugagga uccccagggga gaugcugccc agaagacaga uacauccac caugaucagg 660  
 aucacccaac cuucaacaag aucaccccca accuggcuga guucgccuuc agccuauacc 720  
 gccagcuggc acaccagucc aacagcacca auaucuucuu cuccccagug agcaucgcua 780  
 cagccuuugc aaugcucucc cuggggacca aggcugacac ucacgaugaa auccuggagg 840  
 gccugaauuu caaccucacg gagauuccgg aggcucagau ccaugaaggc uuccaggaac 900  
 uccuccguac ccucaaccag ccagacagcc agcuccagcu gaccaccggc aauggccugu 960  
 uccucagcga gggccugaag cuaguggaua aguuuuugga ggauguuaaa aaguuguacc 1020  
 acucagaagc cuucacuguc aacuucgggg acaccgaaga ggccaagaaa cagauncaacg 1080  
 auuacgugga gaaggguacu caagggaaaa uuguggauuu ggucaaggag cuugacagag 1140  
 acacaguuuu ugcucuggug aaauacaucu ucuuuuaagg caaaugggag agaccuuug 1200  
 aagucaagga caccgaggaa gaggacuucc acguggacca ggugaccacc gugaaggugc 1260  
 cuaugaugaa gcguuuaggc auguuuaaca uccagcacug uaagaagcug uccagcuggg 1320  
 ugcugcugau gaaauaccug ggcaaugcca ccgccaucuu cuuccugccu gaugagggga 1380  
 aacuacagca ccuggaaaau gaacucaccc acgauaucu caccaaguuc cuggaaaaug 1440  
 aagacagaag gucugccagc uuacauuuac ccaacuguc cauuacugga accuauauc 1500  
 ugaagagcgu ccugggucaa cugggcauca cuaaggucuu cagcaauggg gcugaccucu 1560  
 ccggggucac agaggaggca ccccugaagc ucuccaaggc cgugcauaag gcugugcuga 1620  
 ccaucgacga gaaagggacu gaagcugcug gggccauguu uuuagaggcc auacccaugu 1680  
 cuauccccc cgaugucaag uucaacaaac ccuuugucuu cuuaaugauu gaacaaaaua 1740  
 ccaagucucc ccucuucaug ggaaaagugg ugaauccac caaaaauaa cugccucucg 1800  
 cuccucaacc ccucccucc auccuggcc ccucccugg augacauuaa agaaggguug 1860  
 agcuggucc ugccugcaug ugacuguaaa ucccuccau guuuucucug agucucccu 1920  
 ugccugcuga ggcuguaugu gggcuccagg uaacagugcu gucuucgggc ccccugaacu 1980  
 guguucaugg agcaucuggc ugguuaggca caugcugggc uugaauccag ggggacuga 2040  
 auccucagcu uacggaccug ggcccucug uuucuggagg gcuccagucu uccuuguccu 2100  
 gucuuggagu cccaagaag gaucacagc ggaggaacca gauaccagcc augaccccag 2160  
 guccaccaaa gcaucuucau guccccucg ucauaccca ccccccca cccagaguug 2220  
 cucauccugc cagggcuggc ugugccacc ccaaggcugc ccuccugggg gcccagaac 2280  
 ugccugaucg ugccguggcc caguuuugug gcaucugcag caacacaaga gagaggacaa 2340

ES 2 661 680 T3

uguccuccuc uugacccgcu gucaccuaac cagacucggg cccugcaccu cucaggcacu 2400  
 ucuggaaaau gacugaggca gauucuuccu gaagcccacu cccaugggg caacaaggac 2460  
 accuauucug uccuuguccu uccaucgcug ccccagaaag ccucacauau cuccguuuag 2520  
 aaucaggucc cuucucocca gaugaagagg agggucucug cuuuguuuuc ucuauucucu 2580  
 ccucagacuu gaccaggccc agcaggcccc agaagaccu uaccuauau cccuucucucu 2640  
 cccuagucac auggccauag gccugcugau ggcucaggaa ggccauugca aggacuccuc 2700  
 agcuauugga gaggaagcac aucacccauu gacccccgca accccucucu uuccuccucu 2760  
 gagucccgac uggggccaca ugagccuga cuucuuugug ccuguugcug ucccugcagu 2820  
 cuucagaggg ccaccgcagc uccagugcca cggcaggagg cuguuccuga auagccccug 2880  
 ugguaagggc caggagaguc cuuccauccu ccaaggcccu gcuaaaggac acagcagcca 2940  
 ggaagucccc ugggccccua gcugaaggac agccugcucc cuccgucucu accaggaug 3000  
 gccuuguccu auggaaggca cugccccauc ccaaacuaau cuaggaauc cugucuaacc 3060  
 acucacuguc augaauugug acuaaaagga ugagguugag ucauaccaa uagugauuuc 3120  
 gauaguucua aauggugaaa uuagcaauuc uacaugauuc agucuaauca auggauaccg 3180  
 acuguuuccc acacaagucu ccuguucucu uaagcuuacu cacugacagc cuuucacucu 3240  
 ccacaaauac auuaaagaua uggccaucac caagcccccu aggaugacac cagaccugag 3300  
 agucugaaga ccuggaucca aguucugacu uuucccccug acagcugugu gaccuucgug 3360  
 aagucgcca accucucuga gccccaguca uugcuagua gaccugccuu ugaguuggua 3420  
 ugauguucua guuagauaac aaaauguuu uaccuauag aacagagaau aaauagaacu 3480  
 acuuuucug ca 3492

<210> 13  
 <211> 3510  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 13

5

ES 2 661 680 T3

ugggcaggaa	cugggcacug	ugcccagggc	augcacugcc	uccacgcagc	aaccucaga	60
guccugagcu	gaaccaagaa	ggaggagggg	gucgggccuc	cgaggaaggc	cuagccgcug	120
cugcugccag	gaauuccagg	uuggaggggc	ggcaaccucc	ugccagccuu	caggccacuc	180
uccugugccu	gccagaagag	acagagcuug	aggagagcuu	gaggagagca	ggaaagggcg	240
gcaguaaguc	uucagcauca	ggcauuuugg	ggugacucag	uaaaugguag	aucuugcuac	300
caguggaaca	gccacuaagg	auucugcagu	gagagcagag	ggccagcuaa	gugguacucu	360
cccagagacu	gucugacuca	cgccaccccc	uccaccuugg	acacaggacg	cugugguuuc	420
ugagccaggu	acaaugacuc	cuuucgccuc	ccccguugcc	ccucuggauc	cacugcuuaa	480

ES 2 661 680 T3

auacggacga ggacagggcc cugucuccuc agcuucaggc accaccacug accugggaca 540  
 gugaaucgac aaugccgucu ucugucucgu ggggcauccu ccugcuggca ggccugugcu 600  
 gccugguccc ugucucccug gcugaggau cccagggaga ugcugcccag aagacagaua 660  
 cauccacca ugaucaggau caccacaaccu ucaacaagau ccccccaac cuggcugagu 720  
 ucgccuucag ccuauaccgc cagcuggcac accaguccaa cagcaccaau aucuucuucu 780  
 ccccagugag caucgcuaca gccuuugcaa ugcucuccu ggggaccaag gcugacacuc 840  
 acgaugaaau ccuggagggc cugaauuua accucacgga gauuccggag gcucagaucc 900  
 augaaggcuu ccaggaacuc cuccguaccc ucaaccagcc agacagccag cuccagcuga 960  
 ccaccggcaa uggccuguuc cucagcgagg gccugaagcu aguggauaag uuuuuggagg 1020  
 auguuaaaaa guuguaccac ucagaagccu ucacugucua cuucggggac accgaagagg 1080  
 ccaagaaaca gaucaacgau uacguggaga aggguaucu agggaaaauu guggauuugg 1140  
 ucaaggagcu ugacagagac acaguuuuug cucuggugaa uuacaucuuc uuuaaaggca 1200  
 aaugggagag acccuugaa gucaaggaca ccgaggaaga ggacuuccac guggaccagg 1260  
 ugaccaccgu gaaggugccu augaugaagc guuuaggcau guuuacauc cagcacugua 1320  
 agaagcuguc cagcugggug cucugauga aauaccuggg caaugccacc gccaucuucu 1380  
 uccugccuga ugaggggaaa cuacagcacc uggaaauga acucaccac gauaucauca 1440  
 ccaaguuccu ggaaaugaa gacagaaggu cugccagcuu acauuuacc aaacugucca 1500  
 uuacuggaac cuaugaucug aagagcgucc ugggucaacu gggcaucacu aaggucuua 1560  
 gcaauggggc ugaccucucc ggggucacag aggaggcacc ccugaagcuc uccaaggccg 1620  
 ugcuaaaggc ugugcugacc aucgacgaga aagggacuga agcugcuggg gccauguuu 1680  
 uagaggccau acccaugucu auccccccg aggucaaguu caacaaacc uuugucuucu 1740  
 uaaugauuga acaaaauacc aagucucucc ucuucauggg aaaaguggug aaucccacc 1800  
 aaaaauacu gccucucgcu ccucaacccc uccccuccau ccugggccc cucccuggau 1860  
 gacauuaaag aaggguugag cuggucccug ccugcaugug acuguaaauc ccucccaugu 1920  
 uuucucugag ucucccuug ccugcugagg cuguaugug gcuccaggua acagugcugu 1980  
 cuucgggccc ccugaacugu guucauggag caucuggcug gguaggcaca ugcugggcuu 2040  
 gaauccaggg gggacugaau ccucagcuua cggaccuggg cccaucuguu ucuggagggc 2100  
 uccagucuc cuuguccugu cuuggagucc ccaagaagga aucacagggg aggaaccaga 2160  
 uaccagccau gaccccaggc uccaccaagc aucuucaugu ccccugcuc auccccacu 2220  
 cccccacc cagaguugcu cauccugcca gggcuggcug ugcccacccc aaggcugccc 2280  
 uccugggggc ccagaacug ccugaucgug ccguggccca guuuuguggc aucugcagca 2340  
 acacaagaga gaggacaau uccuccucu gacccgcugu caccuaacca gacucgggccc 2400

ES 2 661 680 T3

cugcaccucu	caggcacuuc	uggaaaauga	cugaggcaga	uucuuccuga	agcccuuucu	2460
ccauggggca	acaaggacac	cuauucuguc	cuuguccuuc	caucgcugcc	ccagaaagcc	2520
ucacauaucu	ccguuuagaa	ucaggucccu	ucucuccaga	ugaagaggag	ggucucugcu	2580
uuguuuucuc	uauccucccc	ucagacuuga	ccaggcccag	caggccccag	aagaccuuua	2640
cccuauaucc	cuucuccucc	cuagucacau	ggccauaggc	cugcugaugg	cucaggaagg	2700
ccaauugcaag	gacuccucag	cuaugggaga	ggaagcacau	caccuauuga	cccccgcaac	2760
ccucuccuuu	ccuccucuga	gucccgacug	gggccacaug	cagccugacu	ucuuugugcc	2820
uguugcuguc	ccugcagucu	ucagagggcc	accgcagcuc	cagugccacg	gcaggaggcu	2880
guuccugaau	agccccugug	guaagggcca	ggagaguccu	uccauccucc	aaggcccugc	2940
uaaaggacac	agcagccagg	aagucuccug	ggccccuagc	ugaaggacag	ccugcucccu	3000
ccgucucua	caggaauggc	cuuguccuau	ggaaggcacu	gccccauccc	aaacuaaucu	3060
aggaaucacu	gucuaaccac	ucacugucau	gaauguguac	uuaaaggau	agguugaguc	3120
auaccaaa	gugauuucga	uaguucaaa	uggugaaau	agcaauucua	caugauucag	3180
ucuaaucaau	ggauaccgac	uguuucccac	acaagucucc	uguucucuua	agcuuacuca	3240
cugacagccu	uucacucucc	acaaauacau	uaaagauaug	gccaucacca	agccccuag	3300
gaugacacca	gaccugagag	ucugaagacc	uggauccaag	uucugacuuu	ucccccugac	3360
agcuguguga	ccuucgugaa	gucgcctaac	cucucugagc	cccagucuuu	gcuaguaaga	3420
ccugccuuug	aguugguau	auguucagu	uagauaacia	aauguuuua	cccuuuagaa	3480
cagagaauaa	auagaacuac	auuucuu	gca			3510

<210> 14  
 <211> 3303  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 14

ES 2 661 680 T3

ugggcaggaa	cugggcacug	ugcccagggc	augcacugcc	uccacgcagc	aaccucaga	60
guccugagcu	gaaccaagaa	ggaggagggg	gucgggccuc	cgaggaaggc	cuagccgcug	120
cugcugccag	gaauuccagg	uuggaggggc	ggcaaccucc	ugccagccuu	caggccacuc	180
uccugugccu	gccagaagag	acagagcuug	aggagagcuu	gaggagagca	ggaaagcagc	240
cucucccguu	gccccucugg	auccacugcu	uaaaucgga	cgaggacagg	gcccugucuc	300
cucagcuuca	ggcaccacca	cugaccuggg	acagugaauc	gacaaugccg	ucuucugucu	360
cguggggcau	ccuccugcug	gcaggccugu	gcugccuggu	cccugucucc	cuggcugagg	420
auccccaggg	agaugcugcc	cagaagacag	auacaucca	ccaugaucag	gaucacccaa	480
ccuucaaaa	gaucaccccc	aaccuggcug	aguucgccuu	cagccuauac	cgccagcugg	540

ES 2 661 680 T3

cacaccaguc caacagcacc aauaucuucu ucuccccagu gagcaucgcu acagccuuug 600  
caaugcucuc ccuggggacc aaggcugaca cucacgauga aauccuggag ggccugaauu 660  
ucaaccucac ggagauuccg gaggcucaga uccaugaagg cuuccaggaa cuccuccgua 720  
cccucaacca gccagacagc cagcuccagc ugaccaccgg caauggccug uuccucagcg 780  
agggccugaa gcuaguggau aaguuuuugg aggauguuaa aaaguuguac cacucagaag 840  
ccuucacugu caacuucggg gacaccgaag aggccaagaa acagaucaac gauuacgugg 900  
agaagggua ucaagggaaa auuguggauu uggucaagga gcuugacaga gacacaguuu 960  
uugcucuggu gaauuacauc uucuuuaaag gcaaauggga gagaccuuu gaagucaagg 1020  
acaccgagga agaggacuuc cacguggacc aggugaccac cgugaaggug ccuaugauga 1080  
agcguuuagg cauguuuuac auccagcacu guaagaagcu guccagcugg gugcugcuga 1140  
ugaaaauaccu gggcaaugcc accgccaucu ucuuccugcc ugaugagggg aaacuacagc 1200  
accuggaaaa ugaacucacc cacgauauca ucaccaaguu ccuggaaaau gaagacagaa 1260  
ggucugccag cuuacauuuu cccaaacugu ccuuuacugg aaccuaugau cugaagagcg 1320  
uccuggguca acugggcauc acuaaggucu ucagcaaugg ggcugaccuc uccgggguca 1380  
cagaggaggc accccugaag cucuccaagg ccgugcauaa ggcugugcug accaucgagc 1440  
agaaagggac ugaagcugcu ggggccaugu uuuuagaggc cauacccaug ucuaucuccc 1500  
ccgagggucaa guucaacaaa cccuuugucu ucuuuauugau ugaacaaaau accaagucuc 1560  
cccucuucan gggaaaagug gugaauccca cccaaaaua acugccucuc gcuccucaac 1620  
cccucuccuc caucccuggc cccucuccug gaugacauua aagaaggguu gagcuggucc 1680  
cugccugcau gugacuguaa auccucucca uguuuucucu gagucuccu uugccugcug 1740  
aggcuguaug ugggcuccag gaaacagugc ugucuuucggg ccccugaac uguguucaug 1800  
gagcaucugg cuggguaggc acaugcuggg cuugaaucca ggggggacug aauccucagc 1860  
uuacggaccu gggcccaucu guuucuggag ggcuccaguc uuccuugucc ugucuuaggag 1920  
uccccaagaa ggaucacag gggaggaacc agauaccagc caugaccca ggcuccacca 1980  
agcaucuuca ugucucccug cucauccccc acucuccccc acccagaguu gcucauccug 2040  
ccagggcugg cugugcccac cccaaggcug ccucuccuggg ggcccagaa cugccugauc 2100  
gugccguggc ccaguuuugu ggcaucugca gcaacacaag agagaggaca auguccuccu 2160  
cuugacccgc ugucaccuaa ccagacucgg gccucgacc ucucaggcac uucuggaaaa 2220  
ugacugaggc agauucuucc ugaagcccau ucuccauggg gcaacaagga caccuauucu 2280  
guccuugucc uuccaucgcu gcccagaaa gccucacaua ucuccguuuu gaucagguc 2340  
ccuucucucc agaugaagag gagggucucu gcuuuguuuu cucuaucucc uccucagacu 2400



ES 2 661 680 T3

ugaccaggcc cagcaggccc cagaagacca uuacccuaua ucccuucucc ucccuaguca	2460
cauggccaaua ggccugcuga uggcucagga aggccauugc aaggacuccu cagcuauggg	2520
agaggaagca caucacccau ugacccccgc aaccuccucc uuuccuccuc ugagucccga	2580
cuggggccac augcagccug acuucuuugu gccuguugcu gucccugcag ucuucagagg	2640
gccaccgcag cuccagugcc acggcaggag gcuguuccug aaauagcccu gugguaaggg	2700
ccaggagagu ccuuccaucc uccaaggccc ugcuaaagga cacagcagcc aggaaguccc	2760
cugggccccu agcugaagga cagccugcuc ccuccgucuc uaccaggaau ggccuugucc	2820
uauggaaggc acugccccau cccaaacuaa ucuaggaau acugucuaac cacucacugu	2880
caugaaugug uacuuaaagg augagguuga gucauaccaa auagugauuu cgauaguuca	2940
aaauggugaa auuagcauu cuacaugauu cagucuaauc aauggauacc gacuguuucc	3000
cacacaaguc uccugucuc uuaagcuuac ucacugacag ccuuucacuc uccacaaaaua	3060
cauuaaagau auggccauca ccaagcccc uaggaugaca ccagaccuga gagucugaag	3120
accuggauc aaguucugac uuuuccccu gacagcugug ugaccuucgu gaagucgcca	3180
aaccucucug agccccaguc auugcuagua agaccugccu uugaguuggu augauguuca	3240
aguuagauaa caaauguuu auacccauu gaacagagaa uaaauagaac uacauuucuu	3300
gca	3303

<210> 15  
 <211> 3300  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 15

5

ES 2 661 680 T3

ugggcaggaa	cugggcacug	ugcccagggc	augcacugcc	uccacgcagc	aaccucaga	60
guccugagcu	gaaccaagaa	ggaggagggg	gucgggccuc	cgaggaaggc	cuagccgcug	120
cugcugccag	gaauuccagg	uuggaggggc	ggcaaccucc	ugccagccuu	caggccacuc	180
uccugugccu	gccagaagag	acagagcuug	aggagagcuu	gaggagagca	ggaaagccuc	240
ccccguugcc	ccucuggauc	cacugcuuaa	auacggacga	ggacagggcc	cugucuccuc	300
agcuucaggc	accaccacug	accugggaca	gugaaucgac	aaugccgucu	ucugucucgu	360
ggggcauccu	ccugcuggca	ggccugugcu	gccuggguccc	ugucucccug	gcugaggauc	420
cccagggaga	ugcugcccag	aagacagaua	caucccacca	ugaucaggau	caccacaaccu	480
ucaacaagau	cacccccaac	cuggcugagu	ucgccuucag	ccuauaccgc	cagcuggcac	540
accaguccaa	cagcaccaau	aucuucuucu	ccccagugag	caucgcuaca	gccuuugcaa	600
ugcucucccu	ggggaccaag	gcugacacuc	acgaugaaau	ccuggagggc	cugaauuuca	660
accucacgga	gauuccggag	gcucagaucc	augaaggcuu	ccaggaacuc	cuccguaccc	720

ES 2 661 680 T3

ucaaccagcc agacagccag cuccagcuga ccaccggcaa uggccuguuc cucagcgagg 780  
gccugaagcu aguggauaag uuuuuggagg auguuaaaaa guuguaccac ucagaagccu 840  
ucacugucua cuucggggac accgaagagg ccaagaaaca gaucaacgau uacguggaga 900  
aggguacuca agggaaaauu guggauuugg ucaaggagcu ugacagagac acaguuuuug 960  
cucuggugaa uuacaucuuc uuuaaaggca aaugggagag acccuugaa gucaaggaca 1020  
ccgaggaaga ggacuuccac guggaccagg ugaccaccgu gaaggugccu augaugaagc 1080  
guuuaggcau guuuacauc cagcacugua agaagcuguc cagcugggug cugcugauga 1140  
aauaccuggg caaugccacc gccaucuucu uccugccuga ugaggggaaa cuacagcacc 1200  
uggaaaauga acucaccac gauaucauca ccaaguuccu ggaaaauga gacagaaggu 1260  
cugccagcuu acauuuacc aaacugucca uuacuggaac cuaugaucug aagagcgucc 1320  
ugggucaacu gggcaucacu aaggucuua gcaauggggc ugaccucucc ggggucacag 1380  
aggaggcacc ccugaagcuc uccaaggccg ugcauaaggc ugugcugacc aucgacgaga 1440  
aagggacuga agcugcuggg gccauguuuu uagaggccau acccaugucu auccccccg 1500  
aggucaaguu caacaaacc uuugucuucu uaaugauuga acaaaauacc aagucucucc 1560  
ucuucauggg aaaaguggug aaucccacc aaaaauaacu gccucucgu ccucaacc 1620  
ucccucgau cccuggcccc cuccuggau gacaunaaag aagguugag cugguccug 1680  
ccugcaugug acuguaaauc ccucccaugu uuucucugag ucucccuug ccugcugagg 1740  
cuguaugugg gcuccaggua acagugcugu cuucgggcc ccugaacugu guucauggag 1800  
caucuggcug gguagcaca ugucgggcuu gaauccaggg gggacugaau ccucagcuua 1860  
cggaccuggg cccaucuguu ucuggagggc uccagucuuu cuuguccugu cuuggagucc 1920  
ccaagaagga aucacagggg aggaaccaga uaccagccau gaccccaggc uccaccaagc 1980  
aucuucaugu cccccugcuc auccccacu cccccacc cagaguugcu cauccugcca 2040  
gggcuggcug ugcccacccc aaggcugccc uccugggggc cccagaacug ccugaucgug 2100  
ccguggccca guuuuguggc aucugcagca acacaagaga gaggacaaug uccuccucu 2160  
gacccgcugu caccuaacca gacucgggcc cugcaccucu caggcacuuc uggaaaauga 2220  
cugaggcaga uucuuccuga agcccauucu ccauggggca acaaggacac cuauucuguc 2280  
cuuguccuuc caucgcugcc ccagaaagcc ucacauaucu ccguuuagaa ucaggucucc 2340  
ucuccccaga ugaagaggag ggucucugcu uuguuuucuc uaucuccucc ucagacuuga 2400  
ccaggcccag caggccccag aagaccauua ccuauaucc cuucuccucc cuagucacau 2460  
ggccauaggc cugcugaugc ucaggaagg ccuugcaag gacuccucag cuaugggaga 2520  
ggaagcacu caccuauuga cccccgcaac ccuuccuuu cuuccucuga gucccaguc 2580  
gggccacaug cagccugacu ucuuugugcc uguugcuguc ccugcagucu ucagagggcc 2640

ES 2 661 680 T3

accgcagcuc	cagugccacg	gcaggaggcu	guuccugaau	agccccugug	guaagggcca	2700
ggagaguccu	uccauccucc	aaggcccugc	uaaaggacac	agcagccagg	aaguccccug	2760
ggccccuagc	ugaaggacag	ccugcucccu	ccgucucua	caggaauggc	cuuguccuau	2820
ggaaggcacu	gccccauccc	aaacuaaucu	aggaaucacu	gucuaaccac	ucacugucau	2880
gaauguguac	uuaaaggaug	agguugaguc	auaccaaaua	gugauuucga	uaguucaaaa	2940
uggugaaauu	agcaauucua	caugauucag	ucuaaucaau	ggauaccgac	uguuucccac	3000
acaagucucc	uguucucuaa	agcuuacuca	cugacagccu	uucacucucc	acaaauacau	3060
uaaagauaug	gccaucacca	agccccuag	gaugacacca	gaccugagag	ucugaagacc	3120
uggauccaag	uucugacuuu	uccccugac	agcuguguga	ccuucgugaa	gucgcctaac	3180
cucucugagc	cccagucuuu	gcuaguaaga	ccugccuuug	aguugguau	auguucaagu	3240
uagauaacia	aauguuuuaa	cccuuuagaa	cagagaauaa	auagaacuac	auuucuugca	3300

<210> 16  
 <211> 3199  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 16

5

ES 2 661 680 T3

ugggcaggaa	cugggcacug	ugcccagggc	augcacugcc	uccacgcagc	aaccucaga	60
guccugagcu	gaaccaagaa	ggaggagggg	gucgggccuc	cgaggaaggc	cuagccgcug	120
cugcugccag	gaaauccagg	uuggaggggc	ggcaaccucc	ugccagccuu	cagggcacuc	180
uccugugccu	gccagaagag	acagagcuug	aggagagcuu	gaggagagca	ggaaaggaca	240
augccgucuu	cugucucgug	gggcauccuc	cugcuggcag	gccugugcug	ccugguccu	300
gucucccugg	cugaggaucc	ccagggagau	gcugcccaga	agacagauac	auccaccau	360
gaucaggau	acccaaccuu	caacaagau	accccccaacc	uggcugaguu	cgccuucagc	420
cuauaccgcc	agcuggcaca	ccaguccaac	agcaccaaua	ucuucuucuc	cccagugagc	480
aucgcuacag	ccuuugcaau	gcucucccug	gggaccaagg	cugacacuca	cgauaaauc	540
cuggagggcc	ugaauuucaa	ccucacggag	auuccggagg	cucagaucca	ugaaggcuuc	600
caggaacucc	uccguaccuu	caaccagcca	gacagccagc	uccagcugac	caccggcaau	660
ggccuguucc	ucagcgaggg	ccugaagcua	guggauaagu	uuuuggagga	uguuaaaaag	720
uuguaccacu	cagaagccuu	cacugucaac	uucggggaca	ccgaagaggc	caagaaacag	780
aucaacgauu	acguggagaa	ggguacucua	gggaaaauug	uggauuuggu	caaggagcuu	840
gacagagaca	caguuuuugc	ucuggugaau	uacaucuucu	uuaaaaggcaa	augggagaga	900
ccuuugaag	ucaaggacac	cgaggaagag	gacuuccacg	uggaccaggu	gaccaccgug	960
aaggugccua	ugaugaagcg	uuuaggcaug	uuuaaccaucc	agcacuguaa	gaagcugucc	1020

ES 2 661 680 T3

agcugggugc	ugcugaugaa	auaccugggc	aaugccaccg	ccaucuuuuu	ccugccugau	1080
gaggggaaac	uacagcaccu	ggaaaaugaa	cucaccaccg	auaucaucac	caaguuccug	1140
gaaaauagaag	acagaagguc	ugccagcuua	cauuuaccca	aacuguccau	uacuggaacc	1200
uaugaucuga	agagcguccu	gggucaacug	ggcaucacua	aggucuucag	caauggggcu	1260
gaccucuccg	gggucacaga	ggaggcacc	cugaagcucu	ccaaggccgu	gcuaaaggcu	1320
gugcugacca	ucgacgagaa	agggacugaa	gcugcugggg	ccauguuuuu	agaggccaau	1380
cccaugucua	ucccccccga	ggucaaguuc	aacaaaccu	uugucuucuu	aaugauugaa	1440
caaaauacca	agucuccccu	cuucauggga	aaagugguga	aucccacca	aaaauaacug	1500
ccucucgcuc	cucaaccccu	ccccuccauc	ccuggcccc	ucccuggaug	acauuaaaga	1560
aggguuagagc	uggucccugc	cugcauguga	cuguaaaucc	cucccauguu	uucucugagu	1620
cucccuuugc	cugcugaggc	uguauguggg	cuccagguaa	cagugcuguc	uucgggcccc	1680
cugaacugug	uucauggagc	aucuggcugg	guaggcacau	gcugggcuug	aauccagggg	1740
ggacugaauc	cucagcuuac	ggaccugggc	ccaucuguuu	cuggagggcu	ccagucucc	1800
uuguccuguc	uuggaguccc	caagaaggaa	ucacagggga	ggaaccagau	accagccaug	1860
accccaggcu	ccaccaagca	ucuucauguc	ccccugcuca	ucccccacuc	ccccccacc	1920
agaguugcuc	auccugccag	ggcuggcugu	gcccacccca	aggcugcccu	ccugggggccc	1980
ccagaacugc	cugaucgugc	cguggcccag	uuuuguggca	ucugcagcaa	cacaagagag	2040
aggacaaugu	ccuccucuug	acccgcuguc	accuaaccag	acucgggccc	ugcaccucuc	2100
aggcacuucu	ggaaaaugac	ugaggcagau	ucuuccugaa	gcccauucuc	cauggggcaa	2160
caaggacacc	uauucugucc	uuguccuucc	aucgcugccc	cagaaagccu	cacauaucuc	2220
cguuuagaau	caggucccuu	cuccccagau	gaagaggagg	gucucugcuu	uguuuucucu	2280
aucuccuccu	cagacuugac	caggcccagc	aggcccaga	agaccuuac	ccuauauccc	2340
uucuccuccc	uagucacaug	gccauaggcc	ugcugauggc	ucaggaaggc	cauugcaagg	2400
acuccucagc	uaugggagag	gaagcacauc	acccauugac	ccccgcaacc	ccucccuuuc	2460
cuccucugag	ucccgacugg	ggccacaugc	agccugacuu	cuuugugccu	guugcugucc	2520
cugcagucuu	cagagggcca	ccgcagcucc	agugccaccg	caggaggcug	uuccugaaua	2580
gcccugugg	uaagggccag	gagaguccuu	ccauccucca	aggcccugcu	aaaggacaca	2640
gcagccagga	aguccccugg	gccccuagcu	gaaggacagc	cugcucccuc	cgucucuacc	2700
aggaauggcc	uuguccuau	gaaggcacug	ccccauccca	aacuaaucua	ggaaucacug	2760
ucuaaccacu	cacugucaug	aauguguacu	uaaaggauga	gguugaguca	uaccaaauag	2820
ugauuucgau	aguucaaaau	ggugaaaaua	gcaauucuc	augauucagu	cuaaucaaug	2880

ES 2 661 680 T3

	<b>gauaccgacu guuucccaca caagucuccu guucucuuaa gcuuacucac ugacagccuu</b>	<b>2940</b>
	<b>ucacucucca caaaauacauu aaagauaugg ccaucaccaa gccccuagg augacaccag</b>	<b>3000</b>
	<b>accugagagu cugaagaccu ggauccaagu ucugacuuuu cccccugaca gcugugugac</b>	<b>3060</b>
	<b>cuucgugaag ucgccaaacc ucucugagcc ccagucuuug cuaguaagac cugccuuuga</b>	<b>3120</b>
	<b>guugguauga uguucaaguu agauaacaaa auguuuauac ccauuagaac agagaauaaa</b>	<b>3180</b>
	<b>uagaacuaca uuucuugca</b>	<b>3199</b>
5	<210> 17 <211> 133 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> De sentido contrario 901 <400> 17	
	<b>ccuggaggcu ugcugaaggc uguaugcugu aagcuggcag accuucuguc guuuuggcca</b>	<b>60</b>
	<b>cugacugacg acagaagcug ccagcuuaca ggacacaagg ccuguuacua gcacucacau</b>	<b>120</b>
	<b>ggaacaaaug gcc</b>	<b>133</b>
15	<210> 18 <211> 133 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> De sentido contrario 914 <400> 18	
	<b>ccuggaggcu ugcugaaggc uguaugcuga auguaagcug gcagaccuuc guuuuggcca</b>	<b>60</b>
	<b>cugacugacg aaggucucag cuuacauuca ggacacaagg ccuguuacua gcacucacau</b>	<b>120</b>
	<b>ggaacaaaug gcc</b>	<b>133</b>
25	<210> 19 <211> 133 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> De sentido contrario 943 <400> 19	
	<b>ccuggaggcu ugcugaaggc uguaugcuga uagguuccag uaauggacag guuuuggcca</b>	<b>60</b>
	<b>cugacugacc uguccaucug gaaccuauca ggacacaagg ccuguuacua gcacucacau</b>	<b>120</b>
	<b>ggaacaaaug gcc</b>	<b>133</b>
35	<210> 20 <211> 1254 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

ES 2 661 680 T3

<220>  
<223> Alfa-1 antitripsina reforzado

<400> 20

5

```

augccgucuu cugucucgug gggcauccuc cugcuggcag gccugugcug ccuggucccu      60
gucucccugg cugaggaucc ccaggagau gcugcccaga agacagauac aucccaccu      120
gaucaggaucc acccaaccuu caacaagau acccccaacc uggcugaguu cgccuucagc      180
cuauaccgcc agcuggcaca ccaguccaac agcaccaua ucuucuucuc cccagugagc      240
aucgcuacag ccuuugcaau gcucucccug gggaccaagg cugacacuca cgaugaauc      300
cuggagggcc ugaauucaa ccucacggag auuccggagg cucagaucca ugaaggcuuc      360
caggaacucc uccguacccu caaccagcca gacagccagc uccagcugac caccggcaau      420
ggccuguucc ucagcgaggg ccugaagcua guggauaagu uuuuggagga uguuaaaaag      480
uuguaccacu cagaagccuu cacugucaac uucggggaca ccgaagaggc caagaaacag      540
aucaacgauu acguggagaa ggguacucua gggaaaauug uggauuuggu caaggagcuu      600
gacagagaca caguuuuugc ucuggugaau uacaucuucu uaaaaggcaa augggagaga      660
ccuuuugaag ucaaggacac cgaggaagag gacuuccacg uggaccaggu gaccaccgug      720
aaggugccua ugaugaagcg uuuaggcaug uuuacaucac agcacuguaa gaagcugucc      780
agcugggugc ugcugaugaa auaccugggc aaugccaccg ccaucuucu ccugccugau      840
gaggggaaac uacagcaccu ggaaaaugaa cucaccacg auaucaucac caaguuccug      900
gaaaaugaag aucgccguag cgcuuucucg caccugccca aguuaagcau caccggcacg      960
uacgaccuga agagcguccu gggucaaacug ggcaucacua aggucuucag caauggggcu      1020
gaccucuccg gggucacaga ggaggcacc cugaagcucu ccaaggccgu gcauaaggcu      1080
gugcugacca ucgacgagaa agggacugaa gcugcugggg ccauguuuuu agaggccaua      1140
cccaugucua ucccccccga ggucaaguuc aacaaacccu uugucuucu aaugauugaa      1200
caaaauacca agucuccccu cuucauggga aaagugguga aucccacca aaaa      1254

```

<210> 21  
<211> 59

10

<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> miARN 910

15

<400> 21  
uaagcuggca gaccuucugu cguuuuggcc acugagugac gacagaagcu gccagcuua 59

<210> 22  
<211> 59  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

20



## ES 2 661 680 T3

<220>  
 <223> miARN 914

5 <400> 22  
 aauguaagcu ggcagaccuu cguuuuggcc acugacugac gaaggucuca gcuuacauu 59

10 <210> 23  
 <211> 58  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> miARN 943

15 <400> 23  
 auagguucca guaauggaca gguuuggcca cugacugacc uguccaucug gaaccuau 58

20 <210> 24  
 <211> 7804  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> 6xmiR doble-CB-GFP

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(163)  
 <223> repeticiones terminales invertidas (RTI)

35 <220>  
 <221> potenciador  
 <222> (182)..(548)  
 <223> Potenciador

40 <220>  
 <221> promotor  
 <222> (549)..(1482)  
 <223> Promotor de la beta actina de pollo

45 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (826)..(1482)  
 <223> intrón

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1502)..(1529)  
 <223> 5' miR

55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1530)..(1550)  
 <223> De sentido contrario 901

60 <220>  
 <221> misc\_signal  
 <222> (1570)..(1588)  
 <223> Sentido directo, delta 2

65 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1593)..(1633)  
 <223> 3' miR

70 <220>  
 <221> misc\_feature

- <222> (1646)..(1674)  
<223> 5' miR
- 5 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1675)..(1695)  
<223> De sentido contrario 914
- 10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1715)..(1733)  
<223> Sentido directo, delta 2
- 15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1738)..(1778)  
<223> 3' miR
- 20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1791)..(1819)  
<223> 5' miR
- 25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1820)..(1840)  
<223> De sentido contrario 943
- 30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1860)..(1878)  
<223> Sentido directo, delta 2
- 35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1883)..(1923)  
<223> 3' miR
- 40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1936)..(2035)  
<223> Globina
- 45 <220>  
<221> gen  
<222> (2072)..(2788)  
<223> Proteina fluorescente verde (GFP)
- 50 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2818)..(2845)  
<223> 5' miR
- 55 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2846)..(2866)  
<223> De sentido contrario 901
- 60 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2886)..(2904)  
<223> Sentido directo, delta 2
- 65 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2909)..(2949)

<223> 3' miR  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (2962)..(2990)  
 <223> 5' miR  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 10 <222> (2991)..(3011)  
 <223> De sentido contrario 914  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (3031)..(3049)  
 <223> sentido directo, delta 2  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (3054)..(3094)  
 <223> 3' miR  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 25 <222> (3107)..(3135)  
 <223> 5' miR  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (3136)..(3156)  
 <223> De sentido contrario 943  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 35 <222> (3176)..(3194)  
 <223> Sentido directo, delta 2  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> (3199)..(3239)  
 <223> 3' miR  
 <220>  
 <221> señal poliA  
 45 <222> (3258)..(3470)  
 <223> cola de poliA  
 <220>  
 <221> promotor  
 50 <222> (3611)..(3739)  
 <223> promotor de la timidina quinasa (Tkp)  
 <220>  
 <221> gen  
 55 <222> (3751)..(4554)  
 <223> Gen de resistencia neo  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 60 <222> (4807)..(4952)  
 <223> Repeticiones terminales invertidas (RTI)  
 <220>  
 <221> gen  
 65 <222> (5972)..(6832)  
 <223> Gen de resistencia a la ampicilina

ES 2 661 680 T3

<400> 24

gggggggggg	gggggggggt	ggccactccc	tctctgcgcg	ctcgctcgct	cactgaggcc	60
gggcgaccaa	aggtcgcccg	acgcccgggc	tttgcccggg	cggcctcagt	gagcgagcga	120
gcgcgcagag	agggagtggc	caactccatc	actagggggt	cctagatctg	aattcggtac	180
cctagttatt	aatagtaatc	aattacgggg	tcattagttc	atagcccata	tatggagttc	240
cgcgttacat	aacttacggt	aatggcccg	cctggctgac	cgcccaacga	cccccgcca	300
ttgacgtcaa	taatgacgta	tgttcccata	gtaacgcaa	tagggacttt	ccattgacgt	360
caatgggtgg	actatттаог	gtaaactgcc	cacttggcag	tacatcaagt	gtatcatatg	420
ccaagtaогс	ccctattga	cgtcaatgac	ggtaaatggc	ccgcctggca	ttatgcccag	480
tacatgacct	tatgggactt	tcctacttgg	cagtacatct	acgtattagt	catcgctatt	540
accatggctg	aggtgagccc	cacgttctgc	ttcactctcc	ccatctcccc	ccctcccca	600
cccccaattt	tgtatттatt	tatттттtaa	ttatттtgтg	cagcgatggg	ggcggggggg	660
gggggggggg	gсgсgсcagg	cgggggcggg	cgggggcgagg	ggcgggggcg	ggcgaggcgg	720
agaggtgсgg	cgгсagccaa	tcagagcgгс	gсgсtсcгaa	agттtсctтт	tatggсgagg	780
cgгсgгсgгс	ggcgгсccta	taaaaagcga	agсгсгсgгс	ggгсgггagт	cgctgсgacg	840
ctgсcttсgс	cccgтgcccc	gctcсgссгс	cgсctсgсгс	cgcccccccc	ggctctgact	900
gaccgсgtta	ctcccacagg	tgagcgгггг	ggacggсcct	tctcctcсgг	gctgтаatta	960
gсgсttgгtt	taatgacggc	ttgттtctтт	tctgtggctg	cgтgaaagcc	ttgagggгct	1020
ccgggagggc	сctттgtгсг	ggggggagcg	gctcgggggg	tgсgtгсgtg	tgtgtgtгсг	1080
tggggagсгс	cgсgtгсггс	ссгсгсгсгс	cgгсgггctgt	gagсгсгсгс	ggсгсггсгс	1140
ggggctттgt	gсgсtссгca	gtgtгсгсga	ggggagсгсг	gссggggгсг	gtgccccгсг	1200
gtгсgggggg	ggctгсгagg	ggaacaaagg	ctгсгггсгг	ggтgtgtгсг	tgggggggtg	1260
agcagggggт	gtggгсгсгг	сггтсггггт	gтаacccccс	cctгсaccccc	cctccccгag	1320
ttgctgagca	cgгccccггт	tcgggtгсгг	ggctcсgtac	ggggсgtггс	gсggggгctгс	1380

ES 2 661 680 T3

ccgtgccggg cgggggggtgg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg ccgcctcggg 1440  
 ccggggaggg ctcgggggag gggcgcggcg gcccccgag cggcggcgac cggtgctagc 1500  
 cctggaggct tgctgaaggc tgtatgctgt aagctggcag accttctgtc gttttggcca 1560  
 ctgactgacg acagaagctg ccagcttaca ggacacaagg cctgttacta gcactcacat 1620  
 ggaacaaatg gccaccggtg tgcatacctgg aggcttgctg aaggctgtat gctgaatgta 1680  
 agctggcaga ccttcgtttt ggccactgac tgacgaaggc ctcagcttac attcaggaca 1740  
 caagcctgt tactagcact cacatggaac aaatggccgc tagctcgca cctggaggct 1800  
 tgctgaaggc tgtatgctga taggttccag taatggacag gttttggcca ctgactgacc 1860  
 tgtccatctg gaacctatca ggacacaagg cctgttacta gcactcacat ggaacaaatg 1920  
 gcctcgcgat gcatctagag cctctgctaa ccatgttcat gccttcttct ttttctaca 1980  
 gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat tttggcaaag aattcctcga 2040  
 agatctaggc ctgcaggcgg ccgccgccac catgagcaag ggcgaggaac tgttcaactg 2100  
 cgtggtccca attctcgtgg aactggatgg cgatgtgaat gggcacaat tttctgtcag 2160  
 cggagagggt gaagggtgat ccacatacgg aaagctcacc ctgaaattca tctgcaccac 2220  
 tggaaagctc cctgtgccat ggccaacact ggtcactacc ctgacctatg gcgtgcagtg 2280  
 cttttccaga taccagacc atatgaagca gcatgacttt ttcaagagcg ccatgcccga 2340  
 gggctatgtg caggagagaa ccatcttttt caaagatgac gggaaactaca agaccgcgc 2400  
 tgaagtcaag ttcgaaggtg acaccctggg gaatagaatc gagctgaagg gcattgactt 2460  
 taaggaggat ggaaacattc tcggccacaa gctggaatac aactataact cccacaatgt 2520  
 gtacatcatg gccgacaagc aaaagaatgg catcaaggtc aacttcaaga tcagacacaa 2580  
 cattgaggat ggatccgtgc agctggccga ccattatcaa cagaacactc caatcgccga 2640  
 cggccctgtg ctctcccag acaaccatta cctgtccacc cagtctgccc tgtctaaaga 2700  
 tcccaacgaa aagagagacc acatggtcct gctggagttt gtgaccgctg ctgggatcac 2760  
 acatggcatg gacgagctgt acaagtgacc tgcaggcgcc ggcgaccggt gctagccctg 2820  
 gaggcttgct gaaggctgta tgctgtaagc tggcagacct tctgtcgttt tggcactga 2880  
 ctgacgacag aagctgccag cttacaggac acaaggcctg ttactagcac tcacatggaa 2940  
 caaatggcca ccggtatgca tcctggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg aatgtaagct 3000  
 ggcagacctt cgttttgcc actgactgac gaaggtctca gcttacattc aggacacaag 3060  
 gcctgttact agcactcaca tggaaacaaat ggccgctagc togcgacctg gaggcttgct 3120  
 gaaggctgta tgctgatagg ttccagtaat ggacaggttt tggcactga ctgacctgtc 3180  
 catctggaac ctatcaggac acaaggcctg ttactagcac tcacatggaa caaatggcct 3240

ES 2 661 680 T3

cgcgatgcat ctgagcggc cgcggggatc cagacatgat aagatacatt gatgagtttg 3300  
 gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta 3360  
 ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc 3420  
 attttatggt tcaggttcag ggggaggtgt gggaggtttt ttagtcgacc tcgagcagtg 3480  
 tggttttgca agaggaagca aaaagcctct ccaccagggc ctggaatggt tccaccaag 3540  
 tcgaaggcag tgtggttttg caagaggaag caaaaagcct ctccaccag gcctggaatg 3600  
 tttccacca atgtcgagca accccgcca gcgtcttgtc attggcgaat tcgaacacgc 3660  
 agatgcagtc ggggcggcgc ggtcccaggt ccacttcgca tattaaggtg acgcgtgtgg 3720  
 cctcgaacac cgagcgacc tgcagccaat atgggatcgg ccattgaaca agatggattg 3780  
 cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg gctatgactg ggcacaacag 3840  
 acaatcggct gctctgatgc cgccgtgttc cggtgtcag cgcagggcg cccggttctt 3900  
 tttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta 3960  
 tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg 4020  
 ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg cggggcagg atctcctgtc atctcacctt 4080  
 gctcctgcc agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat 4140  
 ccggtacct gccattcga ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg 4200  
 atggaagccg gtcttgcga tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca 4260  
 gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc atgcccagc gcgaggatct cgtcgtgacc 4320  
 catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc 4380  
 gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc taccctgat 4440  
 attgctgaag agcttggcgg cgaatgggt gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc 4500  
 gctcccatt cgcagcgc atccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgaggggat 4560  
 ccgtcgacta gagctcgctg atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcc aacctctggt 4620  
 gtttgccct ccccgtgcc ttccttgacc ctggaaggtg ccaactccac tgcctttcc 4680  
 taataaaatg aggaaattgc atcgcattgt ctgagtaggt gtcattctat tctgggggt 4740  
 ggggtggggc aggacagcaa gggggaggt tgggaagaca atagcaggca tgctggggag 4800  
 agatctagga acccctagt atggagttgg ccactccctc tctgcgcgct cgtcgcctca 4860  
 ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt tggtcgccc gcctcagtga 4920  
 gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca acccccccc cccccccct gcagccctgc 4980  
 attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt 5040  
 cctcgtcac tgactcgctg cgctcggctg ttccgctgcg gcgagcggta tcagctcact 5100  
 caaaggcgggt aatcgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 5160

ES 2 661 680 T3

caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata 5220  
 ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaacc 5280  
 cgacaggact ataaagatac caggcgtttc ccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg 5340  
 ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc 5400  
 tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg 5460  
 gctgtgtgca cgaaccccc gccagcccc accgctgccc cttatccggt aactatcgtc 5520  
 ttgagtccaa cccggttaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga 5580  
 ttagcagagc gaggtatgta ggccgtgcta cagagttctt gaagtggctg cctaactacg 5640  
 gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa 5700  
 aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg 5760  
 tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 5820  
 ctacgggggc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgta agggattttg gtcacgagat 5880  
 tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct 5940  
 aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta 6000  
 tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg actccccgctc gtgtagataa 6060  
 ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctc aatgataccg cgagaccac 6120  
 gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaaggcc gagcgcagaa 6180  
 gtggctctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgcccg gaagctagag 6240  
 taagtagttc gccagttaat agtttgccga acgttgttgc cattgctaca ggcacgtgg 6300  
 tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag 6360  
 ttacatgac ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggctct ccgatcgttg 6420  
 tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 6480  
 ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac 6540  
 tctgagaata gtgtatgccc cgaccgagtt gctcttggcc ggcgtcaata cgggataata 6600  
 ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgctct tcggggcgaa 6660  
 aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca 6720  
 actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 6780  
 aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 6840  
 tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcggg tacatatttg 6900  
 aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 6960  
 ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga 7020

ES 2 661 680 T3

ggccctttcg tctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc 7080  
 cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg 7140  
 cgtcagcggg tgttgccggg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg 7200  
 tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 7260  
 gcatcaggaa attgtaaacg ttaatatattt gttaaaattc gcgttaaatt tttgttaaatt 7320  
 cagctcattt ttaaccaat aggccgaaat cggcaaaatc cttataaat caaaagaata 7380  
 gaccgagata gggttgagtg ttgttccagt ttggaacaag agtccactat taaagaacgt 7440  
 ggactccaac gtcaaagggc gaaaaaccgt ctatcagggc gatggcccac tacgtgaacc 7500  
 atcacccctaa tcaagttttt tggggtcgag gtgccgtaaa gcactaaatc ggaaccctaa 7560  
 agggagcccc cgatttagag cttgacgggg aaagccggcg aacgtggcga gaaaggaagg 7620  
 gaagaaagcg aaaggagcgg gcgctagggc gctggcaagt gtagcggcca cgctgcgcgt 7680  
 aaccaccaca cccgccgcgc ttaatgcgcc gctacagggc gcgtcgcgcc attcgcatt 7740  
 caggctacgc aactgttggg aagggcgac ggtgcgggcc tcttcgctat tacgccaggc 7800  
 tgca 7804

5 <210> 25  
 <211> 7667  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> PolyA-3XmiR-CB-GFP

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (17)..(163)  
 <223> Repeticiones terminales invertidas (RTI)

20 <220>  
 <221> potenciador  
 <222> (182)..(548)  
 <223> Potenciador

25 <220>  
 <221> promotor  
 <222> (549)..(1795)  
 <223> Promotor de la beta actina de pollo

30 <220>  
 <221> Intrón  
 <222> (826)..(1795)  
 <223> Intrón

35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1796)..(1898)  
 <223> Globina

<220>



## ES 2 661 680 T3

<221> gen  
<222> (1935)..(2651)  
<223> Proteina fluorescente verde (GFP)

5 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2681)..(2708)  
<223> 5' miR

10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2709)..(2729)  
<223> De sentido contrario 901

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2749)..(2767)  
<223> Sentido directo, delta 2

20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2772)..(2812)  
<223> 3' miR

25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2854)..(2874)  
<223> De sentido contrario 914

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2894)..(2912)  
<223> Sentido directo, delta 2

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2917)..(2957)  
<223> 3' miR

40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2970)..(2998)  
<223> 5' miR

45 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (2999)..(3019)  
<223> De sentido contrario 943

50 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3039)..(3057)  
<223> Sentido directo, delta 2

55 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3062)..(3102)  
<223> 3' miR

60 <220>  
<221> señal poliA  
<222> (3121)..(3333)  
<223> cola de poliA

65 <220>  
<221> promotor

ES 2 661 680 T3

<222> (3474)..(3602)  
 <223> promotor de la timidina quinasa (Tkp)

5 <220>  
 <221> gen  
 <222> (3614)..(4417)  
 <223> Gen de resistencia a la neomicina

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (4670)..(4815)  
 <223> repeticiones terminales invertidas (RTI)

15 <220>  
 <221> gen  
 <222> (5835)..(6695)  
 <223> Gen de resistencia a la ampicilina

20 <400> 25

```

ggggggggggg ggggggggtt ggccaactccc tctctgcgcg ctogctogct cactgaggcc 60
gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgccggg cggectcagt ggcgagcga 120
gcgcgagag agggagtggc caactccatc actaggggtt cctagatctg aattcggtac 180
cctagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagccata tatggagttc 240
cgcgttacat aacttacggt aatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca 300
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt 360
caatgggtgg actatttacg gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg 420
ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc cgcctggca ttatgccag 480
tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 540
accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccctctccc cccctccca 600
cccccaattt tgtatttatt tatttttaa ttattttggt cagcgatggg ggcggggggg 660
gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg 720
agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg 780
cggcgggcggc ggcggcccta taaaagcga agcgcggcggc gggcgggagt cgctgcgacg 840
ctgccttcgc ccgtgcccc gctccgcgcg cgcctcgcgc cgcccgcgcc ggetctgact 900
gaccgcgtta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggccct tctcctcgg gctgtaatta 960
gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc ttgaggggct 1020
ccgggagggc cctttgtgcg ggggggagcg gctcgggggg tgctgctgctg tgtgtgtgcg 1080
tggggagcgc cgcgtgcggc ccgcgctgcc cggcggctgt gagcgtgcg ggcgcggcgc 1140
ggggctttgt gcgctccgca gtgtgcgcga ggggagcgcg gccggggggc gtgccccgcg 1200
    
```

ES 2 661 680 T3

gtgcgggggg ggctgcgagg ggaacaaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg tgggggggtg 1260  
 agcaggggggt gtggggcgcg cggtcgggct gtaaccccc cctgcacccc cctccccgag 1320  
 ttgctgagca oggccccgct tcgggtgcgg ggctccgtac ggggcgtggc gcggggctcg 1380  
 ccgtgccggg cgggggggtg cggcaggtg gggtgccggg cggggcgggg ccgcctcggg 1440  
 cgggggaggg ctcgggggag gggcgcgggc gcccccgag cgcggcgggc tgtcgaggcg 1500  
 cggcgagccg cagccattgc cttttatggt aatcgtgcga gagggcgag ggacttcctt 1560  
 tgtcccaaat ctgtgcggag ccgaaatctg ggaggcgccg ccgcaccccc tctagcgggc 1620  
 gcggggcgaa gcgggtgcggc gccggcagga aggaaatggg cggggagggc cttcgtgcgt 1680  
 cgcgcgcccg ccgtcccctt ctccctctcc agcctcgggg ctgtccgcgg ggggacggct 1740  
 gccttcgggg gggacggggc agggcggggg tcggcttctg gcgtgtgacc ggcggctcta 1800  
 gagcctctgc taaccatggt catgccttct tcttttctt acagctcctg ggcaacgtgc 1860  
 tggttatgt gctgtctcat ctttttgga aagaattcct cgaagatcta ggctgcagg 1920  
 cggccgcccg caccatgagc aagggcgagg aactgttcac tggcgtggtc ccaattctcg 1980  
 tggaaactgga tggcgatgtg aatgggcaca aattttctgt cagcggagag ggtgaagggtg 2040  
 atgccacata oggaaagctc accctgaaat tcatctgcac cactggaaag ctccctgtgc 2100  
 catggccaac actggtcact accctgacct atggcgtgca gtgcttttcc agatacccag 2160  
 accatatgaa gcagcatgac tttttcaaga gcgccatgcc cgagggctat gtgcaggaga 2220  
 gaaccatctt tttcaaagat gacgggaact acaagaccg cgtgaagtc aagttcgaag 2280  
 gtgacaccct ggtgaataga atcgagctga agggcattga ctttaaggag gatggaaaca 2340  
 ttctcggcca caagctggaa tacaactata actcccacaa tgtgtacatc atggccgaca 2400  
 agcaaaagaa tggcatcaag gtcaacttca agatcagaca caacattgag gatggatccg 2460  
 tgcagctggc cgaccattat caacagaaca ctccaatcg cgacggccct gtgctcctcc 2520  
 cagacaacca ttacctgtcc acccagtctg ccctgtctaa agatcccac gaaaagagag 2580  
 accacatggt cctgctggag tttgtgaccg ctgctgggat cacacatggc atggacgagc 2640  
 tgtacaagt acctgcaggc gccggcgacc ggtgctagcc ctggaggctt gctgaaggct 2700  
 gtatgctgta agctggcaga ccttctgtcg ttttgccac tgactgacga cagaagctgc 2760  
 cagcttacag gacacaaggc ctgttactag cactcacatg gaacaaatgg ccaccggtat 2820  
 gcatectgga ggcttgctga aggtgtatg ctgaaatgaa gctggcagac cttcgttttg 2880  
 gccactgact gacgaaggct tcagcttaca ttcaggacac aaggcctgtt actagcactc 2940  
 acatggaaca aatggccgct agctcgcgac ctggaggctt gctgaaggct gtatgctgat 3000  
 aggttccagt aatggacag ttttgccac tgactgacct gtccatctgg aacctatcag 3060  
 gacacaaggc ctgttactag cactcacatg gaacaaatgg cctcgcgatg catctagagc 3120

ES 2 661 680 T3

ggccgcgggg atccagacat gataagatac attgatgagt ttggacaaac cacaactaga 3180  
 atgcagtgaa aaaaatgctt tatttgtgaa atttgtgatg ctattgcttt atttgtaacc 3240  
 attataagct gcaataaaca agttaacaac acaattgca ttcattttat gtttcaggtt 3300  
 cagggggagg tgtgggagg tttttagtcg acctcgagca gtgtggtttt gcaagaggaa 3360  
 gcaaaaagcc tctccacca ggcttgaat gtttccacc aagtcgaagg cagtgtggtt 3420  
 ttgcaagagg aagcaaaaag cctctccacc caggcctgga atgtttccac ccaatgtoga 3480  
 gcaacccccg ccagcgtctt gtcattggcg aattcgaaca cgcagatgca gtcggggcgg 3540  
 cgcggtccca ggtccacttc gcatattaag gtgacgcgtg tggcctcgaa caccgagoga 3600  
 ccotgcagcc aatatgggat cggccattga acaagatgga ttgcacgcag gttctccggc 3660  
 cgcttgggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa cagacaatcg gctgctctga 3720  
 tgccgccgtg ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccggtt ctttttgtca agaccgacct 3780  
 gtccggtgcc ctgaatgaac tgcaggacga ggcagcgcgg ctatcgtggc tggccaacgac 3840  
 gggcgttcct tgccgagctg tgctcgacgt tgtcaactgaa gggggaaggg actggctgct 3900  
 attgggcgaa gtgccggggc aggatctcct gtcactcac cttgctcctg ccgagaaagt 3960  
 atccatcatg gctgatgcaa tggggcggct gcatacgtt gatccggcta cctgccatt 4020  
 cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact cggatggaag ccggtcttgt 4080  
 cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggctcgcg ccagccgaac tgttcgccag 4140  
 gctcaaggcg cgcagcccc acggcgagga tctcgtcgtg acccatggcg atgcctgctt 4200  
 gccgaatata atggtggaat atggccgctt ttctggattc atcgactgtg gccggctggg 4260  
 tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt ggetaccctg gatattgctg aagagcttgg 4320  
 cggcgaatgg gctgaccgct tcctcgtgct ttacggatc gccgctcccg attcgcagcg 4380  
 catgccttc tatgccttc ttgacgagtt cttctgaggg gatccgtcga ctagagctcg 4440  
 ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg 4500  
 gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat 4560  
 tgcatcgcac tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtgggggtg ggcaggacag 4620  
 caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gagagatcta ggaaccoccta 4680  
 gtgatggagt tggcactcc ctctctgcgc gctcgtcgc tcaactgagge cgcccgggca 4740  
 aagcccgggc gtcgggcgac ctttggctgc cggcctcag tgagcgagcg agcgcgcaga 4800  
 gaggagtgag ccaaccccc ccccccccc cctgcagccc tgcattaatg aatcggccaa 4860  
 cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgtcttccg cttcctcgt cactgactcg 4920  
 ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg 4980

ES 2 661 680 T3

ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaaag ccagcaaaaag 5040  
 gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggetccg cccccctgac 5100  
 gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacag actataaaga 5160  
 taccagggct ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgocgctt 5220  
 accggatacc tgtccgctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca atgctcacgc 5280  
 ttaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct 5340  
 cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta 5400  
 agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat 5460  
 gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca 5520  
 gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct 5580  
 tgatccggca aacaaaccac cgcgtgtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa gcagcagatt 5640  
 acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct 5700  
 cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc 5760  
 acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa 5820  
 acttggctctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta 5880  
 tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtctgttaga taactacgat acgggagggc 5940  
 ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgogagacc cacgctcacc ggctccagat 6000  
 ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggcc tgcaacttta 6060  
 tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt 6120  
 aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctctctgctt 6180  
 ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg 6240  
 ttgtgcaaaa aagcggtag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc 6300  
 gcagtggtat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc 6360  
 gtaagatgct tttctgtgac tggtgagtac toaaccaagt cattctgaga atagtgtatg 6420  
 cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca atacgggata ataccgcgcc acatagcaga 6480  
 actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta 6540  
 ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct 6600  
 tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaag 6660  
 ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tctttttca atattattga 6720  
 agcatttate agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgat ttagaaaaat 6780  
 aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc 6840  
 attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtctcgcg 6900

ES 2 661 680 T3

cgtttcgggtg atgacgggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct 6960  
 tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgttggc 7020  
 ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcccga tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat 7080  
 atgcggtgtg aaataccgca cagatgctga aggagaaaat accgcatcag gaaattgtaa 7140  
 acgttaatat tttgttaaaa ttcgcgtaa atttttgtta aatcagctca ttttttaacc 7200  
 aataggccga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga 7260  
 gtgttgttcc agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag 7320  
 ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcacc taatcaagtt 7380  
 ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaacc taaagggagc ccccgattta 7440  
 gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag 7500  
 cgggctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgag cgtaaccacc acaccgccg 7560  
 cgcttaatgc gccgctacag ggcgctgag gccattcgcc attcaggcta cgcaactggt 7620  
 gggaagggcg atcgggtgagg gcctcttcgc tattacgcca ggctgca 7667

- 5 <210> 26
- <211> 7337
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> 3XmiR-CB-GFP intrónico
  
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (17)..(163)
- <223> Repeticiones terminales invertidas (RTI)
  
- 20 <220>
- <221> potenciador
- <222> (182)..(548)
- <223> potenciador
  
- 25 <220>
- <221> promotor
- <222> (549)..(1482)
- <223> Promotor de la beta actina de pollo
  
- 30 <220>
- <221> Intrón
- <222> (826)..(1482)
- <223> Intrón de la beta actina de pollo
  
- 35 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1502)..(1529)
- <223> 5' miR
  
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1530)..(1550)
- <223> De sentido contrario 901

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1570)..(1588)  
 <223> Sentido directo, delta 2  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1593)..(1633)  
 <223> 3' miR  
 10  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1646)..(1674)  
 <223> 5' miR  
 15  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1675)..(1695)  
 <223> De sentido contrario 914  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1715)..(1733)  
 <223> Sentido directo, delta 2  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1738)..(1778)  
 <223> 3' miR  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1791)..(1819)  
 <223> 5' miR  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1820)..(1840)  
 <223> De sentido contrario 943  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1860)..(1878)  
 <223> Sentido directo, delta 2  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1883)..(1923)  
 <223> 3' miR  
 50  
 <220>  
 <221> gen  
 <222> (2072)..(2788)  
 <223> GFP  
 55  
 <220>  
 <221> señal poliA  
 <222> (2789)..(3003)  
 <223> cola de poliA  
 60  
 <220>  
 <221> promotor  
 <222> (3144)..(3272)  
 <223> promotor de la timidina quinasa (Tkp)  
 65  
 <220>

ES 2 661 680 T3

- <221> gen
- <222> (3284)..(4087)
- <223> Gen de resistencia a la neomicina
  
- 5 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (4340)..(4485)
- <223> Repeticiones terminales invertidas (RTI)
  
- 10 <220>
- <221> gen
- <222> (5505)..(6365)
- <223> Ampicilina (complemento)
  
- 15 <400> 26

```

gggggggggg gggggggggt ggccactccc tctctgcgcg etcgetcget cactgaggcc      60
gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc ttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga      120
gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt cctagatctg aattcggtac      180
cctagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc      240
cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccccacca      300
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt      360
caatgggtgg actatttacg gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg      420
ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgccag      480
tacatgacct tatgggactt tctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt      540
accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccactctccc cccctcccca      600
cccccaattt tgtatttatt tattttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg      660
gggggggggg gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg      720
agaggtgagg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg      780
cggcggcggc ggcggcccta taaaagcga agcgcgcggc ggcgggagt cgtcgcgacg      840
ctgccttcgc ccggtgcccc gctccgcgcg cgcctcgcgc cgcccgcgcc ggcctcgtact      900
gaccgogtta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggccct tctcctccgg gctgtaatta      960
gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc ttgaggggct     1020
ccgggagggc cctttgtgcg ggggggagcg gctcgggggg tgcgtgctg tgtgtgtgcg     1080
tggggagcgc cgcgtgcggc ccgcgtgcc cggcggctgt gagcgtgcg ggcgcggcgc     1140
ggggctttgt gcgctccgca gtgtgcgcga ggggagcgcg gccgggggcg gtgccccgcg     1200
gtgcgggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcg ggtgtgtgcg tgggggggtg     1260

```



ES 2 661 680 T3

agcagggggt gtgggcgcgg cggtcgggct gtaaccccc cctgcacccc cctccccgag 1320  
 ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtac ggggcgtggc gcggggctcg 1380  
 ccgtgccggg cgggggggtgg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg cgcctcggg 1440  
 ccggggaggg ctccgggggag gggcgcggcg gcccccgag cgcggcgac cggtgctagc 1500  
 cctggaggct tgctgaaggc tgtatgctgt aagctggcag accttctgtc gttttggcca 1560  
 ctgactgacg acagaagctg ccagcttaca ggacacaagg cctgttacta gcactcacat 1620  
 ggaacaaatg gccaccgta tgcacctgg aggcttctg aaggctgtat gctgaatgta 1680  
 agctggcaga ccttcgtttt ggccactgac tgacgaaggc ctcagcttac attcaggaca 1740  
 caaggcctgt tactagcact cacatggaac aaatggccgc tagctcgcga cctggaggct 1800  
 tgctgaaggc tgtatgctga taggttccag taatggacag gttttggcca ctgactgacc 1860  
 tgtccatctg gaacctatca ggacacaagg cctgttacta gcactcacat ggaacaaatg 1920  
 gcctcgggat gcatctagag cctctgctaa ccatgttcat gccttcttct ttttctaca 1980  
 gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat ttggcaaag aattcctcga 2040  
 agatctaggc ctgcaggcgg ccgccgccac catgagcaag ggcgaggaac tgttactgg 2100  
 cgtggtccca attctcgtgg aactggatgg cgatgtgaat gggcaciaat tttctgtcag 2160  
 cggagagggg gaagggtgat ccacatacgg aaagctcacc ctgaaattca tctgcaccac 2220  
 tggaaagctc cctgtgccat ggccaacact ggtcactacc ctgacctatg gcgtgcagtg 2280  
 cttttccaga taccagacc atatgaagca gcatgacttt ttcaagagcg ccatgccgga 2340  
 gggctatgtg caggagagaa ccatcttttt caaagatgac gggaaactaca agaccgcgc 2400  
 tgaagtcaag ttcgaagggt acaccctggt gaatagaatc gagctgaagg gcattgactt 2460  
 taaggaggat ggaacattc tcggccacaa gctggaatac aactataact cccacaatgt 2520  
 gtacatcatg gccgacaagc aaaagaatgg catcaaggct aacttcaaga tcagacacaa 2580  
 cattgaggat ggatccgtgc agctggccga ccattatcaa cagaacactc caatcggcga 2640  
 cggccctgtg ctctcccag acaaccatta cctgtccacc cagtctgcc tgtctaaaga 2700  
 tcccaacgaa aagagagacc acatggtcct gctggagttt gtgaccgctg ctgggatcac 2760  
 acatggcatg gacgagctgt acaagtgagc ggccgcgggg atccagacat gataagatac 2820  
 attgatgagt ttggacaaac cacaactaga atgcagtga aaaaatgctt tatttgtgaa 2880  
 atttgtgatg ctattgcttt atttgtaacc attataagct gcaataaaca agttaacaac 2940  
 aacaattgca ttcattttat gtttcagggt caggggggag tgtgggaggt tttttagtcg 3000  
 acctcgagca gtgtggtttt gcaagaggaa gcaaaaagcc tctccacca ggcctggaat 3060  
 gtttccacco aagtcgaagg cagtgtggtt ttgcaagagg aagcaaaaag cctctccacc 3120

ES 2 661 680 T3

caggcctgga atgtttccac ccaatgtcga gcaacccccgc ccagcgtctt gtcattggcg 3180  
 aattcgaaca cgcagatgca gtcggggcgg cgcgggccca ggtccaactc gcatattaag 3240  
 gtgacgcgtg tggcctcgaa caccgagcga ccctgcagcc aatatgggat cggccattga 3300  
 acaagatgga ttgcacgcag gttctccggc cgcttgggtg gagaggctat tccgctatga 3360  
 ctgggcacaa cagacaatcg gctgctctga tgccgcctg tcccgctgt cagcgcaggg 3420  
 gcgcccgggt ctttttgtca agaccgacct gtccgggtgcc ctgaatgaac tgcaggacga 3480  
 ggcagcgggg ctatcgtggc tggccacgac gggcgcttct tgccagctg tgctcagct 3540  
 tgtcactgaa gcgggaaggg actggctgct attggggcga gtgccggggc aggatctcct 3600  
 gtcactcac cttgctcctg ccgagaaagt atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggct 3660  
 gcatacgtt gatccgcta cctgccatt cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg 3720  
 agcacgtact cggatggaag ccggctctgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca 3780  
 ggggctcggc ccagccgaac tgttcgccag gctcaaggcg cgcattgccg acggcgagga 3840  
 tctcgtcgtg acccatggcg atgcctgctt gccgaatata atggtggaaa atggccgctt 3900  
 ttctggattc atcactgtg gccggctggg tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt 3960  
 ggctaccogt gatattgctg aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgct tcctcgtgct 4020  
 ttacggtatc gccgctcccg attcgcagcg catcgccttc tatcgccttc ttgacgagtt 4080  
 cttctgaggg gatccgtcga ctagagctcg ctgatcagcc togactgtgc cttctagttg 4140  
 ccagccatct gttgtttgcc cctccccgtt gccttccttg accctggaag gtgccactcc 4200  
 cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcacgcgat tgtctgagta ggtgtcattc 4260  
 tattctgggg ggtgggggtg ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag 4320  
 gcatgctggg gagagatcta ggaaccctta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc 4380  
 gctcgtcgc tcaactgaggc cgcgccggca aagcccgggc gtcggggcag ctttggtcgc 4440  
 ccggcctcag tgagcgagcg agcgcgcaga gagggagtgg ccaaccccc ccccccccc 4500  
 cctgcagccc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggtt gcgtattggg 4560  
 cgctcttcg cttcctcgt cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg 4620  
 gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga 4680  
 aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg 4740  
 gcgtttttcc ataggctcgg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag 4800  
 aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc 4860  
 gtgcgctctc ctgttcggac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctccctcg 4920  
 ggaagcgtgg cgctttctca atgctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg taggtcgtt 4980  
 cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacct cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc 5040

ES 2 661 680 T3

ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc 5100  
 actggttaaca ggattagcag agcgaggat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg 5160  
 tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca 5220  
 gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc 5280  
 ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat 5340  
 cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaag aaaactcacg ttaagggatt 5400  
 ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt 5460  
 tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctctg acagttacca atgcttaatc 5520  
 agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc 5580  
 gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gcccagtgcc tgcaatgata 5640  
 ccgagagacc cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg 5700  
 gccgagcgca gaagtggacc tgcaacttta tccgctcca tccagctat taattgttgc 5760  
 cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct 5820  
 acaggcatcg tgggtgcacg ctcgctgctt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa 5880  
 cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccctcggc 5940  
 cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca 6000  
 ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac 6060  
 tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtca 6120  
 atacgggata ataccgccc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt 6180  
 tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacc 6240  
 actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgttcc tgggtgagca 6300  
 aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atggtgaata 6360  
 ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc 6420  
 ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc 6480  
 cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat 6540  
 aggcgatca cgaggccctt tcgtctcggc cgtttcggtg atgacgggga aaacctctga 6600  
 cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa 6660  
 gcccgtcagg gcgctgcagc ggggtgttggc ggggtgctggg gctggcttaa ctatgctgca 6720  
 tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta 6780  
 aggagaaaat accgcatcag gaaattgtaa acgttaatat tttgttaaaa ttcgcttaa 6840  
 atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa atccctata 6900

ES 2 661 680 T3

aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtggttgtcc agtttggaac aagagtccac 6960  
tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc 7020  
cactacgtga accatcaccc taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa 7080  
atcggaaacc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg 7140  
cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg 7200  
tcacgctgcg cgtaaccacc acaccgcccg cgcttaatgc gccgctacag ggcgctcgc 7260  
gccattcggc attcaggcta cgcaactggt gggaaagggc atcgggtcgg gcctcttcgc 7320  
tattacgcca ggctgca 7337

5 <210> 27  
<211> 8223  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> PolyA-3XmiR-CB-AAT

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(163)  
<223> Repeticiones terminales invertidas (RTI)

20 <220>  
<221> potenciador  
<222> (182)..(548)  
<223> potenciador

25 <220>  
<221> promotor  
<222> (549)..(1795)  
<223> Promotor de la beta actina de pollo

30 <220>  
<221> Intrón  
<222> (826)..(1795)  
<223> Intrón

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1796)..(1898)  
<223> Globina

40 <220>  
<221> gen  
<222> (1921)..(3174)  
<223> Alfa-1 antitripsina reforzado (AAT)

45 <220>  
<221> misc\_signal  
<222> (3175)..(3204)  
<223> Cmyc-tag

50 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3237)..(3264)  
<223> 5' miR

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3265)..(3285)  
 <223> De sentido contrario 901  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3305)..(3323)  
 <223> Sentido directo, delta 2  
 10  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3328)..(3368)  
 <223> 3' miR  
 15  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3381)..(3409)  
 <223> 5' miR  
 20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3410)..(3430)  
 <223> De sentido contrario 914  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3450)..(3468)  
 <223> Sentido directo, delta 2  
 30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3473)..(3513)  
 <223> 3' miR  
 35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3526)..(3554)  
 <223> 5' miR  
 40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3555)..(3575)  
 <223> De sentido contrario 943  
 45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3595)..(3613)  
 <223> Sentido directo, delta 2  
 50  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3618)..(3658)  
 <223> 3' miR  
 55  
 <220>  
 <221> señal poliA  
 <222> (3677)..(3889)  
 <223> cola de poliA  
 60  
 <220>  
 <221> promotor  
 <222> (4030)..(4158)  
 <223> promotor de la timidina quinasa (Tkp)  
 65  
 <220>

ES 2 661 680 T3

<221> gen  
 <222> (4170)..(4973)  
 <223> Gen de resistencia a la neomicina

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5226)..(5371)  
 <223> Repeticiones terminales invertidas (RTI)

10 <220>  
 <221> gen  
 <222> (6391)..(7251)  
 <223> Gen de resistencia a la ampicilina (complemento) <400> 27

```

    gggggggggg gggggggggt ggccaactccc tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc      60
    gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga      120
    gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actagggggt cctagatctg aattcggtac      180
    cctagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc      240
    cgcgttacat aacttaecgt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca      300
    ttgacgtcaa taatgaogta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt      360
    caatgggtgg actatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg      420
    ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag      480
    tacatgacct tatgggactt tectacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt      540
    accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc tteactctcc ccatctcccc cccctccca      600
    cccccaatth tgtatthatt tathththaa ttaththtg ggcgatggg ggcggggggg      660
    gggggggggc gcgcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgagggcg      720
    agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg      780
    cggcggcggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc ggcggggagt cgctgcgacg      840
    ctgccttcgc cccgtgcccc gctccgcgc cgcctcgcgc cgcggggggg ggcctctgact      900
    gaccgcgtha ctcccacagg tgagcggggc ggacggccct tctcctcgg gctgtaatta      960
    gcgcttggtt taatgaoggc ttgthththt tctgtggctg cgtgaaagcc ttgaggggct     1020
    ccgggagggc cctthtgtcg ggggggagcg gctcgggggg tgcgtgcgtg tgtgtgtgcg     1080
    tggggagcgc cgcgtgcggc ccgcgctgcc cggcggctgt gagcgtgcg ggcgcggcgc     1140
    ggggctthgt gcgctccgca gtgtgcgcga ggggagcgcg gccggggggc gtgccccgcg     1200
    gtgcgggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg tggggggggt     1260
    
```

15

ES 2 661 680 T3

agcagggggt gtgggcgcgg cggtcgggct gtaaccccc cctgcacccc cctccccgag 1320  
 ttgctgagca cggccccgct tcgggtgagg ggctccgtac ggggctgagg gcggggctcg 1380  
 ccgtgccggg cgggggggtg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg ccgcctcggg 1440  
 cgggggaggg ctggggggag gggcgcggcg gcccccgag cggcggcggc tgtcgaggcg 1500  
 cggcgagccg cagccattgc cttttatggt aatcgtgcga gagggcgag ggacttcctt 1560  
 tgtcccaaat ctgtgcggag ccgaaatctg ggaggcggc ccgcaccccc tctagcgggc 1620  
 ggggggcgaa gcggtgcggc gccggcagga aggaaatggg cggggagggc cttcgtgcgt 1680  
 cggcgcggcg ccgtcccctt ctccctctcc agcctcgggg ctgtccggcg ggggacggct 1740  
 gccttcgggg gggacggggc agggcggggg tcggcttctg gcgtgtgacc ggcggctcta 1800  
 gagcctctgc taaccatggt catgccttct tcttttctcc acagctcctg ggcaacgtgc 1860  
 tggttattgt gctgtctcat ctttttggca aagaattcct cgaagatcta ggcctgcagg 1920  
 atgccgtctt ctgtctcgtg gggcatcctc ctgctggcag gcctgtgctg cctggtcctt 1980  
 gtctccctgg ctgaggatcc ccaggagat gctgccaga agacagatac atcccaccat 2040  
 gatcaggatc acccaacctt caacaagatc accccaacc tggctgagtt cgccttcagc 2100  
 ctataccgcc agctggcaca ccagtccaac agcaccaata tcttcttctc ccagtgagc 2160  
 atcgctacag cctttgcaat gctctccctg gggaccaagg ctgacactca cgatgaaatc 2220  
 ctggagggcc tgaatttcaa cctcacggag attccggagg ctcagatcca tgaaggcttc 2280  
 caggaactcc tccgtaccct caaccagcca gacagccagc tccagctgac caccggcaat 2340  
 ggcctgttcc tcagcgaggg cctgaagcta gtggataagt ttttgaggga tgttaaaaag 2400  
 ttgtaccact cagaagcctt cactgtcaac ttcggggaca ccgaagaggc caagaaacag 2460  
 atcaacgatt acgtggagaa gggtaactca gggaaaattg tggatttggg caaggagctt 2520  
 gacagagaca cagtttttgc tctggtgaat tacatcttct ttaaaggcaa atgggagaga 2580  
 ccctttgaag tcaaggacac cgaggaagag gacttccagc tggaccaggg gaccaccgtg 2640  
 aagggtccta tgatgaagcg tttaggcatg ttaacatcc agcactgtaa gaagctgtcc 2700  
 agctgggtgc tgctgatgaa atacctgggc aatgccaccg ccatcttctt cctgcctgat 2760  
 ggggggaaac tacagcacct ggaaaatgaa ctaccccagc atatcatcac caagttcctg 2820  
 gaaaatgaag atgccgtag cgcttctctg cacctgcca agttaagcat caccggcacg 2880  
 tacgacctga agagcgtcct gggccaactg ggcactacta aggtcttcag caatggggct 2940  
 gacctctccg gggtcacaga ggagcacc ccgaagctct ccaaggccgt gcataaggct 3000  
 gtgctgacca tcgacgagaa agggactgaa gctgctgggg ccatgttttt agaggccata 3060  
 cccatgteta tccccccgga ggtcaagttc aacaaaccct ttgtcttctt aatgattgaa 3120  
 caaaatacca agtctcccct cttcatggga aaagtgggta atcccacca aaaagagcag 3180

ES 2 661 680 T3

aagctgatca gcgaggagga cctgtagcct gcaggcgccg gcgaccggg gtagccctgg 3240  
aggcttgctg aaggctgtat gctgtaagct ggcagacctt ctgtcgtttt ggccactgac 3300  
tgaccgacaga agctgccagc ttacaggaca caaggcctgt tactagcact cacatggaac 3360  
aatggccac cggtatgcat cctggaggct tgctgaaggc tgtatgctga atgtaagctg 3420  
gcagaccttc gttttggcca ctgactgacg aaggctctcag cttacattca ggacacaagg 3480  
cctgttacta gcactcacat ggaacaaatg gccgctagct cgcgacctgg aggcttgctg 3540  
aaggctgtat gctgataggt tccagtaatg gacaggtttt ggccactgac tgacctgtcc 3600  
atctggaacc tatcaggaca caaggcctgt tactagcact cacatggaac aatggcctc 3660  
gcgatgcac tagagcggcc gcggggatcc agacatgata agatacattg atgagtttgg 3720  
aaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat 3780  
tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca 3840  
ttttatgttt caggttcagg gggagggtgt ggaggtttt tagtcgacct cgagcagtgt 3900  
ggttttgcaa gaggaagcaa aaagcctctc caccagggcc tggaatgttt ccaccaagt 3960  
cgaaggcagt gtggttttgc aagaggaagc aaaaagcctc tccaccagc cctggaatgt 4020  
ttccacccaa tgcgagcaa ccccgcccag cgtcttgca ttggcgaatt cgaacacgca 4080  
gatgcagtcg gggcggcgcg gtcccaggtc cacttcgcat attaagggtga cgcgtgtggc 4140  
ctcgaacacc gagcgacct gcagccaata tgggatcggc cattgaacaa gatggattgc 4200  
acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 4260  
caatcggetg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt 4320  
ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaaactgca ggacgaggca gcgcggctat 4380  
cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 4440  
gaagggactg gctgctattg ggccaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 4500  
ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 4560  
cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 4620  
tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcccag 4680  
ccgaactgtt cggcaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct 4740  
atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 4800  
actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 4860  
ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg 4920  
ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgaggggatc 4980  
cgtcgactag agctcgctga tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg 5040



ES 2 661 680 T3

tttgcccctc ccccgtagct tccttgacct tggaaaggtgc cactcccact gtcccttcct 5100  
 aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg 5160  
 gggtaggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaaagacaa tagcaggcat gctggggaga 5220  
 gatctaggaa cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgcctcac 5280  
 tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgctg ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag 5340  
 cgagcgagcg cgagagaggg gagtggccaa ccccccccc cccccccctg cagccctgca 5400  
 ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgogt attggggcgt cttccgcttc 5460  
 ctgcctcact gactcgtgct gctcggctgt tcggctgogg cgagcggat cagctcactc 5520  
 aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc 5580  
 aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccggc ttgctggcgt ttttccatag 5640  
 gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaacc 5700  
 gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tcctcgtgc gctctcctgt 5760  
 tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct 5820  
 ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgctcgt ccaagctggg 5880  
 ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgogcc ttatccgta actatcgtct 5940  
 tgagtccaac ccgtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat 6000  
 tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtggggc ctaactacgg 6060  
 ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagta ccttcggaaa 6120  
 aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt 6180  
 ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 6240  
 tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgtaa gggattttgg tcatgagatt 6300  
 atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta 6360  
 aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat 6420  
 ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgctg tntagataac 6480  
 tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca atgataccgc gagaccacg 6540  
 ctaccgggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag 6600  
 tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt 6660  
 aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtgoc attgctacag gcacgtggt 6720  
 gtcacgctcg tcgtttgta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt 6780  
 tacatgatcc cccatggtgt gcaaaaaagc ggttagctcc ttoggtcctc cgatcgttgt 6840  
 cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct 6900  
 tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gactactcaa ccaagtcatt 6960

ES 2 661 680 T3

ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac 7020  
 cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacggttctt cggggcgaaa 7080  
 actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa 7140  
 ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca 7200  
 aatgccgca aaaaaggga taagggcgac acggaatgt tgaatactca tactcttct 7260  
 tttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga 7320  
 atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgaca tttccccgaa aagtgccacc 7380  
 tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag 7440  
 gcccttctgt ctcgcgctt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc 7500  
 ggagacggtc acagcttgtc tgtaagcggg tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc 7560  
 gtcagcgggt gttggcgggt gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt 7620  
 actgagagtg caccatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg 7680  
 catcaggaaa ttgtaaactg taatattttg ttaaaattcg cgtaaattt ttgttaaactc 7740  
 agctcatttt ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaatcc cttataaatc aaaagaatag 7800  
 accgagatag ggttgagtgt tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg 7860  
 gactccaacg tcaaagggcg aaaaaccgtc tatcagggcg atggccact acgtgaacca 7920  
 tcaccctaat caagttttt ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa 7980  
 gggagcccc gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg 8040  
 aagaaagcga aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagtg tagcggtcac gctgcgcgta 8100  
 accaccacac ccgccgcgct taatgcgccg ctacagggcg cgtcgcgcca ttcgccattc 8160  
 aggctacgca actggtggga agggcgatcg gtgcgggcct cttegtatt acgccaggct 8220  
 gca 8223

- 5 <210> 28
- <211> 8360
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> 6XmiR Doble-CB-AAT
  
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (17)..(163)
- <223> Repeticiones terminales invertidas (RTI)
  
- 20 <220>
- <221> potenciador
- <222> (182)..(548)
- <223> Potenciador
  
- <220>

<221> promotor  
 <222> (549)..(1482)  
 <223> Promotor de la beta actina de pollo

5

<220>  
 <221> Intrón  
 <222> (826)..(1482)  
 <223> Intrón

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1503)..(1529)  
 <223> 5' miR

15

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1530)..(1550)  
 <223> De sentido contrario 901

20

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1570)..(1588)  
 <223> Sentido directo, delta 2

25

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1593)..(1633)  
 <223> 3' miR

30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1646)..(1674)  
 <223> 5' miR

35

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1675)..(1695)  
 <223> De sentido contrario 914

40

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1715)..(1733)  
 <223> Sentido directo, delta 2

45

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1738)..(1778)  
 <223> 3' miR

50

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1791)..(1819)  
 <223> 5' miR

55

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1820)..(1840)  
 <223> De sentido contrario 943

60

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1860)..(1878)  
 <223> Sentido directo, delta 2

65

<220>  
 <221> misc\_feature

<222> (1883)..(1923)  
 <223> 3' miR

5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1936)..(2035)  
 <223> Globina

10  
 <220>  
 <221> gen  
 <222> (2058)..(3311)  
 <223> Alfa-1 antitripsina reforzado (AAT)  
 <220>

15  
 <221> misc\_signal  
 <222> (3312)..(3341)  
 <223> Cmyc-tag

20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3374)..(3401)  
 <223> 5' miR

25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3402)..(3422)  
 <223> De sentido contrario 901

30  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3442)..(3460)  
 <223> Sentido directo, delta 2

35  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3465)..(3505)  
 <223> 3' miR

40  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3518)..(3546)  
 <223> 5' miR

45  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3547)..(3567)  
 <223> De sentido contrario 914

50  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3587)..(3605)  
 <223> Sentido directo, delta 2

55  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3610)..(3650)  
 <223> 3' miR

60  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3663)..(3691)  
 <223> 5' miR

65  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3692)..(3712)  
 <223> De sentido contrario 943

ES 2 661 680 T3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3732)..(3750)  
 <223> Sentido directo, delta 2  
 5  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (3755)..(3795)  
 <223> 3' miR  
 10  
 <220>  
 <221> señal poliA  
 <222> (3814)..(4026)  
 <223> cola de poliA  
 15  
 <220>  
 <221> promotor  
 <222> (4167)..(4295)  
 <223> promotor de la timidina quinasa (Tkp)  
 20  
 <220>  
 <221> gen  
 <222> (4307)..(5110)  
 <223> Gen de resistencia a la neomicina  
 25  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (5363)..(5508)  
 <223> Repeticiones terminales invertidas (RTI)  
 30  
 <220>  
 <221> gen  
 <222> (6528)..(7388)  
 <223> Gen de resistencia a la ampicilina (complemento)  
 35  
 <400> 28

```

gggggggggg gggggggggt ggccaactccc tctctgcgcg ctgctcgt cactgaggcc      60
gggcgaccaa aggtcgcccc acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga      120
gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actagggggt cctagatctg aattcggtac      180
cctagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc      240
cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccccacca      300
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt      360
caatgggtgg actatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg      420
ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag      480
  
```

ES 2 661 680 T3

tacatgacct tatgggactt tctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt 540  
accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcactctcc ccatctcccc ccoctcccca 600  
cccccaattt tgtatttatt tttttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcggggggg 660  
gggggggggc gcgcgccagc cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg 720  
agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg 780  
cggcgggcgc ggcggcccta taaaagcga agcgcggcgc ggcggggagt cgctgcgacg 840  
ctgccttcgc cccgtgcccc gctccgcgcg cgctcgcgcg cggccgcccc ggctctgact 900  
gaccgcgta ctcccacagg tgagcgggcg ggacggccct tctcctccgg gctgtaatta 960  
gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc ttgaggggct 1020  
ccgggagggc cctttgtgcg ggggggagcg gctcgggggg tgogtgctg tgtgtgtgcg 1080  
tggggagcgc cgcgtgcggc ccgcgctgcc cggcggctgt gagcgtgcg ggcgcggcgc 1140  
ggggctttgt gcgctccgca gtgtgcgca ggggagcgcg gccggggggc gtgccccgcg 1200  
gtgcgggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg tgggggggtg 1260  
agcagggggt gtgggcgcgg cggtcgggct gtaaccccc cctgcacccc cctccccgag 1320  
ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtac ggggcgtggc gcggggctcg 1380  
ccgtgccggg cgggggggtg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg ccgcctcggg 1440  
ccggggaggg ctcgggggag gggcgcgggc gcccccgag cgcggcgac cggtgctagc 1500  
cctggaggct tgctgaaggc tgtatgctgt aagctggcag accttctgtc gttttggcca 1560  
ctgactgacg acagaagctg ccagcttaca ggacacaagg cctgttacta gcactcacat 1620  
ggaacaaatg gccaccgta tgcatcctgg aggcttgcg aaggctgtat gctgaatgta 1680  
agctggcaga ccttcgtttt ggccactgac tgacgaaggt ctcagcttac attcaggaca 1740  
caaggcctgt tactagcact cacatggaac aaatggccgc tagctcgcga cctggaggct 1800  
tgctgaaggc tgtatgctga taggttcag taatggacag gttttggcca ctgactgacc 1860  
tgtccatctg gaacctatca ggacacaagg cctgttacta gcactcacat ggaacaaatg 1920  
gcctcgcgat gcatctagag cctctgctaa ccatgttcat gccttcttct ttttctaca 1980  
gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat tttggcaaag aattcctcga 2040  
agatctaggc ctgcaggatg ccgtcttctg tctcgtgggg catcctcctg ctggcaggcc 2100  
tgtgctgcct ggtccctgtc tccctggctg aggatcccca gggagatgct gcccagaaga 2160  
cagatacacc ccaccatgat caggatcacc caaccttcaa caagatcacc cccaacctgg 2220  
ctgagttcgc cttcagccta taccgccagc tggcacacca gtccaacagc accaatatct 2280  
tcttctcccc agtgagcatc gctacagcct ttgcaatgct ctccctgggg accaaggctg 2340  
acactcacga tgaaatcctg gagggcctga atttcaacct cacggagatt ccggaggctc 2400

ES 2 661 680 T3

agatccatga aggcttccag gaactcctcc gtaccctcaa ccagccagac agccagctcc 2460  
 agctgaccac cggcaatggc ctgttccctca gcgagggcct gaagctagtg gataagtttt 2520  
 tggaggatgt taaaaagtgt taccactcag aagccttcac tgtcaacttc ggggacaccg 2580  
 aagaggccaa gaaacagatc aacgattacg tggagaaggg tactcaaggg aaaattgtgg 2640  
 atttggtoaa ggagcttgac agagacacag tttttgctct ggtgaattac atcttcttta 2700  
 aaggcaaatg ggagagaccc tttgaagtca aggacaccga ggaagaggac ttccacgtgg 2760  
 accaggtgac caccgtgaag gtgcctatga tgaagcgttt aggcatgttt aacatccagc 2820  
 actgtaagaa gctgtccagc tgggtgctgc tgatgaaata cctgggcaat gccaccgcca 2880  
 tcttcttctc gctgatgag gggaaactac agcacctgga aatgaactc acccacgata 2940  
 tcatcaccaa gttcctggaa aatgaagatc gccgtagcgc ttctctgcac ctgcccaagt 3000  
 taagcatcac cggcacgtac gacctgaaga gcgtcctggg tcaactgggc atcactaagg 3060  
 tcttcagcaa tggggctgac ctctccgggg tcacagagga ggcaccctg aagctctcca 3120  
 aggcogtgca taaggctgtg ctgaccatcg acgagaaagg gactgaagct gctggggcca 3180  
 tgtttttaga ggccatacc atgtctatcc cccccgaggt caagttcaac aaacccttg 3240  
 tcttcttaat gattgaacaa aataccaagt ctcccctctt catgggaaa gtggtgaatc 3300  
 ccacccaaaa agagcagaag ctgatcagcg aggaggacct gtagcctgca ggcgccggcg 3360  
 accggtgcta gccctggagg cttgctgaag gctgtatgct gtaagctggc agaccttctg 3420  
 tegttttggc cactgactga cgacagaagc tgccagctta caggacacaa ggctgtttac 3480  
 tagcactcac atggaacaaa tggccaccgg tatgcatcct ggaggcttgc tgaaggctgt 3540  
 atgotgaatg taagctggca gaccttcgtt ttggccactg actgacgaag gtctcagctt 3600  
 acattcagga cacaaggcct gttactagca ctcacatgga acaaatggcc gctagctcgc 3660  
 gacctggagg cttgctgaag gctgtatgct gataggttcc agtaatggac aggttttggc 3720  
 cactgactga cctgtccatc tggaacctat caggacacaa ggctgtttac tagcactcac 3780  
 atggaacaaa tggcctcgcg atgcatctag agcggccgcg gggatccaga catgataaga 3840  
 tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt 3900  
 gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta accattataa gctgcaataa acaagttaac 3960  
 aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg aggtgtggga ggttttttag 4020  
 togaoctoga gcagtgtggg tttgcaagag gaagcaaaaa gcctctccac ccaggcctgg 4080  
 aatgtttcca cccaagtcca aggcagtgtg gttttgcaag aggaagcaaa aagcctctcc 4140  
 acccaggcct ggaatgtttc caccoaatgt cgagcaaccc cgcccagcgt cttgtcattg 4200  
 gcgaattcga acacgcagat gcagtcgggg cggcgcggtc ccaggtccac ttgcgatatt 4260

ES 2 661 680 T3

aaggtgacgc gtgtggcctc gaacaccgag cgaccctgca gccaatatgg gatcggccat 4320  
tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagagggc tattcggcta 4380  
tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttcgggc tgtcagcgca 4440  
ggggcgcccg gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga 4500  
cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcggt ccttgccgag ctgtgctcga 4560  
cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct 4620  
cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg 4680  
gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcaccac caagcgaaac atcgcatcga 4740  
gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca 4800  
tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga 4860  
ggatctcgtc gtgaccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccc 4920  
cttttctgga ttcactgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc 4980  
gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt 5040  
gctttacggg atcgccgctc ccgattcgca gcgcacgcc ttctatgcc ttcttgacga 5100  
gttcttctga ggggatccgt cgactagagc tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag 5160  
ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac 5220  
tcccactgtc ctttctaata aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 5280  
ttctattctg ggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag 5340  
caggcatgct ggggagagat ctaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg 5400  
cgcgctcgtc cgctcactga ggccgcccgg gcaaagcccg ggcgtcgggc gacctttggt 5460  
cgcccgccct cagtgagcga gcgagcgcgc agagagggag tggccaaccc ccccccccc 5520  
ccccctgcag ccctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagagggcg tttgcgtatt 5580  
gggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga 5640  
gcggtatcag ctcaactcaaa ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 5700  
ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 5760  
ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 5820  
cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagetcc 5880  
ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 5940  
tcgggaagcg tggcgctttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 6000  
gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta 6060  
tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 6120  
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 6180



ES 2 661 680 T3

tggtagccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 6240  
 ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaacaaac caccgctggt 6300  
 agcggtaggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 6360  
 gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaaactc acgttaaggg 6420  
 attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga 6480  
 agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta 6540  
 atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgctgactc 6600  
 cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg 6660  
 ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga 6720  
 agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccatccagtc tattaattgt 6780  
 tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gtaaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt 6840  
 gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc 6900  
 caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcggc tagctccttc 6960  
 ggtcctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat ggttatggca 7020  
 gcaactgata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactggtgag 7080  
 tactcaacca agtcattctg agaatagttg atgcggcgac cgagttgctc ttgccccgag 7140  
 tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa 7200  
 cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa 7260  
 cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga 7320  
 gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggataaa gggcgacacg gaaatgttga 7380  
 atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg 7440  
 agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt 7500  
 ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa 7560  
 aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc 7620  
 tgacacatgc agctccccga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga 7680  
 caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtggt ggcgggtgtc ggggctggct taactatgag 7740  
 gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc 7800  
 gtaaggagaa aataccgcat caggaaattg taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt 7860  
 taaatttttg ttaaatcagc tcatttttta accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt 7920  
 ataaatcaaa agaatagacc gagataggtg tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc 7980  
 cactattaa gaacgtggac tccaacgtca aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg 8040

ES 2 661 680 T3

gcccactacg tgaaccatca ccctaataca gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac 8100  
 taaatcggaa ccctaaaggg agcccccgat ttagagcttg acggggaaag ccggcgaacg 8160  
 tggcgagaaa ggaagggaag aaagcgaag gagcgggcgc tagggcgctg gcaagtgtag 8220  
 cggtcacgct gcgcgtaacc accacacccg ccgcgcttaa tgcgccgcta cagggcgctg 8280  
 cgcgccattc gccattcagg ctacgcaact gttgggaagg gcgatcggtg cgggcctctt 8340  
 cgctattacg ccaggctgca 8360

5 <210> 29  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador directo para PIM y PIZ

15 <400> 29  
 ccaaggccgt gcataagg 18

20 <210> 30  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Cebador inverso para PIM y PIZ

30 <400> 30  
 ggccccagca gcttcagt 18

35 <210> 31  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Sonda de PIZ (AAT mutante)

45 <220>  
 <221> misc\_signal  
 <222> (1)..(1)  
 <223> molécula sonda 6FAM

50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> n es a, c, g, o t

55 <220>  
 <221> misc\_signal  
 <222> (18)..(18)  
 <223> molécula sonda MGBNFQ

60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (18)..(18)  
 <223> n es a, c, g, o t

65 <400> 31  
 nctgaccatc gacaagan 18

# ES 2 661 680 T3

<210> 32  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Sonda de PIM (AAT natural)

10

<220>  
<221> misc\_signal  
<222> (1)..(1)  
<223> molécula sonda 6FAM

15

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> n es a, c, g, o t

20

<220>  
<221> misc\_signal  
<222> (18)..(18)  
<223> molécula sonda MGBNFQ

25

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (18)..(18)  
<223> n es a, c, g, o t

30

<400> 32  
nctgaccatc gacgagan 18

## REIVINDICACIONES

1. Un VAAr que contiene un ácido nucleico que comprende:

- 5 una primera región que codifica uno o más primeros miARN que se pueden hibridar, e inhibir su expresión, con un ARNm endógeno de un sujeto que codifica una proteína Z-AAT; y,  
una segunda región que codifica un ARNm exógeno que codifica una proteína M-AAT que tiene una o más mutaciones silenciosas en comparación con el ARNm endógeno,  
10 en donde el uno o más primeros miARN no comprenden un ácido nucleico que tiene suficientes secuencias complementarias para hibridarse con, e inhibir, la expresión del ARNm exógeno, y en donde la primera región está situada entre el último codón del ARN exógeno y una parte de la segunda región que codifica la secuencia de poliadenilación del ARNm exógeno.
2. El VAAr de la reivindicación 1, en que la primera región está comprendida entre el último codón del ARNm exógeno y una posición a 1000 nucleótidos en la dirección 3' del último codón.
3. El VAAr de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además una tercera región que codifica uno o más miARN secundarios que se pueden hibridar con, y que inhiben, la expresión del ARNm endógeno, en donde la tercera región está situada en una parte no traducida de la segunda región.
- 20 4. El VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera región codifica tres primeros miARN.
5. El VAAr de las reivindicaciones 3 o 4, en el que la tercera región codifica tres segundos miARN.
- 25 6. El VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una proteína codificada por el ARNm exógeno tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 % idéntica a una proteína codificada por el ARNm endógeno.
7. El VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el Z-AAT es una proteína AAT humana.
- 30 8. El VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el Z-AAT tiene una secuencia como se define en la SEQ ID NO: 1 o en el que el Z-AAT tiene una o más mutaciones de la misma como se identifica en la Tabla 1.
9. El VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer ARNm comprende un ácido nucleico codificado por una secuencia como se define en las SEQ ID NOS: 5-16.
- 35 10. El VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el uno o más miARN tienen una secuencia de ácido nucleico codificada por una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 17-19 y 21-23.
- 40 11. El VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ARNm exógeno tiene una secuencia de ácido nucleico codificada por una secuencia como se define en la SEQ ID NO: 20.
12. El VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además repeticiones terminales invertidas (RTI) de un serotipo de VAA seleccionado entre el grupo que consiste en: VAA1, VAA2, VAA5, VAA6, VAA6.2, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11 y variantes de los mismos.
- 45 13. El VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además una o más proteínas de la cápsida de uno o más serotipos de VAA seleccionados entre el grupo que consiste en: VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11 y variantes de los mismos.
- 50 14. Una composición que comprende el VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
15. Un kit que comprende un recipiente que aloja la composición de la reivindicación 14.
- 55 16. El VAAr de cualquiera de las reivindicaciones anteriores o la composición de la reivindicación 14 que comprende el VAA recombinante, en donde el VAAr está formulado para su administración en una cantidad eficaz a un sujeto.
17. El VAA recombinante o la composición de la reivindicación 16, en donde la administración del VAAr se realiza por vía intravenosa, intratecal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o mediante inyección en la vena porta hepática del sujeto.
- 60 18. El VAA recombinante o la composición de las reivindicaciones 16 o 17, en donde tras 7 semanas de administración del VAAr, el nivel en suero de la Z-AAT está a un nivel de al menos un 50 % o al menos un 75 % en comparación con el nivel en suero de la Z-AAT antes de la administración del VAAr.
- 65

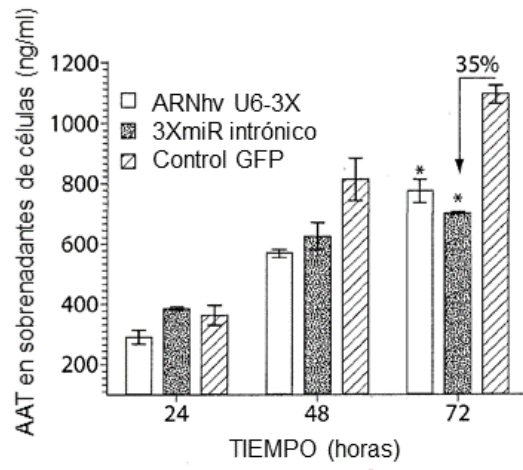


Fig. 1A

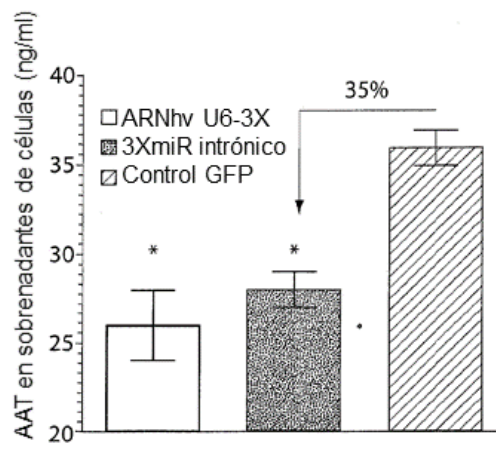


Fig. 1B

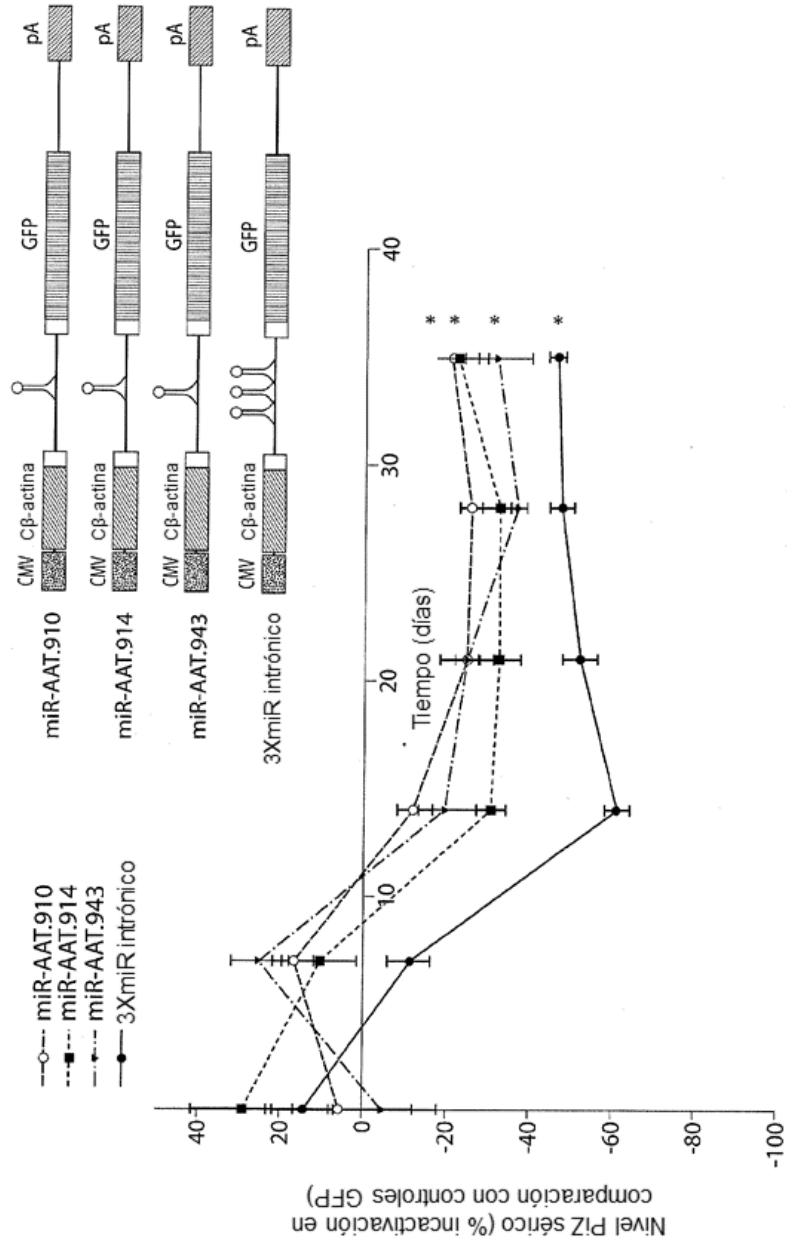


Fig. 2

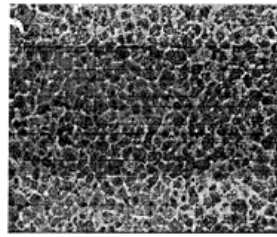


Fig. 3A

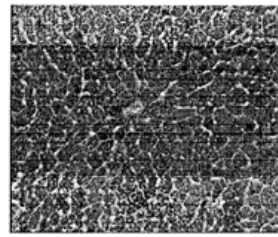


Fig. 3B

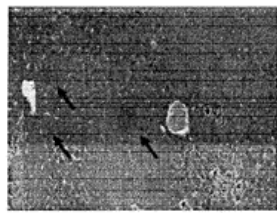


Fig. 3C

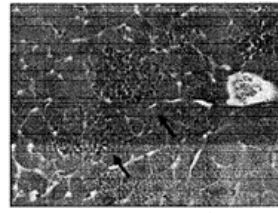


Fig. 3D

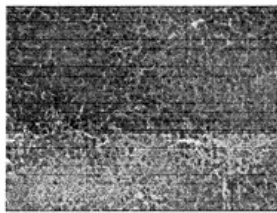


Fig. 3E

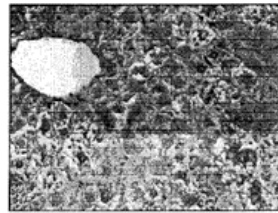


Fig. 3F

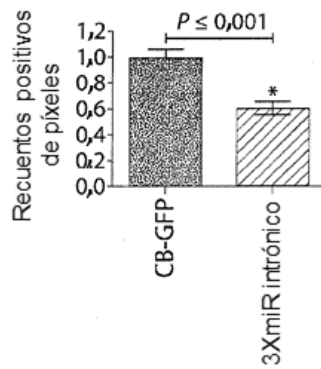


Fig. 3G

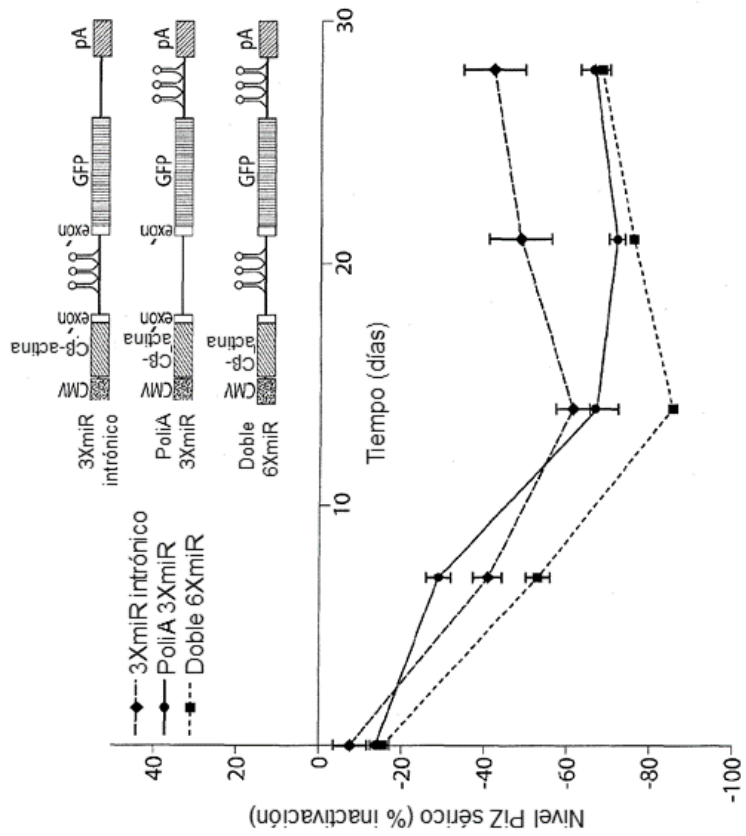


Fig. 4



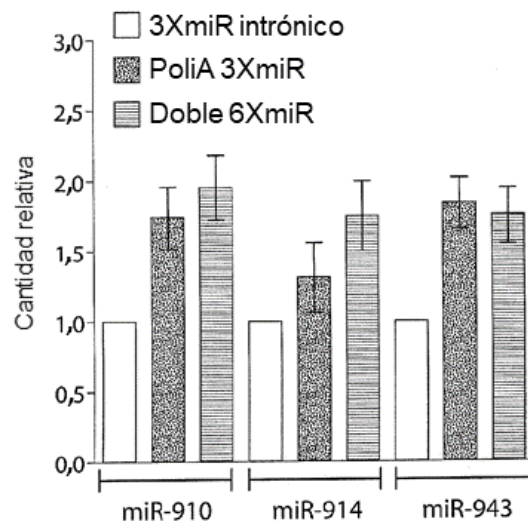


Fig. 5

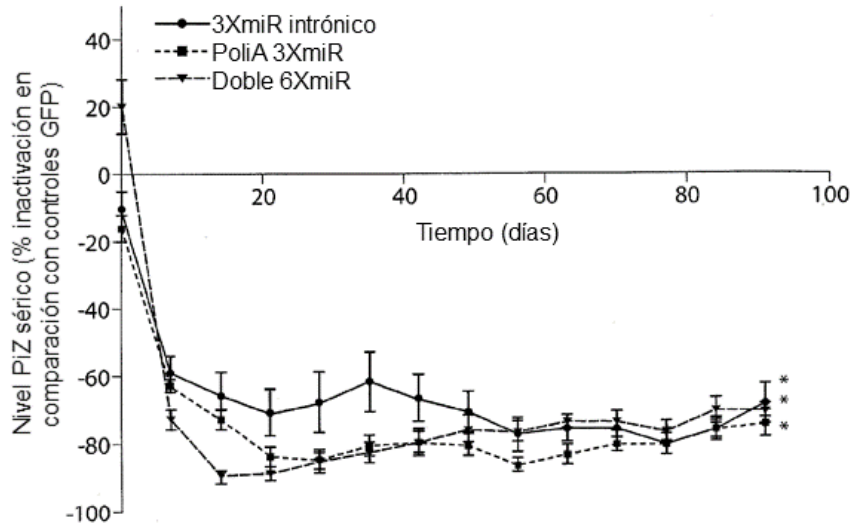


Fig. 6A

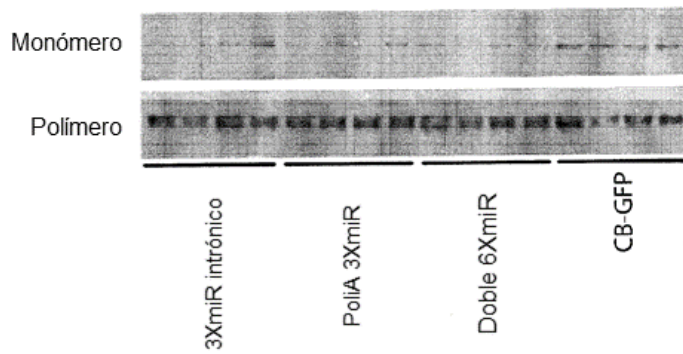


Fig. 6B

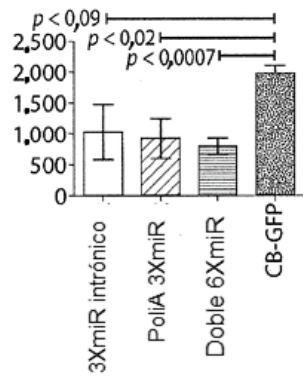


Fig. 6C

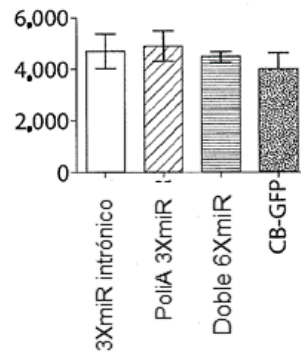
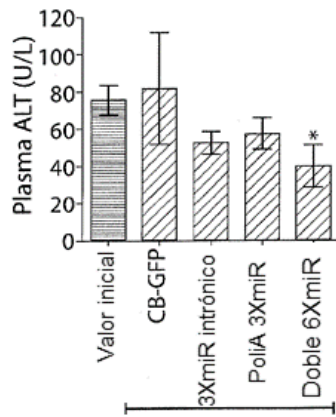
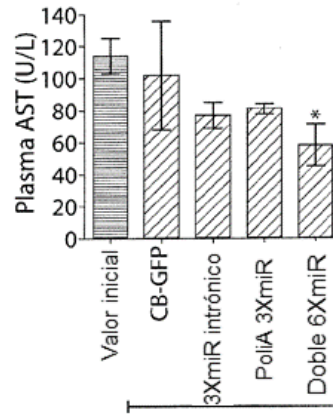


Fig. 6D



2 semanas después de la administración de VAAr9

Fig. 6E



2 semanas después de la administración de VAAr9

Fig. 6F

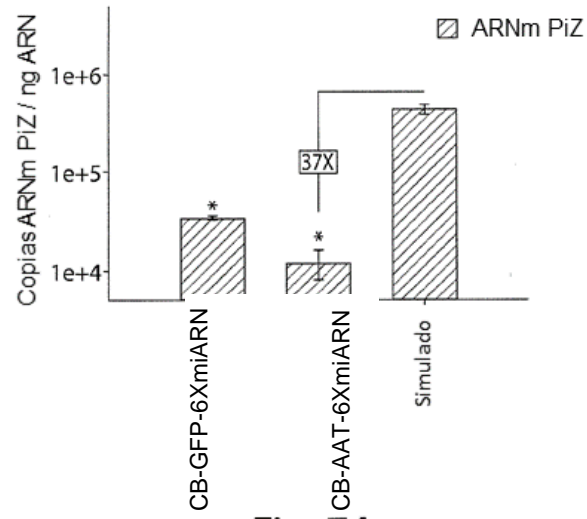


Fig. 7A

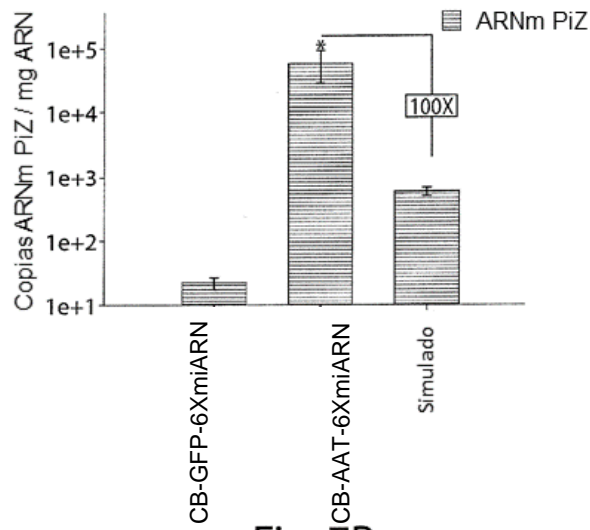


Fig. 7B

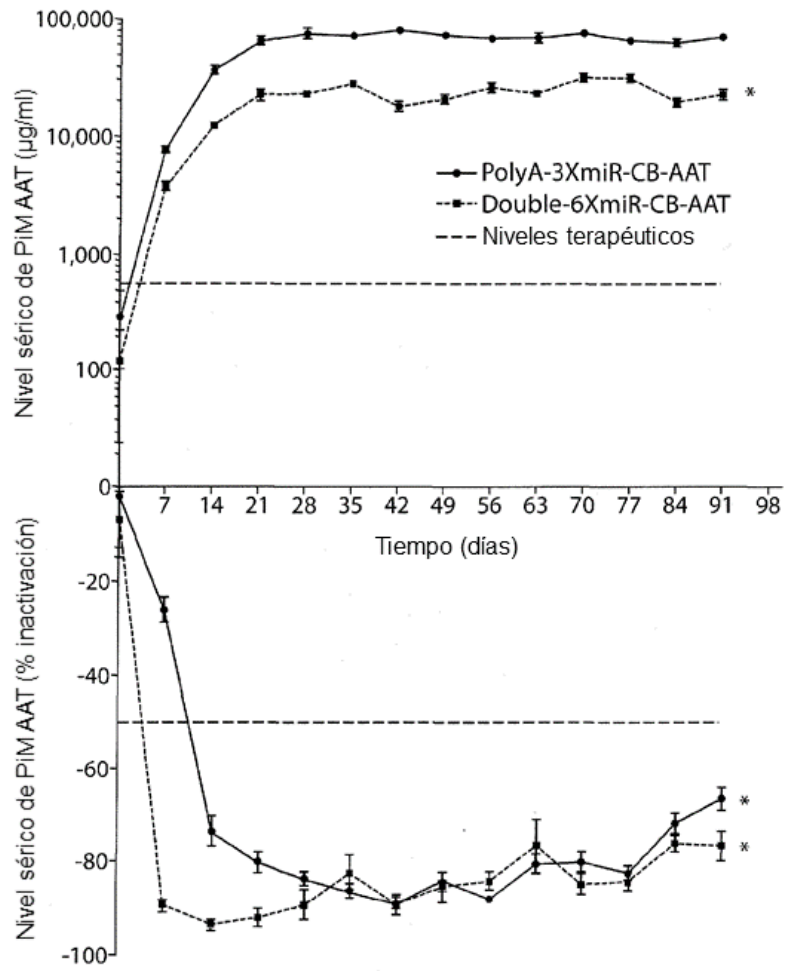


Fig. 8A

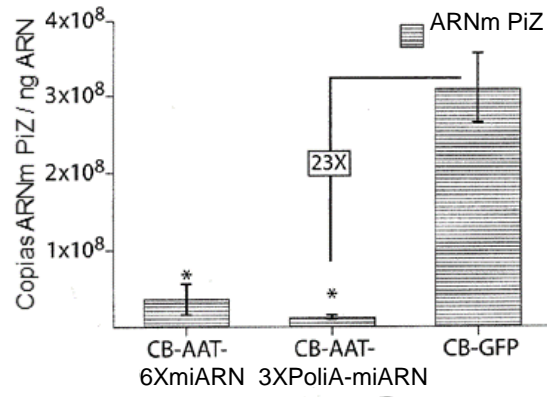


Fig. 8B

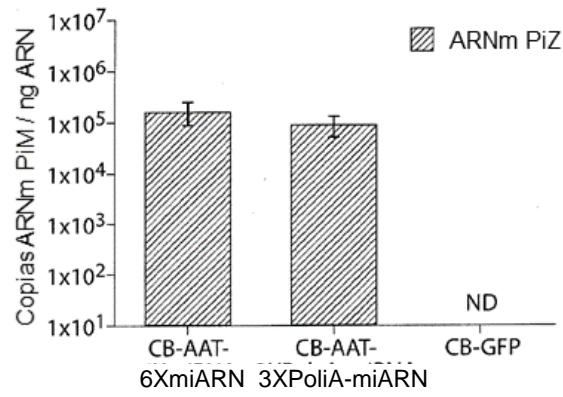


Fig. 8C

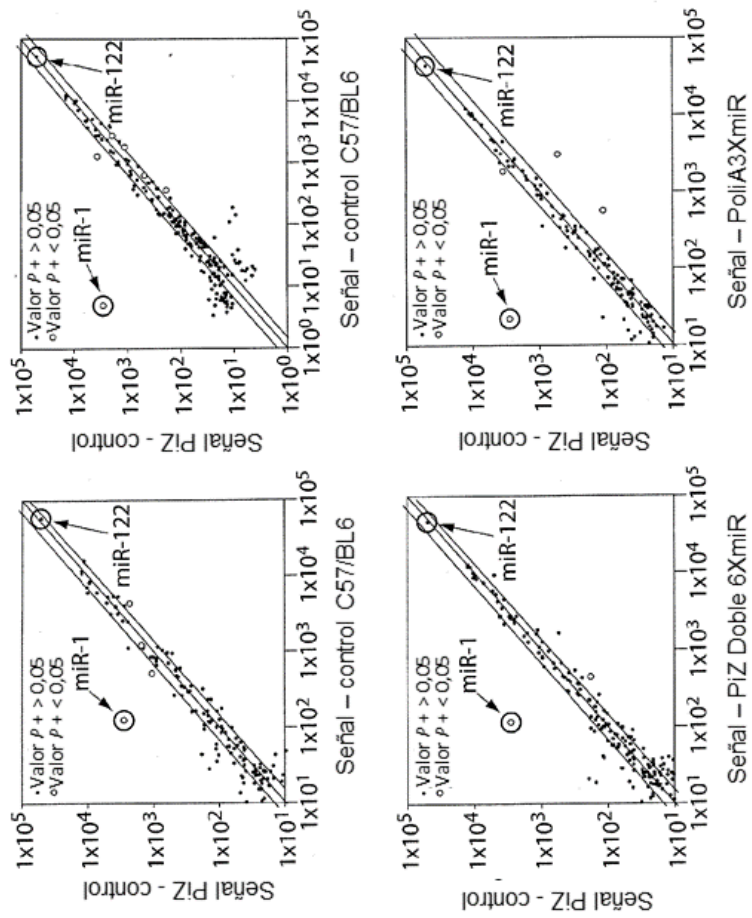


Fig. 9