

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 967**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

C07K 14/775 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2010** **PCT/IB2010/056024**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012** **WO12085622**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2010** **E 10821435 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017** **EP 2654800**

54 Título: **Estrategias terapéuticas para tratar patologías del SNC en mucopolisacaridosis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2018

73 Titular/es:
FONDAZIONE TELETHON (100.0%)
Via Varese 16B
00185 Roma, IT

72 Inventor/es:
BALLABIO, ANDREA y
FRALDI, ALESSANDRO

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 661 967 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

Estrategias terapéuticas para tratar patologías del SNC en mucopolisacaridosis

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un enfoque terapéutico, o bien terapia génica mediada por vector vírico o mediante la administración de sulfatasas modificadas, en particular la enzima sulfamidasa, para cruzar la barrera hematoencefálica y tratar la patología del SNC en mucopolisacaridosis (MPS), en particular MPS de tipo IIIA.

Antecedentes de la invención

10 La mucopolisacaridosis de tipo IIIA (MPS-IIIA) es una enfermedad hereditaria causada por la deficiencia de sulfamidasa (*SGSH*), una enzima implicada en la degradación por etapas de macromoléculas grandes llamadas sulfatos de heparano. Como consecuencia, se acumulan sustratos no degradados en las células y tejidos de los pacientes afectados, causando daño celular. El sistema nervioso central (SNC) es la diana predominante del daño y, de hecho, los pacientes de MPS-IIIA muestran un retardo mental grave y debilitación neuropatológica que conduce en última instancia a la muerte (a menudo <20 años). Los síntomas clínicos incluyen hiperactividad, comportamiento agresivo y alteración del sueño (1).

15 Se ha identificado un modelo de ratón de origen natural de MPS-IIIA con patofisiología y síntomas que se parecen a la afección humana (2-4). Estos ratones representan un modelo ideal para estudiar la fisiopatología de este trastorno y para ensayar nuevos protocolos terapéuticos.

20 El tratamiento de lesiones cerebrales representa el objetivo principal de cualquier enfoque terapéutico para MPS-IIIA. Una vía para alcanzar el cerebro consiste en la inyección directa de una molécula terapéutica directamente en el cerebro. Se han ensayado una serie de diferentes protocolos de terapia de reemplazo enzimático (ERT). En estos protocolos, se administraba una enzima sulfamidasa recombinante mediante inyección directa en el cerebro de ratones con MPS-IIIA. Estas estrategias son capaces de retardar la aparición de cambios neurodegenerativos cuando se administra sulfamidasa en ratones jóvenes (5, 6). Además, se desarrolló exitosamente un protocolo de terapia génica basado en la inyección intracerebral del gen *SGSH* a través de vectores de AAV por los autores de la invención (7). Aunque se ha mostrado que estos enfoques directos orientados al cerebro son clínicamente eficaces, representan enfoques altamente invasivos para la aplicabilidad terapéutica humana.

30 Puesto que cada neurona en el cerebro está perfundida por su propio vaso sanguíneo, es una vía poco invasiva alternativa para alcanzar el cerebro la administración intravenosa de la molécula terapéutica (8). Sin embargo, esta muy densa red de microvasos que forma la barrera hematoencefálica (BHE) no es permeable a todas las moléculas y podría impedir un suministro eficaz de agentes terapéuticos (9). Es más, la administración intravenosa de enzima lisosómicas ha producido un efecto terapéutico sobre la patología somática de muchas LSD, pero tiene poco o ningún efecto sobre la patología del SNC debido a la impermeabilidad de la BHE a las moléculas grandes (10). En MPS-IIIA, se ha demostrado que la inyección intravenosa de sulfamidasa no altera la patología ni procesos conductuales que aparecen en el cerebro de ratón con MPS-IIIA cuando se suministra la enzima después de formarse la BHE (11).

35 De forma importante, un reciente estudio de Urayama *et al.* demostró que la sulfamidasa se transporta a través de la BHE en ratones neonatos mediante transporte mediado por el receptor de 6-fosfato de manosa, pero el flujo de entrada al cerebro adulto era despreciable (12).

40 Resulta evidente que, en tal contexto, el reto real para la terapia de MPS-IIIA y en general para todas las LSD que afectan al SNC es desarrollar estrategias de tratamiento sistémico del SNC que puedan superar el obstáculo principal representado por la BHE. Es una estrategia eficaz para cruzar la BHE la orientación de proteínas al SNC mediante transcitosos mediada por receptor (13). Los receptores de la BHE bien caracterizados incluyen: receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), receptor de transferrina (TfR) y receptor de factor de crecimiento similar a insulina (IGFR). La familia de LDLR representa un grupo de receptores de superficie celular que se unen a complejos de apolipoproteína (Apo) (portadores lipídicos) para internalización en los lisosomas (14-16). Sobre la superficie de la BHE, la unión de LDLR a Apo da como resultado la transcitosos al lado luminal de la BHE, donde se libera la apolipoproteína para captarse por neuronas y astrocitos. Un estudio reciente ha demostrado que fusionar el dominio de unión a LDLR de Apo con una enzima lisosómica da como resultado un suministro eficaz de la enzima quimérica al SNC (17).

50 El documento WO2004108071 hace referencia a un polipéptido quimérico orientado al SNC que comprende un dominio de unión a receptor de BHE, tal como el dominio de unión a apolipoproteína B, para uso terapéutico en enfermedades de almacenamiento lisosómico.

55 El documento WO2004064750 hace referencia a ácidos nucleicos que codifican un polipéptido lisosómico quimérico (específicamente la glucosidasa ácida lisosómica GAA implicada en el trastorno de almacenamiento lisosómico enfermedad de almacenamiento de glicógeno de tipo II) que comprende una secuencia señal secretora (concretamente, Vi-antitripsina y alfa-1-antitripsina) y a los vectores de AAV relacionados.

El documento W020050025 hace referencia a un compuesto que comprende un resto de unión a megalina conjugado con un agente de interés para suministro de fármaco mediado por receptor, particularmente por transcitosis, a través de la barrera hematoencefálica. Además, el documento hace referencia a un método de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico basado en la administración de una composición que comprende un resto de unión a megalina. La apolipoproteína A y la mucopolisacaridosis IIIA se mencionan.

El documento W02009131698 hace referencia a una terapia basada en una enzima NaGlu quimérica caracterizada por un dominio de unión de apolipoproteína B y dirigida específicamente a mucopolisacaridosis IIIB.

Cardone *et al.* (Hum Mol Gen, 2006 15(7): 1225) describe la corrección del síndrome de Hunter (la enfermedad de almacenamiento lisosómico mucopolisacaridosis de tipo II) en el modelo de ratón de MPSII mediante suministro génico mediado por AAV2/8-TBG dirigido al hígado.

El documento WO2007092563 hace referencia a un método y a composiciones para tolerizar el cerebro de un mamífero ante el polipéptido esfingomielinasa ácida administrado exógenamente mediante el suministro primero de una cantidad eficaz de un transgén que codifica el polipéptido al tejido hepático de mamífero y la administración entonces de una cantidad eficaz del transgén al sistema nervioso central (SNC) del mamífero. El enfoque terapéutico está dirigido a la enfermedad de Niemann-Pick, una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Se mencionan promotores específicos de hígado y AAV de tipo 8.

El documento W02009075815 hace referencia a métodos de tratamiento de la enfermedad de Pompe (una enfermedad de almacenamiento lisosómico) que implica la administración de un vector de AAV en el contexto de la terapia de reemplazo enzimático. Se mencionan un promotor específico de hígado (promotor de globulina de unión a hormona tiroidea) y AAV de tipo 8.

Ninguno de los documentos citados en la técnica anterior divulga o siquiera sugiere la enzima sulfamidasa modificada de la presente invención, ni que pueda tener un efecto terapéutico para el tratamiento de MPS de tipo IIIA.

Descripción de la invención

Como se divulga en la técnica antecedente, la patología cerebral es el rasgo más común de los trastornos de almacenamiento lisosómico. Por lo tanto, el tratamiento de lesiones cerebrales representa el objetivo principal de cualquier terapia eficaz para estos trastornos.

El obstáculo principal para tratar eficazmente el cerebro mediante el suministro sistémico de un agente terapéutico es la barrera hematoencefálica (BHE).

Los autores desarrollaron un enfoque terapéutico no invasivo para tratar la patología cerebral en mucopolisacaridosis de tipo IIIA (MPS-IIIA), una enfermedad de almacenamiento lisosómico con una grave afectación del sistema nervioso central. Esta estrategia está basada en la construcción de una sulfamidasa quimérica (la enzima sulfatasa que es deficiente en MPS-IIIA), optimizada con dos secuencias aminoacídicas (una en el extremo N y otra en el extremo C de la proteína) que confieren a la sulfamidasa modificada la capacidad de secretarse en gran medida y orientarse eficazmente al cerebro cruzando la barrera hematoencefálica (BHE). La enzima modificada se expresa por el serotipo 8 de virus adenoasociado (AAV), que se orienta específicamente al hígado y lo vuelve un órgano fabricante de la enzima terapéutica.

La sulfamidasa modificada puede usarse eficazmente tanto para terapia génica como para terapia de reemplazo enzimático (ERT).

El enfoque de modificación puede usarse para otras enzimas lisosómicas que son deficientes en otras mucopolisacaridosis con afectación grave del SNC.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención una secuencia nucleotídica que codifica una sulfatasa quimérica, consistiendo esencialmente dicha sulfatasa quimérica en el orden de secuencia N-terminal-C-terminal: a) un péptido señal de la secuencia aminoacídica de α -antitripsina humana (hAAT) o la secuencia aminoacídica de iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana, perteneciendo dicha secuencia al siguiente grupo

MPSSVSWGILLAGLCCCLVPVSLA (SEQ ID No. 2) o MPPPRGTGRGLLWLGLVLSSVCVALG (SEQ ID No. 4 o 6); b) una secuencia aminoacídica de sulfatasa humana desprovista de su péptido señal; c) el dominio de unión a LDLR de ApoB.

En una realización preferida, la sulfatasa humana es sulfamidasa humana, más preferiblemente la secuencia aminoácida derivada de sulfamidasa humana tiene la secuencia:

MSCPVPACCALLLVGLCRARPRNALLLLADDGGFESGAYNNSAIATPHLDALA
RRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHQNGLHGDVHHFNSFDKVRSLP
LLLSQAGVVRTGIIKKHVGPETVYPDFAYTEENGSVLQVGRNITRIKLLVRKFL
QTQDDRPFPLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCFKNGESGMGRIPDWTPQAYD
PLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRMDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVI
FTSDNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLLVSPEHPKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILD
WFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGRSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSV
QHRHFRLVHNLNFKMPFIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYY
RARWELYDRSRDPHETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAP

DGVLEEKLSPOCQPLHNEL (SEQ ID No. 8). Tal secuencia se codifica por la secuencia nucleotídica de SEQ ID No. 7: 5'-

ATGAGCTGCCCCGTGCCCGCCTGCTGCGCGCTGCTGCTAGTCCTGGGGCT
CTGCCGGGCGCGTCCCCGGAACGCACTGCTGCTCCTCGCGGATGACGGAG
GCTTTGAGAGTGGCGCGTACAACAACAGCGCCATCGCCACCCCGCACCTG
GACGCCTTGGCCCCGCCGCAGCCTCCTCTTTCGCAATGCCTTCACCTCGGT
CAGCAGCTGCTCTCCCAGCCGCGCCAGCCTCCTCACTGGCCTGCCCCAGC
ATCAGAATGGGATGTACGGGCTGCACCAGGACGTGCACCACTTCAACTCC
TTCGACAAGGTGCGGAGCCTGCCGCTGCTGCTCAGCCAAGCTGGTGTGCG
CACAGGCATCATCGGGAAGAAGCACGTGGGGCCGGAGACCGTGTACCCGT
TTGACTTTGCGTACACGGAGGAGAATGGCTCCGTCCTCCAGGTGGGGCGG
AACATCACTAGAAATTAAGCTGCTCGTCCGGAATTCCTGCAGACTCAGGA
TGACCGGCCTTTCTTCTCTACGTCGCCTTCCACGACCCCCACCGCTGTG
GGCACTCCCAGCCCCAGTACGGAACCTTCTGTGAGAAGTTTGGCAACGGA
GAGAGCGGCATGGGTGCTATCCCAGACTGGACCCCCAGGCCTACGACCC
ACTGGACGTGCTGGTGCTTACTTCGTCCCCAACACCCCGGCAGCCCGAG
CCGACCTGGCCGCTCAGTACACCACCGTCGGCCGCATGGACCAAGGAGTT
GGACTGGTGCTCCAGGAGCTGCGTGACGCCGGTGTCTGAACGACACACT
GGTGATCTTACGTCCGACAACGGGATCCCTTCCCCAGCGGCAGGACCA
ACCTGTACTGGCCGGGCACTGCTGAACCCTTACTGGTGTGTCATCCCCGGAG
CACCCAAAACGCTGGGGCCAAGTCAGCGAGGCCTACGTGAGCCTCCTAGA
CCTCACGCCACCATCTTGGATTGGTTCTCGATCCCGTACCCAGCTACG
CCATCTTTGGCTCGAAGACCATCCACCTCACTGGCCGGTCCCTCCTGCCG

GCGCTGGAGGCCGAGCCCCCTCTGGGCCACCGTCTTTGGCAGCCAGAGCCA
CCACGAGGTCACCATGTCCTACCCCATGCGCTCCGTGCAGCACCGGCACT
TCCGCCTCGTGCACAACCTCAACTTCAAGATGCCCTTTCCCATCGACCAG
GACTTCTACGTCTCACCCACCTTCCAGGACCTCCTGAACCGCACCCACAGC
TGGTCAGCCACGCGGCTGGTACAAGGACCTCCGTCACTACTACTACCGGG
CGCGCTGGGAGCTCTACGACCGGAGCCGGGACCCCCACGAGACCCAGAAC
CTGGCCACCGACCCGCGCTTTGCTCAGCTTCTGGAGATGCTTCGGGACCA
GCTGGCCAAGTGGCAGTGGGAGACCCACGACCCCTGGGTGTGCGCCCCCG
ACGGCGTCCTGGAGGAGAAGCTCTCTCCCCAGTGCCAGCCCCTCCACAAT
GAGCTGTGA-3'.

En una realización preferida, el dominio de unión a LDLR de ApoB codificado tiene la secuencia: **SVIDALQYKLEGTTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGS** (SEQ ID No. 10).

En una realización preferida, la secuencia nucleotídica tiene la secuencia perteneciente al siguiente grupo:

- 5 SECUENCIAS CON FLAG (el experto sustituirá fácilmente la secuencia FLAG por cualquier otra secuencia espaciadora adecuada):

a) Ensamblaje del módulo hAATsp-SGSH-3xflag (1611) (SEQ ID No. 11).

5'-ATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTG
CCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTCGTCCCCGGAACGCACTGCTGCTCCTCG
CGGATGACGGAGGCTTTGAGAGTGGCGCGTACAACAACAGCGCCATCGCC
ACCCCGCACCTGGACGCCTTGGCCCCGCCGAGCCTCCTCTTTTCGCAATGC
CTTCACCTCGGTCAGCAGCTGCTCTCCAGCCGCGCCAGCCTCCTCACTG
GCCTGCCCCAGCATCAGAATGGGATGTACGGGCTGCACCAGGACGTGCAC
CACTTCAACTCCTTCGACAAGGTGCGGAGCCTGCCGCTGCTGCTCAGCCA
AGCTGGTGTGCGCACAGGCATCATCGGGAAGAAGCACGTGGGGCCGGAGA
CCGTGTACCCGTTTGACTTTGCGTACACGGAGGAGAATGGCTCCGTCCTC
CAGGTGGGGCGGAACATCACTAGAAATTAAGCTGCTCGTCCGGAATTCCT
GCAGACTCAGGATGACCGGCCTTTCTTCCTCTACGTCGCCTTCCACGACC
CCCACCGCTGTGGGCACTCCCAACCCAGTACGGAACCTTCTGTGAGAAG
TTTGGCAACGGAGAGAGCGGCATGGGTGCTATCCAGACTGGACCCCCCA
GGCCTACGACCCACTGGACGTGCTGGTGCCTTACTTCGTCCCCAACACCC

CGGCAGCCCGAGCCGACCTGGCCGCTCAGTACACCACCGTCGGCCGCATG
 GACCAAGGAGTTGGACTGGTGCTCCAGGAGCTGCGTGACGCCGGTGTCTT
 GAACGACACACTGGTGATCTTCACGTCCGACAACGGGATCCCCTTCCCCA
 GCGGCAGGACCAACCTGTACTGGCCGGGCACTGCTGAACCCTTACTGGTG
 TCATCCCCGGAGCACCCAAAACGCTGGGGCCAAGTCAGCGAGGCCTACGT
 GAGCCTCCTAGACCTCACGCCCACCATCTTGGATTGGTTCTCGATCCCGT
 ACCCCAGCTACGCCATCTTTGGCTCGAAGACCATCCACCTCACTGGCCGG
 TCCCTCCTGCCGGCGCTGGAGGCCGAGCCCCTCTGGGCCACCGTCTTTGG
 CAGCCAGAGCCACCACGAGGTCACCATGTCCTACCCCATGCGCTCCGTGC
 AGCACCGGCACTTCCGCCTCGTGACACAACCTCAACTTCAAGATGCCCTTT
 CCCATCGACCAGGACTTCTACGTCTCACCCACCTTCCAGGACCTCCTGAA
 CCGCACACAGCTGGTCAGCCACGGGCTGGTACAAGGACCTCCGTCAAT
 ACTACTACCGGGCGCGCTGGGAGCTCTACGACCGGAGCCGGGACCCCCAC
 GAGACCCAGAACCTGGCCACCGACCCGCGCTTTGCTCAGCTTCTGGAGAT
 GCTTCGGGACCAGCTGGCCAAGTGGCAGTGGGAGACCCACGACCCCTGGG
 TGTGCGCCCCCGACGGCGTCTTGGAGGAGAAGCTCTCTCCCCAGTGCCAG
 CCCCTCCACAATGAGCTGTCATCTAGAGGATCCCGGGCTGACTACAAAGA
 CCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATG
 ACAAGTAGTGA-3'

b) Ensamblaje del módulo hIDSsp-SGSH-3xflag (1614 pb) (SEQ ID No. 13).

5'-ATGCCCCCGCCCCGCACCGGCCGCGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTGCT
 GAGCAGCGTGTGCGTGGCCCTGGGCCGTCCCCGGAACGCACTGCTGCTCC
 TCGCGGATGACGGAGGCTTTGAGAGTGGCGCGTACAACAACAGCGCCATC
 GCCACCCCGCACCTGGACGCCTTGGCCCGCCGCAGCCTCCTCTTTCGCAA
 TGCTTTCACCTCGGTCAGCAGCTGCTCTCCAGCCGCGCCAGCCTCCTCA
 CTGGCCTGCCCCAGCATCAGAATGGGATGTACGGGCTGCACCAGGACGTG
 CACCACTTCAACTCCTTCGACAAGGTGCGGAGCCTGCCGCTGCTGCTCAG
 CCAAGCTGGTGTGCGCACAGGCATCATCGGGAAGAAGCACGTGGGGCCGG
 AGACCGTGTACCCGTTTGACTTTGCGTACACGGAGGAGAATGGCTCCGTC
 CTCCAGGTGGGGCGGAACATCACTAGAATTAAGCTGCTCGTCCGGAAATT
 CCTGCAGACTCAGGATGACCGGCCTTTCTTCCTCTACGTCGCCTTCCACG
 ACCCCCACCGCTGTGGGCACTCCCAACCCCAGTACGGAACCTTCTGTGAG

AAGTTTGGCAACGGAGAGAGCGGCATGGGTCTGTATCCCAGACTGGACCCC
 CCAGGCCTACGACCCACTGGACGTGCTGGTGCCTTACTTCGTCCCCAACA
 CCCCAGGAGCCCGAGCCGACCTGGCCGCTCAGTACACCACCGTCGGCCGC
 ATGGACCAAGGAGTTGGACTGGTGTCTCCAGGAGCTGCGTGACGCCGGTGT
 CCTGAACGACACACTGGTGATCTTCACGTCCGACAACGGGATCCCCTTCC
 CCAGCGGCAGGACCAACCTGTACTGGCCGGGCACTGCTGAACCCTTACTG
 GTGTCATCCCCGGAGCACCCAAAACGCTGGGGCCAAGTCAGCGAGGCCTA
 CGTGAGCCTCCTAGACCTCACGCCCACCATCTTGGATTGGTTCTCGATCC
 CGTACCCCAGCTACGCCATCTTTGGCTCGAAGACCATCCACCTCACTGGC
 CGGTCCCTCCTGCCGGCGCTGGAGGGCCGAGCCCCCTCTGGGGCCACCGTCTT
 TGGCAGCCAGAGCCACCACGAGGTCACCATGTCCTACCCCATGCGCTCCG
 TGCAGCACCGGCACTTCCGCCTCGTGCACAACCTCAACTTCAAGATGCCC
 TTTCCCATCGACCAGGACTTCTACGTCTCACCCACCTTCCAGGACCTCCT
 GAACCGCACACAGCTGGTCAGCCACGGGCTGGTACAAGGACCTCCGTC
 ATTACTACTACCGGGCGCGCTGGGAGCTCTACGACCGGAGCCGGGACCCC
 CACGAGACCCAGAACCTGGCCACCGACCCGCGCTTTGCTCAGCTTCTGGA
 GATGCTTCGGGACCAGCTGGCCAAGTGGCAGTGGGAGACCCACGACCCCT
 GGGTGTGCGCCCCCGACGGCGTCCTGGAGGAGAAGCTCTCTCCCCAGTGC
 CAGCCCCTACACAATGAGCTCTCATCTAGAGGATCCCGGGCTGACTACAA
 AGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACG
 ATGACAAGTAGTGA-3'

c) Ensamblaje del módulo hAATsp-SGSH-3xflag-ApoB (1734 pb) (SEQ ID No. 15).

5'-ATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTG
 CCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTCGTCCCCGGAACGCACTGCTGCTCCTCG
 CGGATGACGGAGGCTTTGAGAGTGGCGCGTACAACAACAGCGCCATCGCC
 ACCCCGCACCTGGACGCCTTGGCCCCGCCGAGCCTCCTCTTTCGCAATGC
 CTTACCTCGGTCAGCAGCTGCTCTCCAGCCGCGCCAGCCTCCTCACTG
 GCCTGCCCCAGCATCAGAATGGGATGTACGGGCTGCACCAGGACGTGCAC
 CACTTCAACTCCTTCGACAAGGTGCGGAGCCTGCCGCTGCTGCTCAGCCA
 AGCTGGTGTGCGCACAGGCATCATCGGGAAGAAGCACGTGGGGCCGGAGA
 CCGTGTACCCGTTTGACTTTGCGTACACGGAGGAGAATGGCTCCGTCCTC
 CAGGTGGGGCGGAACATCACTAGAAATTAAGCTGCTCGTCCGGAAATTCCT

GCAGACTCAGGATGACCGGCCTTTCTTCCTCTACGTGCGCTTCCACGACC
 CCCACCGCTGTGGGCACTCCCAACCCCAGTACGGAACCTTCTGTGAGAAG
 TTTGGCAACGGAGAGAGCGGCATGGGTGCTATCCCAGACTGGACCCCCCA
 GGCCTACGACCCACTGGACGTGCTGGTGCCTTACTTCGTCCCCAACACCC
 CGGCAGCCCCGAGCCGACCTGGCCGCTCAGTACACCACCGTCGGCCGCATG
 GACCAAGGAGTTGGACTGGTGCTCCAGGAGCTGCGTGACGCCGGTGTCTT
 GAACGACACACTGGTGATCTTCACGTCCGACAACGGGATCCCCTTCCCCA
 GCGGCAGGACCAACCTGTACTGGCCGGGCACTGCTGAACCTTACTGGTG
 TCATCCCCGGAGCACCCAAAACGCTGGGGCCAAGTCAGCGAGGCCTACGT
 GAGCCTCCTAGACCTCACGCCCACCATCTTGGATTGGTTCTCGATCCCGT
 ACCCCAGCTACGCCATCTTTGGCTCGAAGACCATCCACCTCACTGGCCGG
 TCCCTCCTGCCGGCGCTGGAGGCCGAGCCCCTCTGGGCCACCGTCTTTGG
 CAGCCAGAGCCACCACGAGGTCACCATGTCTTACCCCATGCGCTCCGTGC
 AGCACCGGCACTTCCGCCTCGTGCACAACCTCAACTTCAAGATGCCCTTT
 CCCATCGACCAGGACTTCTACGTCTCACCCACCTTCCAGGACCTCCTGAA
 CCGCACACAGCTGGTCAGCCCACGGGCTGGTACAAGGACCTCCGTCACT
 ACTACTACCGGGCGCGCTGGGAGCTCTACGACCGGAGCCGGGACCCCCAC
 GAGACCCAGAACCTGGCCACCGACCCGCGCTTTGCTCAGCTTCTGGAGAT
 GCTTCGGGACCAGCTGGCCAAGTGGCAGTGGGAGACCCACGACCCCTGGG
 TGTGCGCCCCCGACGGCGTCCTGGAGGAGAAGCTCTCTCCCCAGTGCCAG
 CCCCTCCACAATGAGCTGTCATCTAGAGGATCCCGGGCTGACTACAAAGA
 CCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATG
 ACAAGATCTCTGTCATTGATGCACTGCAGTACAAATTAGAGGGCACCACA
 AGATTGACAAGAAAAAGGGGATTGAAGTTAGCCACAGCTCTGTCTCTGAG
 CAACAAATTTGTGGAGGGTAGTAGATCTTAGTGA-3'

d) Ensamblaje del módulo hIDSsp-SGSH-3xflag-ApoB (1737 pb) (SEQ ID No. 17).

5'-ATGCCCCCGCCCCGCACCGGCCGCGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTGCT
 GAGCAGCGTGTGCGTGGCCCTGGGCCGTCCCCGGAACGCACTGCTGCTCC
 TCGCGGATGACGGAGGCTTTGAGAGTGGCGCGTACAACAACAGCGCCATC
 GCCACCCCGCACCTGGACGCCCTTGGCCCGCCGAGCCTCCTCTTTCGCAA
 TGCTTCACCTCGGTGAGCAGCTGCTCTCCAGCCGCGCCAGCCTCCTCA
 CTGGCCTGCCCCAGCATCAGAATGGGATGTACGGGCTGCACCAGGACGTG

CACCACTTCAACTCCTTCGACAAGGTGCGGAGCCTGCCGCTGCTGCTCAG
 CCAAGCTGGTGTGCGCACAGGCATCATCGGGAAGAAGCACGTGGGGCCGG
 AGACCGTGTACCCGTTTGACTTTGCGTACACGGAGGAGAATGGCTCCGTC
 CTCCAGGTGGGGCGGAACATCACTAGAATTAAGCTGCTCGTCCGGAAATT
 CCTGCAGACTCAGGATGACCGGCCTTTCTTCCTCTACGTCGCCTTCCACG
 ACCCCACCGCTGTGGGCACTCCCAACCCAGTACGGAACCTTCTGTGAG
 AAGTTTGGCAACGGAGAGAGCGGCATGGGTGCTATCCCAGACTGGACCCC
 CCAGGCCTACGACCCACTGGACGTGCTGGTGCCTTACTTCGTCCCCAACA
 CCCCAGGAGCCGAGCCGACCTGGCCGCTCAGTACACCACCGTCGGCCGC
 ATGGACCAAGGAGTTGGACTGGTGTCTCCAGGAGCTGCGTGACGCCGGTGT
 CCTGAACGACACACTGGTGATCTTCACGTCCGACAACGGGATCCCCTTCC
 CCAGCGGCAGGACCAACCTGTACTGGCCGGGCACTGCTGAACCCTTACTG
 GTGTCATCCCCGGAGCACCCAAAACGCTGGGGCCAAGTCAGCGAGGCCTA
 CGTGAGCCTCCTAGACCTCACGCCCACCATCTTGGATTGGTTCTCGATCC
 CGTACCCCAGCTACGCCATCTTTGGCTCGAAGACCATCCACCTCACTGGC
 CGGTCCCTCCTGCCGGCGCTGGAGGCCGAGCCCCCTCTGGGCCACCGTCTT
 TGGCAGCCAGAGCCACCACGAGGTCACCATGTCCTACCCCATGCGCTCCG
 TGCAGCACCGGCACTTCCGCCTCGTGACAACCTCAACTTCAAGATGCCC
 TTTCCCATCGACCAGGACTTCTACGTCTCACCCACCTTCCAGGACCTCCT
 GAACCGCACACAGCTGGTCAGCCCACGGGCTGGTACAAGGACCTCCGTC
 ATTACTACTACCGGGCGCGCTGGGAGCTCTACGACCGGAGCCGGGACCCC
 CACGAGACCCAGAACCTGGCCACCGACCCGCGCTTTGCTCAGCTTCTGGA
 GATGCTTCGGGACCAGCTGGCCAAGTGGCAGTGGGAGACCCACGACCCCT
 GGGTGTGCGCCCCCGACGGCGTCCTGGAGGAGAAGCTCTCTCCCCAGTGC
 CAGCCCCTACACAATGAGCTCTCATCTAGAGGATCCCGGGCTGACTACAA
 AGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACG
 ATGACAAGATCTCTGTGATTGATGCACTGCAGTACAAATTAGAGGGCACC
 ACAAGATTGACAAGAAAAAGGGGATTGAAGTTAGCCACAGCTCTGTCTCT
 GAGCAACAAATTTGTGGAGGGTAGTAGATCTTAGTGA-3'

SECUENCIAS SIN FLAG:

e) **Ensamblaje del módulo hAATsp-SGSH** (SEQ ID No. 19).

5'-ATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTG

CCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTCGTCCCCGGAACGCACTGCTGCTCCTCG
CGGATGACGGAGGCTTTGAGAGTGGCGCGTACAACAACAGCGCCATCGCC
ACCCCGCACCTGGACGCCTTGGCCCCGCCGCAGCCTCCTCTTTTCGCAATGC
CTTCACCTCGGTCAGCAGCTGCTCTCCCAGCCGCGCCAGCCTCCTCACTG
GCCTGCCCCAGCATCAGAATGGGATGTACGGGCTGCACCAGGACGTGCAC
CACTTCAACTCCTTCGACAAGGTGCGGAGCCTGCCGCTGCTGCTCAGCCA
AGCTGGTGTGCGCACAGGCATCATCGGGAAGAAGCACGTGGGGCCGGAGA
CCGTGTACCCGTTTGACTTTGCGTACACGGAGGAGAATGGCTCCGTCCTC
CAGGTGGGGCGGAACATCACTAGAATTAAGCTGCTCGTCCGGAAATTCCT
GCAGACTCAGGATGACCGGCCTTTCTTCTCTACGTGCGCTTCCACGACC
CCCACCGCTGTGGGCACTCCCAACCCCACTACGGAACCTTCTGTGAGAAG
TTTGGCAACGGAGAGAGCGGCATGGGTCTATCCCAGACTGGACCCCCCA
GGCCTACGACCCACTGGACGTGCTGGTGCCTTACTTCGTCCCCAACACCC
CGGCAGCCCGAGCCGACCTGGCCGCTCAGTACACCACCGTCGGCCGCATG
GACCAAGGAGTTGGACTGGTGCTCCAGGAGCTGCGTGACGCCGGTGTCTT
GAACGACACACTGGTGATCTTCACGTCCGACAACGGGATCCCCTTCCCCA
GCGGCAGGACCAACCTGTACTGGCCGGGCACTGCTGAACCCTTACTGGTG
TCATCCCCGGAGACCCAAAACGCTGGGGCCAAGTCAGCGAGGCCTACGT
GAGCCTCCTAGACCTCACGCCACCATCTTGGATTGGTTCTCGATCCCGT
ACCCAGCTACGCCATCTTTGGCTCGAAGACCATCCACCTCACTGGCCGG
TCCCTCCTGCCGGCGCTGGAGGCCGAGCCCCTCTGGGGCCACCGTCTTTGG
CAGCCAGAGCCACCACGAGGTCACCATGTCCTACCCCATGCGCTCCGTGC
AGCACCGGCACTTCCGCCTCGTGCAACCTCAACTTCAAGATGCCCTTT
CCCATCGACCAGGACTTCTACGTCTCACCCACCTTCCAGGACCTCCTGAA
CCGCACCACAGCTGGTCAGCCCACGGGCTGGTACAAGGACCTCCGTCATT
ACTACTACCGGGCGCGCTGGGAGCTCTACGACCGGAGCCGGGACCCCCAC
GAGACCCAGAACCTGGCCACCGACCCGCGCTTTGCTCAGCTTCTGGAGAT
GCTTCGGGACCAGCTGGCCAAGTGGCAGTGGGAGACCCACGACCCCTGGG
TGTGCGCCCCCGACGGCGTCCTGGAGGAGAAGCTCTCTCCCCAGTGCCAG
CCCCTCCACAATGAGCTGTGA-3'

f) Ensamblaje del módulo hIDSsp-SGSH (SEQ ID No. 21).

5'-ATGCCCCCGCCCCGCACCGGCCGCGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTGCT

GAGCAGCGTGTGCGTGGCCCTGGGCCGTCCCCGGAACGCACTGCTGCTCC
TCGCGGATGACGGAGGCTTTGAGAGTGGCGCGTACAACAACAGCGCCATC
GCCACCCCGCACCTGGACGCCTTGGCCCGCCGACGCTCCTCTTTTCGCAA
TGCTTCACCTCGGTCAGCAGCTGCTCTCCAGCCGCGCCAGCCTCCTCA
CTGGCCTGCCCCAGCATCAGAATGGGATGTACGGGCTGCACCAGGACGTG
CACCCTTCAACTCCTTCGACAAGGTGCGGAGCCTGCCGCTGCTGCTCAG
CCAAGCTGGTGTGCGCACAGGCATCATCGGGAAGAAGCACGTGGGGCCGG
AGACCGTGTACCCGTTTGACTTTGCGTACACGGAGGAGAATGGCTCCGTC
CTCCAGGTGGGGCGGAACATCACTAGAATTAAGCTGCTCGTCCGGAAATT
CCTGCAGACTCAGGATGACCGGCCTTTCTTCCTCTACGTCGCCTTCCACG
ACCCCAACCGCTGTGGGCACTCCCAACCCAGTACGGAACCTTCTGTGAG
AAGTTTGGCAACGGAGAGAGCGGCATGGGTCTGTATCCCAGACTGGACCCC
CCAGGCCTACGACCCACTGGACGTGCTGGTGCCTTACTTCGTCCCCAACA
CCCCGGCAGCCCGAGCCGACCTGGCCGCTCAGTACACCACCGTCGGCCGC
ATGGACCAAGGAGTTGGACTGGTGTCTCCAGGAGCTGCGTGACGCCGGTGT
CCTGAACGACACACTGGTGATCTTCACGTCCGACAACGGGATCCCCTTCC
CCAGCGGCAGGACCAACCTGTACTGGCCGGGCACTGCTGAACCCTTACTG
GTGTCATCCCCGGAGCACCCAAAACGCTGGGGCCAAGTCAGCGAGGCCTA
CGTGAGCCTCCTAGACCTCACGCCCACCATCTTGGATTGGTTCTCGATCC
CGTACCCAGCTACGCCATCTTTGGCTCGAAGACCATCCACCTCACTGGC
CGGTCCCTCCTGCCGGCGCTGGAGGCCGAGCCCCTCTGGGGCCACCGTCTT
TGGCAGCCAGAGCCACCACGAGGTCACCATGTCCTACCCCATGCGCTCCG
TGCAGCACCGGCACTTCCGCCTCGTGCACAACCTCAACTTCAAGATGCCC
TTTCCCATCGACCAGGACTTCTACGTCTCACCCACCTTCCAGGACCTCCT
GAACCGCACACAGCTGGTCAGCCACGGGCTGGTACAAGGACCTCCGTC
ATTACTACTACCGGGCGCGCTGGGAGCTCTACGACCGGAGCCGGGACCCC
CACGAGACCCAGAACCTGGCCACCGACCCGCGCTTTGCTCAGCTTCTGGA
GATGCTTCGGGACCAGCTGGCCAAGTGGCAGTGGGAGACCCACGACCCCT
GGGTGTGCGCCCCCGACGGCGTCCTGGAGGAGAAGCTCTCTCCCCAGTGC
CAGCCCCTACACAATGAGCTCTGA-3'

g) Ensamblaje del módulo hAATsp-SGSH-ApoB (SEQ ID No. 23).

5'-ATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTG

CCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTCGTCCCCGGAACGCACTGCTGCTCCTCG
 CGGATGACGGAGGCTTTGAGAGTGGCGCGTACAACAACAGCGCCATCGCC
 ACCCCGCACCTGGACGCCTTGGCCCCGCCGCAGCCTCCTCTTTTCGCAATGC
 CTTACCTCGGTCAGCAGCTGCTCTCCCAGCCGCGCCAGCCTCCTCACTG
 GCCTGCCCCAGCATCAGAATGGGATGTACGGGCTGCACCAGGACGTGCAC
 CACTTCAACTCCTTCGACAAGGTGCGGAGCCTGCCGCTGCTGCTCAGCCA
 AGCTGGTGTGCGCACAGGCATCATCGGGAAGAAGCACGTGGGGCCGGAGA
 CCGTGTACCCGTTTGACTTTGCGTACACGGAGGAGAATGGCTCCGTCCTC
 CAGGTGGGGCGGAACATCACTAGAATTAAGCTGCTCGTCCGGAAATTCCT
 GCAGACTCAGGATGACCGGCCTTTCTTCCTCTACGTGCGCTTCCACGACC
 CCCACCGCTGTGGGCACTCCCAACCCAGTACGGAACCTTCTGTGAGAAG
 TTTGGCAACGGAGAGAGCGGCATGGGTGCTATCCCAGACTGGACCCCCCA
 GGCCTACGACCCACTGGACGTGCTGGTGCCTTACTTCGTCCCCAACACCC
 CGGCAGCCCGAGCCGACCTGGCCGCTCAGTACACCACCGTCGGCCGCATG
 GACCAAGGAGTTGGACTGGTGTCTCCAGGAGCTGCGTGACGCCGGTGTCTT
 GAACGACACACTGGTGATCTTCACGTCCGACAACGGGATCCCCTTCCCCA
 GCGGCAGGACCAACCTGTACTGGCCGGGCACTGCTGAACCCTTACTGGTG
 TCATCCCCGGAGACCCAAAACGCTGGGGCCAAGTCAGCGAGGCCTACGT
 GAGCCTCCTAGACCTCACGCCACCATCTTGGATTGGTTCTCGATCCCGT
 ACCCCAGCTACGCCATCTTTGGCTCGAAGACCATCCACCTCACTGGCCGG
 TCCCTCCTGCCGGCGCTGGAGGGCCGAGCCCCTCTGGGGCCACCGTCTTTGG
 CAGCCAGAGCCACCACGAGGTCACCATGTCTTACCCCATGCGCTCCGTGC
 AGCACCGGCACTTCCGCCTCGTGCACAACCTCAACTTCAAGATGCCCTTT
 CCCATCGACCAGGACTTCTACGTCTCACCCACCTTCCAGGACCTCCTGAA
 CCGCACACAGCTGGTCAGCCCACGGGCTGGTACAAGGACCTCCGTCATT
 ACTACTACCGGGCGCGCTGGGAGCTCTACGACCGGAGCCGGGACCCCCAC
 GAGACCCAGAACCTGGCCACCGACCCGCGCTTTGCTCAGCTTCTGGAGAT
 GCTTCGGGACCAGCTGGCCAAGTGGCAGTGGGAGACCCACGACCCCTGGG
 TGTGCGCCCCCGACGGCGTCCTGGAGGAGAAGCTCTCTCCCCAGTGCCAG
 CCCCTCCACAATGAGCTGTCTATCTAGATCTGTCTATTGATGCACTGCAGTA
 CAAATTAGAGGGCACCACAAGATTGACAAGAAAAAGGGGATTGAAGTTAGC
 CACAGCTCTGTCTCTGAGCAACAAATTTGTGGAGGGTAGTAGATCTTAG
 TGA-3'

h) Ensamblaje del módulo hIDSsp-SGSH-ApoB (SEQ ID No. 25).

5'-ATGCCCCCGCCCCGCACCGGCCGCGGCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTGCT
GAGCAGCGTGTGCGTGGCCCTGGGCCGTCCCCGGAACGCACTGCTGCTCCTC
CGGGATGACGGAGGCTTTGAGAGTGGCGCGTACAACAACAGCGCCATCGCC
ACCCCGCACCTGGACGCCTTGGCCCCGCCGAGCCTCCTCTTTCGCAATGCCTT
CACCTCGGTCAGCAGCTGCTCTCCAGCCGCGCCAGCCTCCTCACTGGCCTG
CCCCAGCATCAGAATGGGATGTACGGGCTGCACCAGGACGTGCACCACTTC
AACTCCTTCGACAAGGTGCGGAGCCTGCCGCTGCTGCTCAGCCAAGCTGGTG
TGCGCACAGGCATCATCGGGAAGAAGCACGTGGGGCCGGAGACCGTGTACC
CGTTTGACTTTGCGTACACGGAGGAGAATGGCTCCGTCCTCCAGGTGGGGCG
GAACATCACTAGAAATTAAGCTGCTCGTCCGGAATTCCTGCAGACTCAGGAT
GACCGGCCCTTTCTTCTCTACGTGCGCTTCCACGACCCCCACCGCTGTGGGCA
CTCCCAACCCAGTACGGAACCTTCTGTGAGAAGTTTGGCAACGGAGAGAG
CGGCATGGGTGCTATCCAGACTGGACCCCCAGGCCTACGACCCACTGGAC
GTGCTGGTGCTTACTTCGTCCCCAACACCCCGGCAGCCCGAGCCGACCTGG
CCGCTCAGTACACCACCGTCGGCCGCATGGACCAAGGAGTTGGACTGGTGCT
CCAGGAGCTGCGTGACGCCGGTGTCTGAACGACACACTGGTGATCTTCACG
TCCGACAACGGGATCCCCTTCCCCAGCGGCAGGACCAACCTGTACTGGCCGG
GCACTGCTGAACCCTTACTGGTGTATCCCCGGAGCACCCAAAACGTGGGG
CCAAGTCAGCGAGGCCTACGTGAGCCTCCTAGACCTCACGCCCACCATCTTG
GATTGGTTCTCGATCCCGTACCCCAGCTACGCCATCTTTGGCTCGAAGACCA
TCCACCTCACTGGCCGGTCCCTCCTGCCGGCGCTGGAGGCCGAGCCCCCTCTG
GGCCACCGTCTTTGGCAGCCAGAGCCACCACGAGGTCACCATGTCTTACCCC
ATGCGCTCCGTGCAGCACCGGCACTTCCGCCTCGTGCACAACCTCAACTTCA
AGATGCCCTTTCCCATCGACCAGGACTTCTACGTCTCACCCACCTTCCAGGA
CCTCCTGAACCGCACCAACAGCTGGTCAGCCACGGGCTGGTACAAGGACCTC
CGTCATTACTACTACCGGGCGCGCTGGGAGCTCTACGACCGGAGCCGGGACC
CCCACGAGACCCAGAACCTGGCCACCGACCCGCGCTTTGCTCAGCTTCTGGA
GATGCTTCGGGACCAGCTGGCCAAGTGGCAGTGGGAGACCCACGACCCCTG
GGTGTGCGCCCCCGACGGCGTCCTGGAGGAGAAGCTCTCTCCCCAGTGCCAG
CCCCTCCACAATGAGCTGTATCTAGATCTGTCATTGATGCACTGCAGTACA
AATTAGAGGGCACCACAAGATTGACAAGAAAAAGGGGATTGAAGTTAGCCA
CAGCTCTGTCTCTGAGCAACAAATTTGTGGAGGGTAGTAGATCTTAGTGA-3'.

- 5 Es un objeto adicional de la invención un plásmido recombinante que comprende la secuencia nucleotídica como se divulga anteriormente bajo el control de un promotor específico del hígado, preferiblemente el promotor específico del hígado es el promotor de globulina de hormona tiroides humana (TBG), más preferiblemente el promotor de globulina de hormona tiroides humana (TBG) tiene la secuencia: 5'-

GCTAGCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTGGC
 AGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAACAT
 TCCAGATCCAGGTTAATTTTTAAAAAGCAGTCAAAAGTCCAAGTGGCCCTTG
 GCAGCATTTACTCTCTCTGTTTGCTCTGGTTAATAATCTCAGGAGCACAAAC
 ATTCCAGATCCGGCGCGCCAGGGCTGGAAGCTACCTTTGACATCATTTCTC
 TGCGAATGCATGTATAATTTCTACAGAACCTATTAGAAAGGATCACCCAGC
 CTCTGCTTTTGTACAACCTTTCCCTTAAAAAACTGCCAATTCCACTGCTGTTTG
 GCCCAATAGTGAGAACTTTTTCCTGCTGCCTCTTGGTGCTTTTGCCTATGGCC
 CCTATTCTGCCTGCTGAAGACACTCTTGCCAGCATGGACTTAAACCCCTCCA
 GCTCTGACAATCCTCTTTCTCTTTTGTGTTTACATGAAGGGTCTGGCAGCCAA
 AGCAATCACTCAAAGTTCAAACCTTATCATTTTTTGTCTTTGTTCTCTTGGCC
 TTGGTTTTGTACATCAGCTTTGAAAATACCATCCCAGGGTTAATGCTGGGGT
 TAATTTATAACTAAGAGTGCTCTAGTTTTGCAATACAGGACATGCTATAAAA
 ATGGAAAGATGTTGCTTTCTGAGAGACTGCAG-3' (SEQ ID No. 27).

El experto en el campo será consciente de que el plásmido recombinante de la invención tiene que ensamblarse en un vector vírico y seleccionar el más adecuado. Tales vectores víricos pueden pertenecer al grupo de: vectores lentivíricos, vectores adenovíricos dependientes de auxiliares o vectores de AAV. Como ejemplo, se describen vectores lentivíricos para la terapia génica de trastornos de almacenamiento lisosómico en Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D. y Verma, I. M. (1996a). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector". *Science* 272(5259), 263-7; Consiglio A, Quattrini A, Martino S, Bensadoun JC, Dolcetta D, Trojani A, Benaglia G, Marchesini S, Cestari V, Oliverio A, Bordignon C, Naldini. "In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice L". *Nat Med.* marzo de 2001; 7(3): 310-6; Follenzi A, Naldini L. "HIV-based vectors. Preparation and use". *Methods Mol Med.* 2002; 69: 259-74. Como ejemplo adicional, se describen vectores adenovíricos dependientes de auxiliares en Brunetti-Pierri N, Ng P. "Progress towards liver and lung-directed gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors". *Curr Gene Ther.* oct. de 2009; 9(5): 329-40.

En una realización preferida, el plásmido recombinante deriva del vector plasmídico AAV2.1 y es adecuado para vectores víricos de AAV, preferiblemente AAV de serotipo 8.

Es entonces un objeto adicional de la invención un vector vírico para la terapia génica de trastornos lisosómicos que comprende cualquiera de los vectores de ácido nucleico recombinantes como se divulgan anteriormente.

Preferiblemente, el trastorno lisosómico es MPS, más preferiblemente MPS de tipo IIIA.

Es un objeto adicional de la invención una composición farmacéutica que comprende el vector vírico como se divulga anteriormente, preferiblemente para administración sistémica.

Es un objeto adicional de la invención una sulfatasa quimérica consistente esencialmente en el orden de secuencia N-terminal-C-terminal: a) un péptido señal derivado o bien de la secuencia aminoacídica de α -antitripsina humana (hAAT) o la secuencia aminoacídica de iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana, perteneciendo dicha secuencia al siguiente grupo: (SEQ ID No. 2) o (SEQ ID No. 4); b) una secuencia aminoacídica derivada de sulfatasa humana desprovista de su péptido señal; c) el dominio de unión a LDLR de ApoB.

En una realización preferida, la sulfatasa quimérica tiene una secuencia derivada de sulfamidasa humana, preferiblemente de (SEQ ID No. 8).

En una realización preferida, la sulfatasa quimérica comprende un dominio de unión a LDLR de ApoB codificado que tiene la secuencia de (SEQ ID No. 10).

En una realización preferida, la sulfatasa quimérica tiene esencialmente la secuencia perteneciente al siguiente grupo:

SECUENCIAS CON FLAG (el experto sustituirá fácilmente la secuencia FLAG por cualquier otra secuencia espaciadora adecuada):

a) Secuencia aminoacídica de hAATsp-SGSH-3xflag (*= terminación) (SEQ ID No. 12).

MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLARPRNALLLLADDGGFESGAYNNNSAIA
 TPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHQNNGMYGLHQDVH
 HFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIIGKKHVGPEVYPFDFAYTEENGSVL
 QVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFPLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCK
 FGNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRM
 DQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFPSGRTNLYWPGTAEPLLV
 SSPEHPKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGR
 SLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPF
 PIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPH
 ETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQ
 PLHNELSSRGSRADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

b) Secuencia aminoacídica de hIDSsp-SGSH-3xflag (*= terminación) (SEQ ID No. 14)

MPPPRTRGRLWLGLVLSSVCVALGRPRNALLLLADDGGFESGAYNNNSAI
 ATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHQNNGMYGLHQDV
 HHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIIGKKHVGPEVYPFDFAYTEENGSV
 LQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFPLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCK
 KFGNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGR
 MDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFPSGRTNLYWPGTAEPLLV
 VSSPEHPKRWGQVSEAYVSLLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTG
 RSLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMP
 FPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDP
 HETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLEEKLSPOCQ
 QPLHNELSSRGSRADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

5

c) Secuencia aminoacídica de hAATsp-SGSH-3xflag-ApoB (*= terminación) (SEQ ID No. 16)

MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLARPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIA
 TPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHQNNGMYGLHQDVH
 HFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEPVPDFAYTEENGSVL
 QVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFPLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCK
 FGNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRM
 DQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLL
 SSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGR
 SLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPF
 PIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPH
 ETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLEEKLSPQCQ
 PLHNELSSRGSRADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKISVIDALQYKLEGT
 RLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSRS**

d) Secuencia aminoacídica de hIDSsp-SGSH-3xflag-ApoB (*= terminación) (SEQ ID No. 18)

MPPPRTRGRLWLGLVLSSVCVALGRPRNALLLADDGGFESGAYNNSAI
 ATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHQNNGMYGLHQDV
 HHFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEPVPDFAYTEENGSV
 LQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFPLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCK
 KFGNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGR
 MDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLL
 VSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTG
 RSLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMP
 FPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDP
 HETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLEEKLSPQC
 QPLHNELSSRGSRADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKISVIDALQYKLEGT
 TRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSRS**,

5 SECUENCIAS SIN FLAG:

e) Secuencia aminoacídica de hAATsp-SGSH (*= terminación) (SEQ ID No. 20)

MPSSVSWGILLLAGLCCLVPVSLARPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIA
 TPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHQNGLYGLHGDVH
 HFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYVYVDFAYTEENGSLV
 QVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCK
 FGNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRM
 DQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLL
 SSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTG
 SLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPF
 PIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDPH
 ETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLEEKLSPPCQ
 PLHNEL*

f) Secuencia aminoacídica de hIDSsp-SGSH (*= terminación) (SEQ ID No. 22)

MPPPRTGRLWLGLVLSSVCVALGRPRNALLLADDGGFESGAYNNSAI
 ATPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHQNGLYGLHGDV
 HHNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVYVYVDFAYTEENGSLV
 LQVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCK
 KFGNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGR
 MDQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFSGRTNLYWPGTAEPLL
 VSSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTG
 RSLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMP
 FPIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYRARWELYDRSRDP
 HETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLEEKLSPPCQ
 QPLHNEL*

5

g) Secuencia aminoacídica de hAATsp-SGSH-ApoB (*= terminación) (SEQ ID No. 24)

MPSSVSWGILLLAGLCCLPVSLARPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIA
 TPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHQNNGMYGLHQDVH
 HFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVTPYFDFAYTEENGSVL
 QVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCK
 FGNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRM
 DQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFPSGRTNLYWPGTAEPLL
 SSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGR
 SLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPF
 PIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYRARRWELYDRSRDPH
 ETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLEEKLSPQCQ
 PLHNELSSRSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSRS**

h) Secuencia aminoacídica de hIDSsp-SGSH-ApoB (*= terminación) (SEQ ID No. 26)

MPPPRTRGRLLWLGLVLSSVCVALGRPRNALLLADDGGFESGAYNNSAIA
 TPHLDALARRSLLFRNAFTSVSSCSPSRASLLTGLPQHQNNGMYGLHQDVH
 HFNSFDKVRSLPLLLSQAGVRTGIIGKKHVGPEVTPYFDFAYTEENGSVL
 QVGRNITRIKLLVRKFLQTQDDRPFFLYVAFHDPHRCGHSQPQYGTFCCK
 FGNGESGMGRIPDWTPQAYDPLDVLVPYFVPNTPAARADLAAQYTTVGRM
 DQGVGLVLQELRDAGVLNDTLVIFTSDNGIPFPSGRTNLYWPGTAEPLL
 SSPEHPKRWGQVSEAYVSLDLTPTILDWFSIPYPSYAIFGSKTIHLTGR
 SLLPALEAEPLWATVFGSQSHHEVTMSYPMRSVQHRHFRLVHNLNFKMPF
 PIDQDFYVSPTFQDLLNRTTAGQPTGWYKDLRHYYRARRWELYDRSRDPH
 ETQNLATDPRFAQLLEMLRDQLAKWQWETHDPWVCAPDGVLEEKLSPQCQ
 PLHNELSSRSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGSRS**

- 5 Es otro objeto de la invención la sulfatasa química como se divulga anteriormente para uso médico, preferiblemente para el tratamiento de MPS, más preferiblemente MPS de tipo IIIA.

Es otro objeto de la invención una composición farmacéutica que comprende la sulfatasa química como se divulga anteriormente y diluyentes y/o excipientes y/o portadores adecuados.

- 10 Es otro objeto de la invención un método para el tratamiento de una patología de MPS que comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad adecuada de la composición farmacéutica que comprende el vector vírico para terapia génica como se divulga anteriormente. Preferiblemente, la patología de MPS es MPS de tipo IIIA.

Es otro objeto de la invención un método para el tratamiento de una patología de MPS que comprende la etapa de administrar a un sujeto una cantidad adecuada de la composición farmacéutica que comprende la sulfatasa química como se divulga anteriormente. Preferiblemente, la patología de MPS es MPS de tipo IIIA.

- 15 La ventaja principal de la invención es que la molécula química de la invención como se produce y secreta por el hígado es capaz de cruzar la BHE y por tanto se orienta potencialmente a todos los distritos cerebrales.

Con referencia al enfoque de terapia génica, con respecto a la técnica anterior de Fraldi *et al.* HMG 2007, que describe terapia génica mediada por AAV2/5 para MPS-IIIa, la presente invención es menos invasiva debido a que los vectores AAV8 se administran sistémicamente y no directamente al cerebro.

En cuanto al enfoque de terapia de reemplazo enzimático con respecto a la técnica anterior de Hemsley, K.M. y J.J. Hopwood, Behav Brain Res, 2005; Savas, P.S *et al.*, Mol Genet Metab, 2004 y Hemsley, K.M., *et al.*, Mol Genet Metab, 2007, la presente invención supera la necesidad de repetir la inyección de la enzima y se diseña para cruzar la BHE. Merece la pena apuntar que para los enfoques de ERT, la BHE y el alto coste de la producción enzimática son limitaciones muy importantes.

Leyendas de las figuras

Figura 1. SGSH no modificada: Estudio *in vivo* preliminar 1 (tratamiento de recién nacidos).

Análisis de la señal de GFP en el hígado de ratones con MPSIIA recién nacidos inyectados con AAV2/8-TBG-SGSH. Se inyectaron ratones recién nacidos con MPSIIIA con vectores AAV2/8-TBG-SGSH (que expresan una sulfamidasa no modificada). Como control, se inyectaron en ratones recién nacidos con MPSIIIA y heterocigóticos (fenotípicamente normales) vectores AAV2/8-TBG-GFP. Se analizó en secciones hepáticas de ratones con MPS-IIIA inyectados la tinción de GFP en diferentes momentos después de la inyección (1, 2, 3, 5 y 10 semanas después de la inyección). La señal de GFP era muy fuerte en los puntos temporales tempranos. Sin embargo, se observó una disminución significativa de la señal de GFP en los puntos temporales tardíos después de la inyección.

Figura 2. SGSH no modificada: Estudio preliminar *in vivo* 1 (tratamiento de recién nacidos).

Actividad de SGSH en el hígado y suero de ratones inyectados recién nacidos. Se midió la actividad sulfamidasa en el suero (A) e hígado (B) de ratones con MPSIIIA inyectados con AAV2/8-TBG-SGSH y ratones de control (ratones con MPS-IIIA y heterocigóticos inyectados con AAV2/8-TBG-GFP). (A) La actividad de SGSH en el plasma de ratones con MPS-IIIA tratados con AAV2/8-TBG-SGSH aumentaba durante el periodo de las dos primeras semanas después del tratamiento neonatal, y disminuía entonces con el tiempo hasta alcanzar los niveles medidos en ratones con MPS-IIIA inyectados con GFP de control. (B) El análisis de la actividad de SGSH hepática mostraba una tendencia similar a la observada en el plasma, con mayores niveles de actividad detectada en la primera semana después de la inyección.

Figura 3. SGSH no modificada: Estudio preliminar *in vivo* 2 (tratamiento de adultos).

Análisis de la señal de GFP en el hígado de ratones con MPSIIA adultos inyectados con AAV2/8-TBG-GFP. Se inyectaron en ratones con MPSIIIA de 1,5 meses de edad vectores AAV2/8-TBG-SGSH (que expresan una sulfamidasa no modificada). Como control, se inyectaron en ratones con MPSIIIA y heterocigóticos (fenotípicamente normales) de 1,5 meses de edad vectores AAV2/8-TBG-GFP. Se analizó en secciones hepáticas de ratones inyectados con MPS-IIIA la tinción de GFP a las 1 y 5 semanas después de la inyección. Se observó una expresión alta y estable de GFP

Figura 4. SGSH no modificada: Estudio preliminar *in vivo* 2 (tratamiento de adultos).

Actividad de SGSH en el suero e hígado de ratones adultos inyectados. Se midió la actividad sulfamidasa en el suero (A) e hígado (B) de ratones con MPSIIIA inyectados con AAV2/8-TBG-SGSH y ratones de control (ratones con MPS-IIIA y heterocigóticos inyectados con AAV2/8-TBG-GFP). (A) En el hígado de ratones con MPSIIIA inyectados con AAV2/8-TBG-SGSH, se observó un fuerte aumento de la actividad de SGSH en comparación con la baja actividad enzimática detectada en los animales inyectados con el vector de GFP. Además, esta actividad permanecía estable durante 5 semanas después de la inyección (el último punto temporal analizado). (B) De forma consistente, el análisis de la actividad de SGSH en el suero de ratones con MPS-IIIA tratados con AAV2/8-TBG-SGSH era muy alto y estable a lo largo del tiempo después de la inyección analizado.

Figura 5. Constructos de sulfamidasa quimérica.

Se reemplazó el péptido señal (SP) de sulfamidasa por el de α -antitripsina humana (hAAT) o iduronato-2-sulfatasa (IDS). Los constructos se diseñaron como "proteínas sulfamidasa parcialmente genomanipuladas" (IDSsp-SGSHflag y hAATsp-SGSHflag). Para construir las proteínas sulfamidasa quiméricas finales, se fusionó el dominio de unión a LDLR de ApoB (ApoB-BD) con el extremo C del marcaje Flag, obteniendo los "constructos genomanipulados finales" resultantes (IDSsp-SGSHflag-ApoB y hAATsp-SGSHflag-ApoB). Se amplificó la secuencia de ApoB (114 pb) por PCR a partir de ADNc de sangre humana usando oligonucleótidos directo e inverso con sitios 5' BglII. Se preparó el plásmido de cadena principal que contiene la secuencia de SP-SGSH insertando mediante mutagénesis el sitio BglII antes del codón de terminación del marcaje Flag. Se insertaron todas las secuencias de sulfamidasa quimérica resultantes (IDSsp-SGSHflag, hAATsp-SGSHflag, IDSsp-SGSHflag-ApoB y hAATsp-SGSHflag-ApoB) en plásmidos de expresión de mamífero bajo un promotor de CMV.

Figura 6. Transporte mediado por receptor.

Cruce de la BHE a través de transcitosis mediada por receptor. El dominio de unión a receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) de la apolipoproteína B (LDLR-BD de ApoB) confiere a la sulfamidasa la capacidad de alcanzar las células cerebrales por unión a receptores de LDL, que son abundantes en las células endoteliales de la BHE. Este mecanismo puede sustituir al transporte mediado por el receptor de 6-fosfato de manosa (M6PR) de la

sulfamidasa por la BHE, que es ineficaz.

Figura 7. Estudio *in vitro*.

Actividad de SGSH en el sedimento y en el medio de células MEF con MPS-IIIa transfectadas. Se transfectaron células MEF derivadas de ratones con MPS-IIIa con constructos genomanipulados parciales o finales. (A) Se midió la actividad sulfamidasa en el medio (gris claro) y el sedimento (gris oscuro) de células transfectadas. (B) Se evaluó también la eficacia de secreción correspondiente (actividad en medio/actividad total).

Figura 8. Estudio *in vitro*.

Análisis de transferencia Western de todas las proteínas sulfamidasa genomanipuladas.

Se transfectaron células MEF derivadas de ratones con MPS-IIIa con constructos genomanipulados parciales o finales o con constructo de SGSH no modificada de control. (A) El análisis de transferencia con anticuerpos anti-Flag muestra la expresión correcta de todas las proteínas quiméricas. Como control de la eficacia de transfección, se cotransfectaron las células con la misma concentración de un plásmido que contiene sintaxina7 marcada con Flag, una proteína no relacionada. (B) Se practicaron experimentos de pulso y seguimiento en las células transfectadas para evaluar la tasa de recambio de las proteínas quiméricas. (C) Se transfectaron células Cos-7 con constructos genomanipulados parciales o finales o con constructo de SGSH no modificada de control. Se observó la localización lisosómica en todas las células transfectadas por inmunotinción con anticuerpos anti-SGSH.

Figura 9. Estudio *in vivo*.

*Resultados *in vivo* preliminares en ratones con MPS IIIa inyectados con sulfamidasa genomanipulada final.* Los autores obtuvieron resultados preliminares pero extremadamente alentadores, en ratones con MPS-IIIa inyectados con uno de los constructos de sulfamidasa finales: hAATsp-SGSHflag-ApoB. Se inyectó sistémicamente en ratones adultos con MPS-IIIa AAV2/8-TBG-hAATsp-SGSHflag-ApoB. Un grupo con MPS-IIIa se inyectó también con AAV2/8-TBG-SGSH (que contiene la sulfamidasa no modificada) como control. Se sacrificaron los ratones un mes después de la inyección. En los ratones inyectados con la sulfamidasa quimérica, se observó mayor actividad sulfamidasa hepática y un aumento muy fuerte de la secreción de sulfamidasa con respecto a los ratones de control. Además, se detectó un aumento significativo de la actividad de SGSH en el cerebro de ratones inyectados con la sulfamidasa quimérica en comparación con las medidas de actividad de SGSH en el cerebro de ratones inyectados con sulfamidasa no modificada.

Figura 10. Mapa del plásmido AAV2.1.

Mapa del plásmido pAAV2.1 usado para la producción de vectores víricos AAV2.8. El plásmido contiene el gen de GFP bajo el control del promotor específico de hígado TBG. Se reemplazó la secuencia de GFP por ADNc que codifica los módulos de sulfamidasa quimérica usando los sitios de restricción NotI e HindIII. Se transfirió el plásmido resultante junto con el auxiliar pAd, el plásmido pAAV rep-cap, en células 293, produciendo vectores víricos AAV2.8 (véanse los Métodos).

Métodos

Construcción de módulos de SGSH quimérica, vectores de ácido nucleico recombinante y vectores víricos

Se produjeron los péptidos señal alternativos mediante ligamiento de dos fragmentos: una secuencia de ADNc de SGSH humana (fragmento I) y la secuencia de péptido señal (fragmento II). Se amplificó el fragmento I a partir de un plásmido que expresa hSGSH y que comenzaba en el extremo 3' de la secuencia del péptido señal de hSGSH (correspondiente al nucleótido en la posición 61 en la secuencia de SGSH) y se extendió hasta un único sitio XbaI que contenía el ADNc de SGSH completo (oligos usados: SGSHFOR 5'-CGT CCC CGG AAC GCA CTG CTG CTCCT-3' (SEQ ID No. 28) y SGSHREV 5'-GCG GCC TCT AGA TGA CAG CTC ATT GTG GAG GGG CTG-3' (SEQ ID No. 29)). El Fragmento II era único para cada módulo de expresión. Para hAATsp-SGSH-cFlag, el fragmento II se sintetizaba reasociando dos secuencias oligonucleotídicas específicas (hAATspFOR 5'-GGC CGC ATG CCG TCT TCT GTC TCG TGG GGC ATC CTC CTG CTG GCA GGC CTG TGC TGC CTG GTC CCT GTC TCC CTG GCT 3' (SEQ ID No. 30) y hAATspREV 5'-AGC CAG GGA GAC AGG GAC CAG GCA GCA CAG GCC TGC CAG CAG GAG GAT GCC CCACGA GAC AGA AGA CGG CAT GC-3' (SEQ ID No. 31)) que contienen la secuencia del péptido señal de α 1-antitripsina humana [ADNc de α 1-antitripsina humana: 72 pb].

El fragmento que codifica tal péptido señal era:
5'-ATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTG

CCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCT-3' (SEQ ID No. 1).

Para el módulo de expresión IDSsp-SGSH-cFlag, se sintetizó el fragmento II reasociando dos secuencias oligonucleotídicas específicas (IDSspFOR

5'- GGC CGC ATG CCC CCG

5 CCC CGC ACC GGC CGC GGC CTG CTG TGG CTG GGC CTG GTG CTG AGC
AGC GTG TGC GTG GCC CTG GGC -3' (SEQ ID No. 32) e IDSspREV
5'- GCCCAG GGC CAC GCA CAC GCT GCT CAG CAC CAG GCC CAG CCA CAG CAG

GCC GCG GCC GGT GCG GGG CGG GGG CAT GC-3' (SEQ ID No. 33) que contiene la secuencia del péptido señal de iduronato sulfatasa humana [ADNc de iduronato-2-sulfatasa de Homo sapiens (IDS): 75 pb]. El fragmento que codifica tal péptido señal era:
5'-ATGCCGCCACCCCGGACCGGCCGAGGCCTTCTCTGGCTGGGTCTGGTTCT

GAGCTCCGTCTGCGTCGCCCTCGGA-3' (SEQ ID No. 3) o una secuencia optimizada
5'-ATGCCCCCGCCCCGCACCGGCCGCGGCCTGCTGTGGCTGGGCCTGGTG
CTGAGCAGCGTGTGCGTGGCCCTGGGC-3' (SEQ ID No. 5). Las dos secuencias anteriores difieren solo
15 en el uso de codón y codifican la misma secuencia aa de péptido señal (SEQ ID No. 4 o 6). Las secuencias oligonucleotídicas del fragmento II tienen un sitio 5' NotI y un sitio 3' de extremo romo. Se incubaron las secuencias oligonucleotídicas directa e inversa durante 3 minutos a 100 °C. Después de enfriar a TA, se añadió PNK a los oligos durante 30 minutos a 37 °C. Se ligaron el fragmento I (5'NotI-3'romo) y el fragmento II (5'romo3'Xba) con el vector plasmídico p3xFlag-CMV14 (5'Not-3'Xba). Se transformaron células DH5α competentes con la mezcla de ligamiento resultante.
20

Para obtener los constructos quiméricos de SGSH completos, se amplificó la secuencia aminoacídica 3371-3409 de ApoB humana (114 pb:

5'TCTGTTCATTGATGCACTGCAGTACAAATTAGAGGG
CACCACAAGATTGACAAGAAAAAGGGGATTGAAGTTAGCCACAGCTCTGTC

25 TCTGAGCAACAAATTTGTGGAGGGTAGT-3' (SEQ ID No. 9) mediante una colección de ADNc humana (oligos: ApoBDFOR 5'- AGA TCT CTG TCA TTG ATG CACTGC AGT-3' (SEQ ID No. 34) y ApoBDREV 5'- AGA TCT ACT ACC CTC CACAAA TTT GTT GC -3' (SEQ ID No. 35)) y se clonó en los sitios BglII en el extremo 5' del marcaje 3xFlag de hAATsp-SGSH-cFlag o IDSsp-SGSH-cFlag.

Se subclonaron los diferentes módulos de expresión que contienen o bien los constructos quiméricos parciales (hAATsp-SGSH-cFlag e hIDSsp-SGSH-cFlag) o los constructos quiméricos completos (hAATsp-SGSH-cFlag-ApoB e hIDSsp-SGSH-cFlag-ApoB) en pAAV2.1-TBG-GFP entre NotI (5') e HindIII (3') (la secuencia de GFP se reemplazó por los módulos de expresión). Se usaron los plásmidos resultantes (Fig. 10) para producir AAV recombinante de serotipo 8 (AAV2/8) (19). Se produjeron los vectores de AAV usando una transfección transitoria de tres plásmidos en células 293: auxiliar pAd, pAAV rep-cap (plásmido de empaquetamiento que contiene el gen AAV2 rep fusionado con los genes cap de AAV de serotipo 8), pAAV Cis (este plásmido es el vector pAAV2.1-TBG que expresa las proteínas sulfamidadas quiméricas). Se purificaron los vectores víricos AAV2/8 recombinantes mediante dos rondas de CsCl, como se describe anteriormente (19). Se valoraron los títulos vectoriales, expresados como copias de genoma (GC/ml), mediante PCR instantánea (GeneAmp 7000 Applied Biosystem). Se produjeron los vectores de AAV en la TIGEM AAV Vector Core Facility (<http://www.tigem.it/core-facilities/adeno-associated-virus-aav-vector-core>).
40

Transfecciones y secreciones en células

Se mantuvieron células Hela y MEF con MPSIIIA en DMEM suplementado con 10 % de FBS y penicilina/estreptomina (medio de cultivo normal). Se transfectaron las células subconfluentes usando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) según los protocolos del fabricante. Un día después de la transfección, se reemplazó el medio por DMEM con 0,5 % de FBS. Dos días después de la transfección, se recogió el medio acondicionado y el sedimento para ensayos enzimáticos y análisis de transferencia Western.
45

Análisis de WB

Se añadió tampón de lisis 3xflag 1 x (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 200 mM, 1 % de Triton X100, EDTA 1 mM, HEPES 50 mM) a los sedimentos celulares. Se obtuvieron los lisados por incubación de los sedimentos celulares con tampón de lisis durante 1 hora en hielo. Se determinó la concentración de proteína usando el ensayo colorimétrico de Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se concentró el medio acondicionado en Vivaspin 500 (Sartorius) por centrifugación del medio a 13.000 rpm durante 7 min. Se revelaron las proteínas sulfamidasa con Flag por análisis de transferencia Western usando anticuerpos monoclonales conjugados con peroxidasa anti-FLAG M2 (A8592 Sigma-Aldrich) diluidos 1:1000 en leche al 5 %.
50

Inmunofluorescencia

- Se lavaron las células tres veces con PBS frío y se fijaron entonces con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 15 min. Se lavaron las células fijadas cuatro veces con PBS frío, se permeabilizaron con solución de bloqueo (0,1% de saponina y 10 % de FBS en PBS) durante 30 min y se inmunomarcaron con anticuerpo primario apropiado: anti-h-sulfamidasa de conejo (1:300, Sigma). Después de 4 lavados con PBS, se incubaron las células con el anticuerpo secundario anti-Alexa fluor488 de conejo conjugado (1:1000). Se lavaron entonces las células cuatro veces con PBS frío y se montaron en el medio de montaje Vectashield.

Pulso y seguimiento

- Para determinar las tasas de degradación de la enzima sulfamidasa, se radiomarcaron MEF con MPSIIIA transfectadas con diferentes constructos quiméricos con 30 $\mu\text{Ci}/10^6$ células de mezcla de [^{35}S]metionina:cisteína (EasyTag(TM) EXPRE35S35S Protein Labeling Mix, [^{35}S]; PerkinElmer) durante 30 minutos en medio exento de metionina:cisteína (Sigma) suplementado con suero fetal de ternero al 1 %. Después de un lavado extensivo, se mantuvieron las células en presencia de suero fetal de ternero al 5 % y se suplementaron con metionina y cisteína. Se recuperaron las células en diferentes puntos temporales y se lisaron usando tampón de lisis 3xflag. Se retiraron los lisados por centrifugación y se inmunoprecipitaron los sobrenadantes usando anticuerpo contra Flag conjugado con agarosa (gel de afinidad M2 anti-flag, A2220 Sigma-Aldrich). Después de un lavado extenso con tampón de lisis, se sometió el inmunoprecipitado a PAGE-SDS. Se expusieron los geles secados a una pantalla PhosphorImager y se cuantificaron con un sistema PhosphorImager.

Animales

- Se utilizaron ratones C57BL/6 mutantes homocigóticos (MPS-IIIa, -/-) y heterocigóticos (fenotípicamente normales +/-). Por consiguiente, el término "ratones normales" se usa para hacer referencia al fenotipo del ratón. Se realizaron los experimentos de acuerdo con las directrices del Comité de uso y cuidado animal del Hospital Cardarelli en Nápoles y autorizados por el Ministerio de sanidad italiano.

Inyección sistémica y recogida de tejidos

- Se crioanestesiaron ratones recién nacidos con MPS-IIIa y normales el día posnatal 0-1. Se suministraron los vectores por vía sistémica a través de la vena temporal (2×10^{11} partículas en 100 μl). Se inyectó a los ratones con MPSIIIA adultos (1 mes) a través de la vena caudal (2×10^{11} partículas en 100 μl). Se recogió el suero de los animales en diferentes puntos temporales después de la inyección para los ensayos enzimáticos. Para evaluar la transducción hepática y cerebral, se sacrificaron los animales en diferentes puntos temporales. Algunos de ellos se perfundieron/fijaron con paraformaldehído al 4 % (p/v) en PBS y se retiró entonces el hígado para tinción con GFP. Se sacrificaron los ratones restantes y se retiraron hígado y cerebro para medir la actividad de SGSH.

Ensayo de actividad de SGSH

Se midió la actividad de SGSH siguiendo los protocolos descritos en Fraldi *et al.*, *Hum Mol Gen* 2007).

Análisis de GFP

- Se sometieron tejidos hepáticos a un gradiente de sacarosa (de 10 a 30 %) y se incubaron durante una noche en sacarosa al 30 % a 4 °C. Finalmente, se embebieron los tejidos en matriz de imbibición OCT (Kalttek) y se congelaron instantáneamente en un baño de hielo seco y etanol. Se cortaron crio secciones de tejido de 10 μm de grosor, se lavaron con PBS durante 10 min, se montaron en medio de montaje Vectashield y se procesaron para análisis de GFP.

Resultados

La meta del proyecto era desarrollar una estrategia de terapia génica sistémica poco invasiva basada en la inyección intravenosa de AAV de serotipo 8. Este serotipo exhibe alto tropismo por el hígado (18-20) y puede usarse para el suministro de un gen genomanipulado que codifica una sulfamidasa modificada quimérica (i) para secretarse en gran medida por el hígado, alcanzando por tanto altos niveles de enzima en circulación en la corriente sanguínea. La sulfamidasa se secreta poco respecto a otras enzimas sulfatasas tales como iduronato-2-sulfatasa (IDS). Se reemplazó el péptido señal de sulfamidasa por el de IDS o α -antitripsina humana (AAT), una enzima altamente secretada; (ii) para cruzar eficazmente la BHE. La sulfamidasa quimérica se genomanipuló adicionalmente con un dominio de proteína orientado a cerebro específico, el dominio de unión (LDLR) de la apolipoproteína B (LDLR-BD de ApoB).

Resultados in vivo en ratones con MPS IIIA

La eficacia del nuevo tratamiento es estrictamente dependiente de la capacidad de transducción al hígado en gran medida por el transgén para secretar eficazmente en la corriente sanguínea la sulfamidasa, que cruzará entonces la BHE y se transducirá al cerebro mediante su secuencia diana cerebral. Por lo tanto, los niveles séricos de la enzima

terapéutica pueden representar un factor crítico en la determinación de la eficacia de la terapia. No se han realizado estudios previos para analizar la transducción hepática y los niveles sistémicos de SGSH tras el suministro génico sistémico de SGSH exógena en ratones con MPS-IIIa. Por tanto, se decidió investigar esta cuestión para producir datos preliminares útiles para diseñar una estrategia terapéutica eficaz.

El suministro de enzima terapéutica a ratones neonatos es una herramienta útil para prevenir la patología en ratones con MPS-IIIa. Se decidió entonces ensayar si la inyección sistémica mediada por AAV2/8 en recién nacidos con MPS-IIIa podía ser un enfoque factible para desarrollar la nueva estrategia terapéutica. Con esta meta, se inyectó en ratones recién nacidos con MPS-IIIa AAV2/8 que contenía la secuencia de codificación de sulfamidasa bajo el control de un promotor específico de hígado (globulina de hormona tiroidea, TBG) para orientarse específicamente al hígado y volverlo un órgano fabricante de la enzima terapéutica. Se inyectaron en los ratones a través de la vena temporal 1×10^{11} partículas víricas. Se establecieron tres grupos experimentales de ratones: ratones de control (ratones heterocigóticos; estos ratones exhiben un fenotipo normal) tratados con AAV2/8-TBG-GFP, ratones con MPS-IIIa tratados con AAV2/8-TBG-GFP y ratones con MPS-IIIa tratados con AAV2/8-TBG-SGSH.

Para ensayar la eficacia de la inyección, se analizó la fluorescencia de GFP en el hígado de ratones inyectados con GFP (ratones normales y con MPS-IIIa). La señal de GFP estaba presente en cualquier punto temporal temprano o tardío después de la inyección; sin embargo, se observó una disminución significativa de la señal de GFP en el hígado de ratones analizados en un punto temporal tardío después de la inyección (Fig. 1).

Se comprobó en los ratones con MPS-IIIa inyectados con AAV2/8-TBG-SGSH la actividad de SGSH en plasma y en hígado en diferentes puntos temporales después de la inyección (5, 8, 10, 14 días y 3, 4, 5 y 10 semanas). La actividad de SGSH en el plasma de ratones con MPS-IIIa tratados con AAV2/8-TBG-SGSH aumentaba durante el periodo de las dos primeras semanas después del tratamiento neonatal, y disminuía entonces a lo largo del tiempo alcanzando los niveles medidos en ratones de control con MPS-IIIa inyectados con GFP (Fig. 2A). El análisis de la actividad de SGSH en el hígado mostraba una tendencia similar a la observada en el plasma, detectándose mayores niveles de actividad en la primera semana después de la inyección (Fig. 2B).

Este estudio preliminar en ratones recién nacidos demostró que, aunque el hígado se transduce eficazmente mediante el suministro neonatal de sulfamidasa mediado por AAV2/8, la enzima está presente a bajos niveles (comparables a los ratones con MPS-IIIa inyectados con GFP de control) tanto en hígado como en suero después de 1 semana después de la inyección, haciendo a este enfoque impracticable para tratar el cerebro.

Para evaluar si la proliferación de hepatocitos durante el periodo después del tratamiento es responsable de la dilución hepática del vector después de la inyección neonatal, se practicó un nuevo estudio basado en el suministro sistémico (inyección en vena caudal) de SGSH mediado por AAV2/8 en ratones adultos (1,5 meses de edad), en que el hígado ha completado su crecimiento.

También en este estudio se establecieron tres grupos experimentales de ratones: ratones normales tratados con AAV2/8-TBG-GFP, ratones con MPS-IIIa tratados con AAV2/8-TBG-GFP y ratones con MPS-IIIa tratados con AAV2/8-TBG-SGSH. El análisis de la expresión de GFP en diferentes puntos temporales después del tratamiento (1 semana y 5 semanas después de la inyección) subrayó una expresión alta y estable del transgén en el hígado de ratones tratados adultos (Fig. 3).

Se comprobó también en los ratones con MPS-IIIa tratados la actividad de SGSH en hígado y suero en diferentes puntos temporales (1 semana, 2, 3, 4, 5 semanas) después del tratamiento. En el hígado de ratones con MPS-IIIa inyectados con AAV2/8-TBG-SGSH se observó un fuerte aumento de actividad de SGSH en comparación con la baja actividad enzimática en los animales inyectados con el vector de GFP, y esta actividad permanecía estable hasta 5 semanas después de la inyección (el último punto temporal analizado) (Fig. 4A). También el análisis de la actividad de SGSH en el suero de ratones tratados era muy alto y estable durante todo el periodo después de la inyección analizado (Fig. 4B). De forma importante, este tratamiento no daba como resultado ninguna actividad sulfamidasa detectable en el cerebro de ratones con MPS-IIIa inyectados con AAV2/8 (no mostrado).

En conclusión, estos estudios preliminares muestran que: (i) el hígado se transduce en gran medida mediante inyección sistémica mediada por AAV2/8; (ii) la disminución de la actividad de SGSH en ratones recién nacidos tratados era debida a la dilución del vector en el hígado y permite considerar a los ratones adultos como un buen modelo para ensayar el tratamiento sistémico con AAV2/8 que contenía la sulfamidasa quimérica; (iii) la sulfamidasa secretada (no modificada) no daba como resultado una actividad enzimática detectable en el cerebro. Esto último es un resultado esperado y justifica además el fundamento detrás de la meta del proyecto.

Construcción y validación de las proteínas sulfamidasa quiméricas

Para aumentar la secreción de sulfamidasa del hígado y por tanto la cantidad de enzima en la corriente sanguínea disponible para orientar específicamente al cerebro, se genomanipuló la sulfamidasa reemplazando su propio péptido señal (SP) por uno alternativo. Se han ensayado dos péptidos señal, el péptido señal de iduronato-2-sulfatasa (IDS) y el péptido señal de α -antitripsina humana (AAT) (Fig. 5). El fundamento detrás del uso de estos dos péptidos señal es que la IDS es una enzima lisosómica que se ha demostrado que se secreta a altos niveles en el

hígado [21], mientras que la AAT es una enzima altamente secretada. El objetivo final del proyecto es producir una sulfamidasa modificada capaz de cruzar la BHE y orientarse al SNC a través de transcitosis mediada por receptor (Fig. 6). Por esta razón, antes de empezar los experimentos dirigidos a evaluar la eficacia terapéutica del SP sustituyente en SGSSH, se genomanipuló adicionalmente la SGSH modificada con un dominio de proteína orientado a cerebro específico, el dominio de unión a receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) de la apolipoproteína B (LDLR-BD de ApoB). El dominio de unión de ApoB permitirá a la sulfamidasa alcanzar las células cerebrales al unirse a receptores de LDL, que son abundantes en las células endoteliales de la BHE (Fig. 6). Los dos constructos de sulfamidas genomanipuladas finales contienen en el extremo C el LDLR-BD de ApoB y en el extremo N un péptido señal de IDS o hAAT (IDSsp-SGSHflag-ApoB y hAATsp-SGSHflag-ApoB) (Fig. 5).

Para evaluar la funcionalidad de las proteínas sulfamidasa quiméricas, se transfectaron células MEF con MPSIIIA con proteína sulfamidasa genomanipulada parcial o final y se compararon los resultados clínicos con los resultantes de las transfecciones con sulfamidasa no genomanipulada. Sorprendentemente, se observó que la actividad de SGSH en el sedimento y en el medio acondicionado era mayor en las células transfectadas con los constructos quiméricos finales en comparación con la actividad medida en las células transfectadas con los demás constructos, indicando que la sulfamidasa genomanipulada final se secretaba eficazmente (Fig. 7A). Es más, estos resultados se asociaban con una mayor eficacia de secreción de las enzimas sulfamidasa genomanipuladas finales con respecto a la sulfamidasa no genomanipulada (Fig. 7B). Sin embargo, esta eficacia de secreción era similar a la medida después de la transfección de sulfamidasa parcialmente quimérica (que contiene solo el péptido señal alternativo) (Fig. 7B). Notablemente, se observó que las modificaciones de la sulfamidasa, en particular aquellas presentes en la sulfamidasa genomanipulada final, confieren a las proteínas quiméricas una mayor estabilidad en comparación con la sulfamidasa no genomanipulada (Fig. 8A y B). Por tanto, se concluyó que el aumento en los niveles de proteína sulfamidasa en el medio de células transfectadas con proteínas sulfamidasa genomanipuladas era debido tanto a una eficacia aumentada de secreción como a una estabilidad aumentada de la sulfamidasa genomanipulada.

Además, la inmunotinción con anticuerpos anti-SGSH mostraba una localización de tipo lisosómica para ambos constructos genomanipulados parcial y final (Fig. 8C).

En conclusión, estos resultados demuestran que: (i) las enzimas sulfamidasa quiméricas que contienen el péptido señal alternativo son funcionales y activas; (ii) son más estables con respecto a la sulfamidasa no modificada; (iii) se secretan con eficacia aumentada en comparación con la sulfamidasa no modificada; (iv) la introducción de LDLR-BD de ApoB para producir la sulfamidasa genomanipulada final no afectaba a la funcionalidad ni a la eficacia de secreción aumentada observadas en las células transfectadas con la sulfamidasa genomanipulada parcial. Además, los constructos genomanipulados finales parecen ser más estables en comparación con los constructos genomanipulados parciales.

Resultados in vivo en ratones con MPS IIIA inyectados con sulfamidasa genomanipulada final

Se produjeron vectores AAV2/8 que contenían una de las sulfamidasa genomanipuladas finales (hAATsp-SGSHflag-ApoB) bajo el promotor TBG específico del hígado. Se obtuvieron resultados muy preliminares pero extremadamente alentadores en ratones con MPS-IIIA inyectados con este vector vírico. Se inyectó sistémicamente en ratones adultos con MPS-IIIA AAV2/8-TBG-hAATsp-SGSHflag-ApoB. Se inyectó también en un grupo de ratones con MPS-IIIA AAV2/8-TBG-SGSH (que contiene la sulfamidasa no modificada) como control. Se sacrificaron los ratones un mes después de la inyección. En los ratones inyectados con la sulfamidasa de control, se observó una mayor actividad hepática de sulfamidasa y un aumento muy fuerte de la secreción de sulfamidasa respecto a los ratones de control (Fig. 9). Además, se detectó un aumento significativo de la actividad de SGSH en el cerebro de ratones inyectados con la sulfamidasa quimérica (Fig. 9).

Uso de otros vectores

Se completó la producción de los vectores AAV2/8 que contienen todas las proteínas sulfamidasa genomanipuladas (parciales y finales). Específicamente, aparte de AAV2/8-TBG-hAATsp-SGSHflag-ApoB, se produjeron ahora AAV2/8-TBG-hIDSsp-SGSHflag-ApoB; AAV2/8-TBG-hAATsp-SGSHflag y AAV2/8-TBG-hIDSsp-SGSHflag.

Estos vectores pueden usarse para practicar un estudio *in vivo* grande mediante el siguiente procedimiento: Se inyectan en ratones con MPS-IIIA (1 mes de edad) (a través de una vía de administración en vena caudal) vectores AAV2/8 que contienen los constructos genomanipulados para ensayar la eficacia clínica de las enzimas sulfamidasa quiméricas. Los resultados son útiles para evaluar (i) la eficacia de la transducción del SNC y (iii) la recuperación de la patología del SNC en los ratones tratados.

Bibliografía

1. Muenzer, J. (2004) The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr*, **144**, S27-34.
2. Bhaumik, M., Muller, V.J., Rozaklis, T., Johnson, L., Dobrenis, K., Bhattacharyya, R., Wurzelmann, S., Finamore, P., Hopwood, J.J., Walkley, S.U. *et al.* (1999) "A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome)". *Glycobiology*, **9**, 1389-96.

3. Bhattacharyya, R., Gliddon, B., Beccari, T., Hopwood, J.J. y Stanley, P. (2001) "A novel missense mutation in lysosomal sulfamidase is the basis of MPS III A in a spontaneous mouse mutant". *Glycobiology*, **11**, 99-103.
4. Hemsley, KM. y Hopwood, J.J. (2005) "Development of motor deficits in a murine model of mucopolysaccharidosis type IIIA (MPS-IIIA)". *Behav Brain Res*, **158**, 191-9.
- 5 5. Savas, P.S., Hemsley, KM. y Hopwood, J.J. (2004) "Intracerebral injection of sulfamidase delays neuropathology in murine MPS-IIIA" *Mol Genet Metab*, **82**, 273-85.
6. Hemsley, KM., King, B. y Hopwood, J.J. (2007) "Injection of recombinant human sulfamidase into the CSF via the cerebellomedullary cistern in MPS IIIA mice". *Mol Genet Metab*, **90**, 313-28.
- 10 7. Fraldi, A, Hemsley, K, Crawley, A, Lombardi, A, Lau, A, Sutherland, L., Auricchio, A, Ballabio, A y Hopwood, J.J. (2007) "Functional correction of CNS lesions in an MPS-IIIA mouse model by intracerebral AAV-mediated delivery of sulfamidase and SUMF1 genes". *Hum Mol Genet*, **16**, 2693-702.
8. Pardridge, W.M. (2002) "Drug and gene delivery to the brain: the vascular route". *Neuron*, **36**, 555-8.
9. Pardridge, W.M. (2005) "Molecular biology of the blood-brain barrier". *Mol Biotechnol*, **30**, 57-70.
- 15 10. Brady, R.O. y Schiffmann, R. (2004) "Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders". *Lancet Neurol*, **3**, 752-6.
11. Gliddon, B.L. y Hopwood, J.J. (2004) "Enzyme-replacement therapy from birth delays the development of behavior and learning problems in mucopolysaccharidosis type IIIA mice". *Pediatr Res*, **56**, 65-72.
12. Urayama, A, Grubb, JH., Sly, W.S. y Banks, W.A (2008) "Mannose 6-phosphate receptor-mediated transport of sulfamidase across the blood-brain barrier in the newborn mouse". *Mol Ther*, **16**, 1261-6.
- 20 13. Pardridge, W.M. (2002) "Targeting neurotherapeutic agents through the bloodbrain barrier". *Arch Neurol*, **59**, 35-40.
14. Brown, M.S. y Goldstein, J.L., (1986) "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis". *Science*, **232**, 34-47.
- 25 15. Stefansson, S., Chappell, D.A, Argraves, KM., Strickland, D.K y Argraves, W.S. (1995) "Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptor-related protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100". *J Biol Chem*, **270**, 19417-21.
16. Boren, J., Lee, I., Zhu, W., Arnold, K., Taylor, S. e Innerarity, T.L. (1998) "Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100". *J Clin Invest*, **101**, 1084-93.
- 30 17. Spencer, B.J. y Verma, I.M. (2007) "Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier". *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 7594-9.
18. Cheng, S.H. y Smith, AE. (2003) "Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders". *Gene Ther*, **10**, 1275-81.
- 35 19. Gao, G.P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J. y Wilson, J.M. (2002) "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy". *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 11854-9.
20. Wang, L., Takabe, K, Bidlingmaier, S.M., III, C.R. y Verma, I.M. (1999) "Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy". *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 3906-10.
21. Cardone, M., et al., "Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery". *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(7): pág. 1225-36.

40 **Listado de secuencias**

<110> Fondazione Telethon

<120> ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA TRATAR PATOLOGÍAS DEL SNC EN MUCOPOLISACARIDOSIS

45 <130> PCT 110954

<160> 35

50 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 661 967 T3

```

<210> 1
<211> 72
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(72)
10
<400> 1

atg ccg tct tct gtc tcg tgg ggc atc ctc ctg ctg gca ggc ctg tgc      48
Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys
1                               5                               10                               15

tgc ctg gtc cct gtc tcc ctg gct      72
Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala
                               20

15 <210> 2
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 2

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
                               20

25 <210> 3
<211> 75
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
30 <221> CDS
<222> (1)..(75)

<400> 3

atg ccg cca ccc cgg acc ggc cga ggc ctt ctc tgg ctg ggt ctg gtt      48
Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
1                               5                               10                               15

ctg agc tcc gtc tgc gtc gcc ctc gga      75
Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly
                               20                               25

35

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
40 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
1                               5                               10                               15

Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly
                               20                               25

45
<210> 5
<211> 75

```

ES 2 661 967 T3

```

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
5 <221> CDS
  <222> (1)..(75)

  <400> 5

    atg ccc ccg ccc cgc acc ggc cgc ggc ctg ctg tgg ctg ggc ctg gtg      48
    Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
    1          5          10          15

    ctg agc agc gtg tgc gtg gcc ctg ggc      75
    Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly
    10          20          25

  <210> 6
  <211> 25
  <212> PRT
15 <213> Homo sapiens

  <400> 6

    Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
    1          5          10          15

    Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly
    20          25

20 <210> 7
  <211> 1509
  <212> ADN
  <213> Homo sapiens

25 <220>
  <221> CDS
  <222> (1)..(1509)

30 <400> 7

    atg agc tgc ccc gtg ccc gcc tgc tgc gcg ctg ctg cta gtc ctg ggg      48
    Met Ser Cys Pro Val Pro Ala Cys Cys Ala Leu Leu Leu Val Leu Gly
    1          5          10          15

    ctc tgc cgg gcg cgt ccc cgg aac gca ctg ctg ctc ctc gcg gat gac      96
    Leu Cys Arg Ala Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp
    20          25          30

    gga ggc ttt gag agt ggc gcg tac aac aac agc gcc atc gcc acc ccg      144

```

ES 2 661 967 T3

Gly	Gly	Phe	Glu	Ser	Gly	Ala	Tyr	Asn	Asn	Ser	Ala	Ile	Ala	Thr	Pro	
		35					40					45				
cac	ctg	gac	gcc	tgt	gcc	cgc	cgc	agc	ctc	ctc	ttt	cgc	aat	gcc	ttc	192
His	Leu	Asp	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Ser	Leu	Leu	Phe	Arg	Asn	Ala	Phe	
	50					55					60					
acc	tcg	gtc	agc	agc	tgc	tct	ccc	agc	cgc	gcc	agc	ctc	ctc	act	ggc	240
Thr	Ser	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Pro	Ser	Arg	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Gly	
65					70					75					80	
ctg	ccc	cag	cat	cag	aat	ggg	atg	tac	ggg	ctg	cac	cag	gac	gtg	cac	288
Leu	Pro	Gln	His	Gln	Asn	Gly	Met	Tyr	Gly	Leu	His	Gln	Asp	Val	His	
				85					90					95		
cac	ttc	aac	tcc	ttc	gac	aag	gtg	cgg	agc	ctg	ccg	ctg	ctg	ctc	agc	336
His	Phe	Asn	Ser	Phe	Asp	Lys	Val	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Ser	
			100					105					110			
caa	gct	ggc	gtg	cgc	aca	ggc	atc	atc	ggg	aag	aag	cac	gtg	ggg	ccg	384
Gln	Ala	Gly	Val	Arg	Thr	Gly	Ile	Ile	Gly	Lys	Lys	His	Val	Gly	Pro	
		115				120						125				
gag	acc	gtg	tac	ccg	ttt	gac	ttt	cgc	tac	acg	gag	gag	aat	ggc	tcc	432
Glu	Thr	Val	Tyr	Pro	Phe	Asp	Phe	Ala	Tyr	Thr	Glu	Glu	Asn	Gly	Ser	
	130					135					140					
gtc	ctc	cag	gtg	ggg	cgg	aac	atc	act	aga	att	aag	ctg	ctc	gtc	cgg	480
Val	Leu	Gln	Val	Gly	Arg	Asn	Ile	Thr	Arg	Ile	Lys	Leu	Leu	Val	Arg	
145				150						155					160	
aaa	ttc	ctg	cag	act	cag	gat	gac	cgg	cct	ttc	ttc	ctc	tac	gtc	gcc	528
Lys	Phe	Leu	Gln	Thr	Gln	Asp	Asp	Arg	Pro	Phe	Phe	Leu	Tyr	Val	Ala	
				165					170					175		
ttc	cac	gac	ccc	cac	cgc	tgt	ggg	cac	tcc	cag	ccc	cag	tac	gga	acc	576
Phe	His	Asp	Pro	His	Arg	Cys	Gly	His	Ser	Gln	Pro	Gln	Tyr	Gly	Thr	
			180					185					190			
ttc	tgt	gag	aag	ttt	ggc	aac	gga	gag	agc	ggc	atg	ggc	cgt	atc	cca	624
Phe	Cys	Glu	Lys	Phe	Gly	Asn	Gly	Glu	Ser	Gly	Met	Gly	Arg	Ile	Pro	
		195					200					205				
gac	tgg	acc	ccc	cag	gcc	tac	gac	cca	ctg	gac	gtg	ctg	gtg	cct	tac	672
Asp	Trp	Thr	Pro	Gln	Ala	Tyr	Asp	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Val	Pro	Tyr	
	210					215					220					
ttc	gtc	ccc	aac	acc	ccg	gca	gcc	cga	gcc	gac	ctg	gcc	gct	cag	tac	720
Phe	Val	Pro	Asn	Thr	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala	Gln	Tyr	
					230				235					240		
acc	acc	gtc	ggc	cgc	atg	gac	caa	gga	gtt	gga	ctg	gtg	ctc	cag	gag	768
Thr	Thr	Val	Gly	Arg	Met	Asp	Gln	Gly	Val	Gly	Leu	Val	Leu	Gln	Glu	
			245					250						255		
ctg	cgt	gac	gcc	ggc	gtc	ctg	aac	gac	aca	ctg	gtg	atc	ttc	acg	tcc	816
Leu	Arg	Asp	Ala	Gly	Val	Leu	Asn	Asp	Thr	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Ser	
			260					265					270			
gac	aac	ggg	atc	ccc	ttc	ccc	agc	ggc	agg	acc	aac	ctg	tac	tgg	ccg	864
Asp	Asn	Gly	Ile	Pro	Phe	Pro	Ser	Gly	Arg	Thr	Asn	Leu	Tyr	Trp	Pro	
		275					280					285				
ggc	act	gct	gaa	ccc	tta	ctg	gtg	tca	tcc	ccg	gag	cac	cca	aaa	cgc	912
Gly	Thr	Ala	Glu	Pro	Leu	Leu	Val	Ser	Ser	Pro	Glu	His	Pro	Lys	Arg	
	290					295					300					
tgg	ggc	caa	gtc	agc	gag	gcc	tac	gtg	agc	ctc	cta	gac	ctc	acg	ccc	960
Trp	Gly	Gln	Val	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Ser	Leu	Leu	Asp	Leu	Thr	Pro	

ES 2 661 967 T3

305		310		315		320	
acc atc ttg gat tgg ttc tcg atc ccg tac ccc agc tac gcc atc ttt							1008
Thr Ile Leu Asp Trp 325		Phe Ser Ile Pro Tyr 330		Pro Ser Tyr Ala Ile 335		Phe	
ggc tcg aag acc atc cac ctc act ggc cgg tcc ctc ctg ccg gcg ctg							1056
Gly Ser Lys Thr 340		Ile His Leu Thr Gly 345		Arg Ser Leu Leu Pro 350		Ala Leu	
gag gcc gag ccc ctc tgg gcc acc gtc ttt ggc agc cag agc cac cac							1104
Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr 360		Val Phe Gly Ser Gln Ser His His					
gag gtc acc atg tcc tac ccc atg cgc tcc gtg cag cac cgg cac ttc							1152
Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro 375		Met Arg Ser Val Gln His Arg His Phe					
cgc ctc gtg cac aac ctc aac ttc aag atg ccc ttt ccc atc gac cag							1200
Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro 395		Phe Pro Ile Asp Gln 400					
gac ttc tac gtc tca ccc acc ttc cag gac ctc ctg aac cgc acc aca							1248
Asp Phe Tyr Val Ser 405		Pro Thr Phe Gln Asp 410		Leu Leu Asn Arg Thr 415		Thr	
gct ggt cag ccc acg ggc tgg tac aag gac ctc cgt cat tac tac tac							1296
Ala Gly Gln Pro 420		Thr Gly Trp Tyr Lys Asp 425		Leu Arg His Tyr 430		Tyr	
cgg gcg cgc tgg gag ctc tac gac cgg agc cgg gac ccc cac gag acc							1344
Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp 440		Arg Ser Arg Asp Pro 445		His Glu Thr			
cag aac ctg gcc acc gac ccg cgc ttt gct cag ctt ctg gag atg ctt							1392
Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro 455		Arg Phe Ala Gln Leu 460		Leu Leu Glu Met Leu			
cgg gac cag ctg gcc aag tgg cag tgg gag acc cac gac ccc tgg gtg							1440
Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr 475		His Asp Pro Trp Val 480					
tgc gcc ccc gac ggc gtc ctg gag gag aag ctc tct ccc cag tgc cag							1488
Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys 490		Leu Ser Pro Gln Cys 495		Gln			
ccc ctc cac aat gag ctg tga							1509
Pro Leu His Asn Glu Leu 500							

<210> 8

<211> 502

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Leu Cys Arg Ala Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu Leu Ala Asp Asp
20 25 30

Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala Ile Ala Thr Pro
35 40 45

10

ES 2 661 967 T3

His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe Arg Asn Ala Phe
 50 55 60
 Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser Leu Leu Thr Gly
 65 70 75 80
 Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu His Gln Asp Val His
 85 90 95
 His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro Leu Leu Ser
 100 105 110
 Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys His Val Gly Pro
 115 120 125
 Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu Glu Asn Gly Ser
 130 135 140
 Val Leu Gln Val Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile Lys Leu Leu Val Arg
 145 150 155 160
 Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Val Ala
 165 170 175
 Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gln Pro Gln Tyr Gly Thr
 180 185 190
 Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met Gly Arg Ile Pro
 195 200 205
 Asp Trp Thr Pro Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val Leu Val Pro Tyr
 210 215 220
 Phe Val Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu Ala Ala Gln Tyr
 225 230 235 240
 Thr Thr Val Gly Arg Met Asp Gln Gly Val Gly Leu Val Leu Gln Glu
 245 250 255
 Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val Ile Phe Thr Ser
 260 265 270
 Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn Leu Tyr Trp Pro
 275 280 285
 Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu His Pro Lys Arg
 290 295 300
 Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu Asp Leu Thr Pro
 305 310 315 320

ES 2 661 967 T3

Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro Ser Tyr Ala Ile Phe
325 330 335

Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser Leu Leu Pro Ala Leu
340 345 350

Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser Gln Ser His His
355 360 365

Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gln His Arg His Phe
370 375 380

Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe Pro Ile Asp Gln
385 390 395 400

Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu Leu Asn Arg Thr Thr
405 410 415

Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg His Tyr Tyr Tyr
420 425 430

Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp Pro His Glu Thr
435 440 445

Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu Leu Glu Met Leu
450 455 460

Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His Asp Pro Trp Val
465 470 475 480

Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser Pro Gln Cys Gln
485 490 495

Pro Leu His Asn Glu Leu
500

<210> 9
<211> 114
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(114)

<400> 9

tct gtc att gat gca ctg cag tac aaa tta gag ggc acc aca aga ttg 48
Ser Val Ile Asp Ala Leu Gln Tyr Lys Leu Glu Gly Thr Thr Arg Leu
1 5 10 15

aca aga aaa agg gga ttg aag tta gcc aca gct ctg tct ctg agc aac 96
Thr Arg Lys Arg Gly Leu Lys Leu Ala Thr Ala Leu Ser Leu Ser Asn
20 25 30

aaa ttt gtg gag ggt agt 114
Lys Phe Val Glu Gly Ser
35

<210> 10
20 <211> 38
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 661 967 T3

<400> 10

Ser Val Ile Asp Ala Leu Gln Tyr Lys Leu Glu Gly Thr Thr Arg Leu
1 5 10 15

Thr Arg Lys Arg Gly Leu Lys Leu Ala Thr Ala Leu Ser Leu Ser Asn
20 25 30

Lys Phe Val Glu Gly Ser
35

5 <210> 11
<211> 1611
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia química

<220>
<221> CDS
15 <222> (1)..(1611)

<400> 11

atg ccg tct tct gtc tcg tgg ggc atc ctc ctg ctg gca ggc ctg tgc 48
Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys
1 5 10 15

tgc ctg gtc cct gtc tcc ctg gct cgt ccc cgg aac gca ctg ctg ctc 96
Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu
20 25 30

ctc gcg gat gac gga ggc ttt gag agt ggc gcg tac aac aac agc gcc 144
Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala
35 40 45

atc gcc acc ccg cac ctg gac gcc ttg gcc cgc cgc agc ctc ctc ttt 192
Ile Ala Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe
50 55 60

cgc aat gcc ttc acc tcg gtc agc agc tgc tct ccc agc cgc gcc agc 240
Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser
65 70 75 80

ctc ctc act ggc ctg ccc cag cat cag aat ggg atg tac ggg ctg cac 288
Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu His
85 90 95

cag gac gtg cac cac ttc aac tcc ttc gac aag gtg cgg agc ctg ccg 336
Gln Asp Val His His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro
100 105 110

ctg ctg ctc agc caa gct ggt gtg cgc aca ggc atc atc ggg aag aag 384
Leu Leu Leu Ser Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys
115 120 125

cac gtg ggg ccg gag acc gtg tac ccg ttt gac _ ttt gcg tac acg gag 432

20

ES 2 661 967 T3

His 130	Val	Gly	Pro	Glu	Thr	Val 135	Tyr	Pro	Phe	Asp	Phe 140	Ala	Tyr	Thr	Glu	
gag Glu 145	aat Asn	ggc Gly	tcc Ser	gtc Val	ctc Leu 150	cag Gln	gtg Val	ggg Gly	cgg Arg	aac Asn 155	atc Ile	act Thr	aga Arg	att Ile	aag Lys 160	480
ctg Leu	ctc Leu	gtc Val	cgg Arg	aaa Lys 165	ttc Phe	ctg Leu	cag Gln	act Thr	cag Gln 170	gat Asp	gac Asp	cgg Arg	cct Pro	ttc Phe 175	ttc Phe	528
ctc Leu	tac Tyr	gtc Val	gcc Ala 180	ttc Phe	cac His	gac Asp	ccc Pro	cac His 185	cgc Arg	tgt Cys	ggg Gly	cac His	tcc Ser 190	caa Gln	ccc Pro	576
cag Gln	tac Tyr	gga Gly 195	acc Thr	ttc Phe	tgt Cys	gag Glu	aag Lys 200	ttt Phe	ggc Gly	aac Asn	gga Gly 205	gag Glu 205	agc Ser	ggc Gly	atg Met	624
ggg Gly 210	cgt Arg	atc Ile	cca Pro	gac Asp	tgg Trp	acc Thr 215	ccc Pro	cag Gln	gcc Ala	tac Tyr	gac Asp 220	cca Pro	ctg Leu	gac Asp	gtg Val	672
ctg Leu 225	gtg Val	cct Pro	tac Tyr	ttc Phe	gtc Val 230	ccc Pro	aac Asn	acc Thr	ccg Pro	gca Ala 235	gcc Ala	cga Arg	gcc Ala	gac Asp	ctg Leu 240	720
gcc Ala	gct Ala	cag Gln	tac Tyr	acc Thr 245	acc Thr	gtc Val	ggc Gly	cgc Arg	atg Met 250	gac Asp	caa Gln	gga Gly	gtt Val	gga Gly 255	ctg Leu	768
gtg Val	ctc Leu	cag Gln	gag Glu 260	ctg Leu	cgt Arg	gac Asp	gcc Ala	ggg Gly 265	gtc Val	ctg Leu	aac Asn	gac Asp	aca Thr 270	ctg Leu	gtg Val	816
atc Ile	ttc Phe	acg Thr 275	tcc Ser	gac Asp	aac Asn	ggg Gly	atc Ile 280	ccc Pro	ttc Phe	ccc Pro	agc Ser	ggc Gly 285	agg Arg	acc Thr	aac Asn	864
ctg Leu 290	tac Tyr	tgg Trp	ccg Pro	ggc Gly	act Thr	gct Ala 295	gaa Glu	ccc Pro	tta Leu	ctg Leu	gtg Val 300	tca Ser	tcc Ser	ccg Pro	gag Glu	912
cac His 305	cca Pro	aaa Lys	cgc Arg	tgg Trp	ggc Gly 310	caa Gln	gtc Val	agc Ser	gag Glu	gcc Ala 315	tac Tyr	gtg Val	agc Ser	ctc Leu	cta Leu 320	960
gac Asp	ctc Leu	acg Thr	ccc Pro	acc Thr 325	atc Ile	ttg Leu	gat Asp	tgg Trp	ttc Phe 330	tcg Ser	atc Ile	ccg Pro	tac Tyr	ccc Pro 335	agc Ser	1008
tac Tyr	gcc Ala	atc Ile	ttt Phe 340	ggc Gly	tcg Ser	aag Lys	acc Thr	atc Ile 345	cac His	ctc Leu	act Thr	ggc Gly 350	cgg Arg	tcc Ser	ctc Leu	1056
ctg Leu	ccg Pro	gcg Ala 355	ctg Leu	gag Glu	gcc Ala	gag Glu	ccc Pro 360	ctc Leu	tgg Trp	gcc Ala	acc Thr	gtc Val 365	ttt Phe	ggc Gly	agc Ser	1104
cag Gln 370	agc Ser	cac His	cac His	gag Glu	gtc Val	acc Thr 375	atg Met	tcc Ser	tac Tyr	ccc Pro	atg Met 380	cgc Arg	tcc Ser	gtg Val	cag Gln	1152
cac His 385	cgg Arg	cac His	ttc Phe	cgc Arg	ctc Leu 390	gtg Val	cac His	aac Asn	ctc Leu	aac Asn 395	ttc Phe	aag Lys	atg Met	ccc Pro	ttt Phe 400	1200
ccc Pro	atc Ile	gac Asp	cag Gln	gac Asp	ttc Phe	tac Tyr	gtc Val	tca Ser	ccc Pro	acc Thr	ttc Phe	cag Gln	gac Asp	ctc Leu	ctg Leu	1248

ES 2 661 967 T3

	405	410	415	
	aac cgc acc aca gct ggt cag ccc acg ggc tgg tac aag gac ctc cgt Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg 420 425 430			1296
	cat tac tac tac cgg gcg cgc tgg gag ctc tac gac cgg agc cgg gac His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp 435 440 445			1344
	ccc cac gag acc cag aac ctg gcc acc gac ccg cgc ttt gct cag ctt Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu 450 455 460			1392
	ctg gag atg ctt cgg gac cag ctg gcc aag tgg cag tgg gag acc cac Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His 465 470 475 480			1440
	gac ccc tgg gtg tgc gcc ccc gac ggc gtc ctg gag gag aag ctc tct Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser 485 490 495			1488
	ccc cag tgc cag ccc ctc cac aat gag ctg tca tct aga gga tcc cgg Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn Glu Leu Ser Ser Arg Gly Ser Arg 500 505 510			1536
	gct gac tac aaa gac cat gac ggt gat tat aaa gat cat gac atc gac Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp 515 520 525			1584
	tac aag gat gac gat gac aag tag tga Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys 530 535			1611

<210> 12
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 12

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	Arg	Pro	Arg	Asn	Ala	Leu	Leu	Leu
			20					25					30		
Leu	Ala	Asp	Asp	Gly	Gly	Phe	Glu	Ser	Gly	Ala	Tyr	Asn	Asn	Ser	Ala
		35					40					45			
Ile	Ala	Thr	Pro	His	Leu	Asp	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Ser	Leu	Leu	Phe
		50				55					60				
Arg	Asn	Ala	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Pro	Ser	Arg	Ala	Ser
65					70					75					80
Leu	Leu	Thr	Gly	Leu	Pro	Gln	His	Gln	Asn	Gly	Met	Tyr	Gly	Leu	His
				85					90					95	

ES 2 661 967 T3

Gln Asp Val His His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro
 100 105 110
 Leu Leu Leu Ser Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys
 115 120 125
 His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu
 130 135 140
 Glu Asn Gly Ser Val Leu Gln Val Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile Lys
 145 150 155 160
 Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe Phe
 165 170 175
 Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gln Pro
 180 185 190
 Gln Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met
 195 200 205
 Gly Arg Ile Pro Asp Trp Thr Pro Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val
 210 215 220
 Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu
 225 230 235 240
 Ala Ala Gln Tyr Thr Thr Val Gly Arg Met Asp Gln Gly Val Gly Leu
 245 250 255
 Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val
 260 265 270
 Ile Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn
 275 280 285
 Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu
 290 295 300
 His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu
 305 310 315 320
 Asp Leu Thr Pro Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro Ser
 325 330 335
 Tyr Ala Ile Phe Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser Leu
 340 345 350
 Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser
 355 360 365
 Gln Ser His His Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gln

ES 2 661 967 T3

370

375

380

His Arg His Phe Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe
385 390 395 400

Pro Ile Asp Gln Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu Leu
405 410 415

Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg
420 425 430

His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp
435 440 445

Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu
450 455 460

Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His
465 470 475 480

Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser
485 490 495

Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn Glu Leu Ser Ser Arg Gly Ser Arg
500 505 510

Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
515 520 525

Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
530 535

<210> 13

<211> 1614

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia química

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1614)

<400> 13

atg ccc ccg ccc cgc acc ggc cgc ggc ctg ctg tgg ctg ggc ctg gtg 48
Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
1 5 10 15

ctg agc agc gtg tgc gtg gcc ctg ggc cgt ccc cgg aac gca ctg ctg 96
Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu
20 25 30

ctc ctc gcg gat gac gga ggc ttt gag agt ggc gcg tac aac aac agc 144
Leu Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser
35 40 45

ES 2 661 967 T3

gcc Ala 50	atc Ile	gcc Ala	acc Thr	ccg Pro	cac His	ctg Leu 55	gac Asp	gcc Ala	ttg Leu	gcc Ala	cgc Arg 60	cgc Arg	agc Ser	ctc Leu	ctc Leu	192
ttt Phe 65	cgc Arg	aat Asn	gcc Ala	ttc Phe	acc Thr 70	tcg Ser	gtc Val	agc Ser	agc Ser	tgc Cys 75	tct Ser	ccc Pro	agc Ser	cgc Arg	gcc Ala 80	240
agc Ser	ctc Leu	ctc Leu	act Thr	ggc Gly 85	ctg Leu	ccc Pro	cag Gln	cat His	cag Gln 90	aat Asn	ggg Gly	atg Met	tac Tyr	ggg Gly 95	ctg Leu	288
cac His	cag Gln	gac Asp	gtg Val 100	cac His	cac His	ttc Phe	aac Asn	tcc Ser 105	ttc Phe	gac Asp	aag Lys	gtg Val	cgg Arg 110	agc Ser	ctg Leu	336
ccg Pro	ctg Leu	ctg Leu 115	ctc Leu	agc Ser	caa Gln	gct Ala	ggt Gly 120	gtg Val	cgc Arg	aca Thr	ggc Gly 125	atc Ile 125	atc Ile	ggg Gly	aag Lys	384
aag Lys	cac His 130	gtg Val	ggg Gly	ccg Pro	gag Glu	acc Thr 135	gtg Val	tac Tyr	ccg Pro	ttt Phe	gac Asp 140	ttt Phe	gcg Ala	tac Tyr	acg Thr	432
gag Glu 145	gag Glu	aat Asn	ggc Gly	tcc Ser	gtc Val 150	ctc Leu	cag Gln	gtg Val	ggg Gly 155	cgg Arg	aac Asn	atc Ile	act Thr	aga Arg	att Ile 160	480
aag Lys	ctg Leu	ctc Leu	gtc Val 165	cgg Arg	aaa Lys	ttc Phe	ctg Leu	cag Gln	act Thr 170	cag Gln	gat Asp	gac Asp	cgg Arg	cct Pro 175	ttc Phe	528
ttc Phe	ctc Leu	tac Tyr	gtc Val 180	gcc Ala	ttc Phe	cac His	gac Asp	ccc Pro 185	cac His	cgc Arg	tgt Cys	ggg Gly 190	cac His 190	tcc Ser	caa Gln	576
ccc Pro	cag Gln 195	tac Tyr	gga Gly	acc Thr	ttc Phe	tgt Cys	gag Glu 200	aag Lys	ttt Phe	ggc Gly	aac Asn	gga Gly 205	gag Glu	agc Ser	ggc Gly	624
atg Met 210	ggt Gly	cgt Arg	atc Ile	cca Pro	gac Asp	tgg Trp 215	acc Thr	ccc Pro	cag Gln	gcc Ala	tac Tyr 220	gac Asp	cca Pro	ctg Leu	gac Asp	672
gtg Val 225	ctg Leu	gtg Val	cct Pro	tac Tyr	ttc Phe 230	gtc Val	ccc Pro	aac Asn	acc Thr 235	ccg Pro	gca Ala	gcc Ala	cga Arg	gcc Ala	gac Asp 240	720
ctg Leu	gcc Ala	gct Ala	cag Gln	tac Tyr 245	acc Thr	acc Thr	gtc Val	ggc Gly	cgc Arg 250	atg Met	gac Asp	caa Gln	gga Gly	gtt Val 255	gga Gly	768
ctg Leu	gtg Val	ctc Leu	cag Gln 260	gag Glu	ctg Leu	cgt Arg	gac Asp	gcc Ala 265	ggt Gly	gtc Val	ctg Leu	aac Asn	gac Asp 270	aca Thr	ctg Leu	816
gtg Val	atc Ile	ttc Phe 275	acg Thr	tcc Ser	gac Asp	aac Asn	ggg Gly 280	atc Ile	ccc Pro	ttc Phe	ccc Pro	agc Ser 285	ggc Gly	agg Arg	acc Thr	864
aac Asn 290	ctg Leu	tac Tyr	tgg Trp	ccg Pro	ggc Gly	act Thr 295	gct Ala	gaa Glu	ccc Pro	tta Leu	ctg Leu 300	gtg Val	tca Ser	tcc Ser	ccg Pro	912
gag Glu 305	cac His	cca Pro	aaa Lys	cgc Arg	tgg Trp 310	ggc Gly	caa Gln	gtc Val	agc Ser	gag Glu 315	gcc Ala	tac Tyr	gtg Val	agc Ser	ctc Leu 320	960
cta	gac	ctc	acg	ccc	acc	atc	ttg	gat	tgg	ttc	tcg	atc	ccg	tac	ccc	1008

ES 2 661 967 T3

Leu	Asp	Leu	Thr	Pro	Thr	Ile	Leu	Asp	Trp	Phe	Ser	Ile	Pro	Tyr	Pro		
				325					330					335			
agc	tac	gcc	atc	ttt	ggc	tcg	aag	acc	atc	cac	ctc	act	ggc	cgg	tcc		1056
Ser	Tyr	Ala	Ile	Phe	Gly	Ser	Lys	Thr	Ile	His	Leu	Thr	Gly	Arg	Ser		
			340				345						350				
ctc	ctg	ccg	gcg	ctg	gag	gcc	gag	ccc	ctc	tgg	gcc	acc	gtc	ttt	ggc		1104
Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Pro	Leu	Trp	Ala	Thr	Val	Phe	Gly		
		355					360					365					
agc	cag	agc	cac	cac	gag	gtc	acc	atg	tcc	tac	ccc	atg	cgc	tcc	gtg		1152
Ser	Gln	Ser	His	His	Glu	Val	Thr	Met	Ser	Tyr	Pro	Met	Arg	Ser	Val		
	370					375					380						
cag	cac	cgg	cac	ttc	cgc	ctc	gtg	cac	aac	ctc	aac	ttc	aag	atg	ccc		1200
Gln	His	Arg	His	Phe	Arg	Leu	Val	His	Asn	Leu	Asn	Phe	Lys	Met	Pro		
	385				390					395					400		
ttt	ccc	atc	gac	cag	gac	ttc	tac	gtc	tca	ccc	acc	ttc	cag	gac	ctc		1248
Phe	Pro	Ile	Asp	Gln	Asp	Phe	Tyr	Val	Ser	Pro	Thr	Phe	Gln	Asp	Leu		
				405					410					415			
ctg	aac	cgc	acc	aca	gct	ggc	cag	ccc	acg	ggc	tgg	tac	aag	gac	ctc		1296
Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Ala	Gly	Gln	Pro	Thr	Gly	Trp	Tyr	Lys	Asp	Leu		
			420					425					430				
cgt	cat	tac	tac	tac	cgg	gcg	cgc	tgg	gag	ctc	tac	gac	cgg	agc	cgg		1344
Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Arg	Trp	Glu	Leu	Tyr	Asp	Arg	Ser	Arg		
		435					440					445					
gac	ccc	cac	gag	acc	cag	aac	ctg	gcc	acc	gac	ccg	cgc	ttt	gct	cag		1392
Asp	Pro	His	Glu	Thr	Gln	Asn	Leu	Ala	Thr	Asp	Pro	Arg	Phe	Ala	Gln		
	450					455					460						
ctt	ctg	gag	atg	ctt	cgg	gac	cag	ctg	gcc	aag	tgg	cag	tgg	gag	acc		1440
Leu	Leu	Glu	Met	Leu	Arg	Asp	Gln	Leu	Ala	Lys	Trp	Gln	Trp	Glu	Thr		
	465				470					475					480		
cac	gac	ccc	tgg	gtg	tgc	gcc	ccc	gac	ggc	gtc	ctg	gag	gag	aag	ctc		1488
His	Asp	Pro	Trp	Val	Cys	Ala	Pro	Asp	Gly	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu		
				485					490					495			
tct	ccc	cag	tgc	cag	ccc	cta	cac	aat	gag	ctc	tca	tct	aga	gga	tcc		1536
Ser	Pro	Gln	Cys	Gln	Pro	Leu	His	Asn	Glu	Leu	Ser	Ser	Arg	Gly	Ser		
			500					505					510				
cgg	gct	gac	tac	aaa	gac	cat	gac	ggc	gat	tat	aaa	gat	cat	gac	atc		1584
Arg	Ala	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Gly	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Ile		
		515					520					525					
gac	tac	aag	gat	gac	gat	gac	aag	tag	tga								1614
Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys										
	530					535											

<210> 14

<211> 536

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 14

Met	Pro	Pro	Pro	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Trp	Leu	Gly	Leu	Val
1				5					10					15	

ES 2 661 967 T3

Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu
 20 25 30
 Leu Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser
 35 40 45
 Ala Ile Ala Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu
 50 55 60
 Phe Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala
 65 70 75 80
 Ser Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu
 85 90 95
 His Gln Asp Val His His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu
 100 105 110
 Pro Leu Leu Leu Ser Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys
 115 120 125
 Lys His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr
 130 135 140
 Glu Glu Asn Gly Ser Val Leu Gln Val Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile
 145 150 155 160
 Lys Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe
 165 170 175
 Phe Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gln
 180 185 190
 Pro Gln Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly
 195 200 205
 Met Gly Arg Ile Pro Asp Trp Thr Pro Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp
 210 215 220
 Val Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp
 225 230 235 240
 Leu Ala Ala Gln Tyr Thr Thr Val Gly Arg Met Asp Gln Gly Val Gly
 245 250 255
 Leu Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu
 260 265 270
 Val Ile Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr
 275 280 285

ES 2 661 967 T3

Asn Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro
 290 295 300
 Glu His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu
 305 310 315 320
 Leu Asp Leu Thr Pro Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro
 325 330 335
 Ser Tyr Ala Ile Phe Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser
 340 345 350
 Leu Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly
 355 360 365
 Ser Gln Ser His His Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val
 370 375 380
 Gln His Arg His Phe Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro
 385 390 395 400
 Phe Pro Ile Asp Gln Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu
 405 410 415
 Leu Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu
 420 425 430
 Arg His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg
 435 440 445
 Asp Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln
 450 455 460
 Leu Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr
 465 470 475 480
 His Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu
 485 490 495
 Ser Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn Glu Leu Ser Ser Arg Gly Ser
 500 505 510
 Arg Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile
 515 520 525
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 530 535

<210> 15

<211> 1734

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia quimérica

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1734)

15 <400> 15

ES 2 661 967 T3

atg Met 1	ccg Pro	tct Ser	tct Ser	gtc Val 5	tcg Ser	tgg Trp	ggc Gly	atc Ile	ctc Leu 10	ctg Leu	ctg Leu	gca Ala	ggc Gly	ctg Leu 15	tgc Cys	48
tgc Cys	ctg Leu	gtc Val	cct Pro 20	gtc Val	tcc Ser	ctg Leu	gct Ala 25	cgt Arg	ccc Pro	cgg Arg	aac Asn	gca Ala	ctg Leu 30	ctg Leu	ctc Leu	96
ctc Leu	gcg Ala	gat Asp 35	gac Asp	gga Gly	ggc Gly	ttt Phe	gag Glu 40	agt Ser	ggc Gly	gcg Ala	tac Tyr	aac Asn 45	aac Asn	agc Ser	gcc Ala	144
atc Ile 50	gcc Ala	acc Thr	ccg Pro	cac His	ctg Leu	gac Asp 55	ggc Ala	ttg Leu	gcc Ala	cgc Arg	cgc Arg 60	agc Ser	ctc Leu	ctc Leu	ttt Phe	192
cgc Arg 65	aat Asn	gcc Ala	ttc Phe	acc Thr	tcg Ser 70	gtc Val	agc Ser	agc Ser	tgc Cys	tct Ser 75	ccc Pro	agc Ser	cgc Arg	gcc Ala	agc Ser 80	240
ctc Leu	ctc Leu	act Thr	ggc Gly	ctg Leu 85	ccc Pro	cag Gln	cat His	cag Gln	aat Asn 90	ggg Gly	atg Met	tac Tyr	ggg Gly	ctg Leu 95	cac His	288
cag Gln	gac Asp	gtg Val	cac His 100	cac His	ttc Phe	aac Asn	tcc Ser	ttc Phe 105	gac Asp	aag Lys	gtg Val	cgg Arg	agc Ser 110	ctg Leu	ccg Pro	336
ctg Leu	ctg Leu	ctc Leu 115	agc Ser	caa Gln	gct Ala	ggc Gly	gtg Val 120	cgc Arg	aca Thr	ggc Gly	atc Ile	atc Ile 125	ggg Gly	aag Lys	aag Lys	384
cac His 130	gtg Val	ggg Gly	ccg Pro	gag Glu	acc Thr	gtg Val 135	tac Tyr	ccg Pro	ttt Phe	gac Asp	ttt Phe 140	gcg Ala	tac Tyr	acg Thr	gag Glu	432
gag Glu 145	aat Asn	ggc Gly	tcc Ser	gtc Val	ctc Leu 150	cag Gln	gtg Val	ggg Gly	cgg Arg	aac Asn 155	atc Ile	act Thr	aga Arg	att Ile	aag Lys 160	480
ctg Leu	ctc Leu	gtc Val	cgg Arg	aaa Lys 165	ttc Phe	ctg Leu	cag Gln	act Thr	cag Gln 170	gat Asp	gac Asp	cgg Arg	cct Pro	ttc Phe 175	ttc Phe	528
ctc Leu	tac Tyr	gtc Val	gcc Ala 180	ttc Phe	cac His	gac Asp	ccc Pro	cac His 185	cgc Arg	tgt Cys	ggg Gly	cac His	tcc Ser 190	caa Gln	ccc Pro	576
cag Gln	tac Tyr	gga Gly 195	acc Thr	ttc Phe	tgt Cys	gag Glu	aag Lys 200	ttt Phe	ggc Gly	aac Asn	gga Gly 205	gag Glu	agc Ser	ggc Gly	atg Met	624
ggc Gly	cgt Arg 210	atc Ile	cca Pro	gac Asp	tgg Trp	acc Thr 215	ccc Pro	cag Gln	gcc Ala	tac Tyr	gac Asp 220	cca Pro	ctg Leu	gac Asp	gtg Val	672
ctg Leu 225	gtg Val	cct Pro	tac Tyr	ttc Phe	gtc Val 230	ccc Pro	aac Asn	acc Thr	ccg Pro	gca Ala 235	gcc Ala	cga Arg	gcc Ala	gac Asp	ctg Leu 240	720

ES 2 661 967 T3

gcc Ala	gct Ala	cag Gln	tac Tyr	acc Thr 245	acc Thr	gtc Val	ggc Gly	cgc Arg	atg Met 250	gac Asp	caa Gln	gga Gly	gtt Val	gga Gly 255	ctg Leu	768
gtg Val	ctc Leu	cag Gln	gag Glu 260	ctg Leu	cgt Arg	gac Asp	gcc Ala	ggg Gly 265	gtc Val	ctg Leu	aac Asn	gac Asp	aca Thr 270	ctg Leu	gtg Val	816
atc Ile	ttc Phe	acg Thr 275	tcc Ser	gac Asp	aac Asn	ggg Gly	atc Ile 280	ccc Pro	ttc Phe	ccc Pro	agc Ser	ggc Gly 285	agg Arg	acc Thr	aac Asn	864
ctg Leu	tac Tyr 290	tgg Trp	ccg Pro	ggc Gly	act Thr	gct Ala 295	gaa Glu	ccc Pro	tta Leu	ctg Leu	gtg Val 300	tca Ser	tcc Ser	ccg Pro	gag Glu	912
cac His 305	cca Pro	aaa Lys	cgc Arg	tgg Trp	ggc Gly 310	caa Gln	gtc Val	agc Ser	gag Glu	gcc Ala 315	tac Tyr	gtg Val	agc Ser	ctc Leu	cta Leu 320	960
gac Asp	ctc Leu	acg Thr	ccc Pro	acc Thr 325	atc Ile	ttg Leu	gat Asp	tgg Trp	ttc Phe 330	tgc Ser	atc Ile	ccg Pro	tac Tyr	ccc Pro 335	agc Ser	1008
tac Tyr	gcc Ala	atc Ile	ttt Phe 340	ggc Gly	tgc Ser	aag Lys	acc Thr	atc Ile 345	cac His	ctc Leu	act Thr	ggc Gly	cgg Arg 350	tcc Ser	ctc Leu	1056
ctg Leu	ccg Pro	gcg Ala 355	ctg Leu	gag Glu	gcc Ala	gag Glu	ccc Pro 360	ctc Leu	tgg Trp	gcc Ala	acc Thr	gtc Val 365	ttt Phe	ggc Gly	agc Ser	1104
cag Gln 370	agc Ser	cac His	cac His	gag Glu	gtc Val	acc Thr 375	atg Met	tct Ser	tac Tyr	ccc Pro	atg Met 380	cgc Arg	tcc Ser	gtg Val	cag Gln	1152
cac His 385	cgg Arg	cac His	ttc Phe	cgc Arg	ctc Leu 390	gtg Val	cac His	aac Asn	ctc Leu	aac Asn 395	ttc Phe	aag Lys	atg Met	ccc Pro	ttt Phe 400	1200
ccc Pro	atc Ile	gac Asp	cag Gln	gac Asp 405	ttc Phe	tac Tyr	gtc Val	tca Ser	ccc Pro 410	acc Thr	ttc Phe	cag Gln	gac Asp	ctc Leu 415	ctg Leu	1248
aac Asn	cgc Arg	acc Thr	aca Thr 420	gct Ala	ggg Gly	cag Gln	ccc Pro	acg Thr 425	ggc Gly	tgg Trp	tac Tyr	aag Lys	gac Asp 430	ctc Leu	cgt Arg	1296
cat His	tac Tyr 435	tac Tyr	tac Tyr	cgg Arg	gcg Ala	cgc Arg	tgg Trp 440	gag Glu	ctc Leu	tac Tyr	gac Asp	cgg Arg 445	agc Ser	cgg Arg	gac Asp	1344
ccc Pro	cac His 450	gag Glu	acc Thr	cag Gln	aac Asn	ctg Leu 455	gcc Ala	acc Thr	gac Asp	ccg Pro	cgc Arg 460	ttt Phe	gct Ala	cag Gln	ctt Leu	1392
ctg Leu 465	gag Glu	atg Met	ctt Leu	cgg Arg	gac Asp 470	cag Gln	ctg Leu	gcc Ala	aag Lys	tgg Trp 475	cag Gln	tgg Trp	gag Glu	acc Thr	cac His 480	1440
gac Asp	ccc Pro	tgg Trp	gtg Val	tgc Cys 485	gcc Ala	ccc Pro	gac Asp	ggc Gly	gtc Val 490	ctg Leu	gag Glu	gag Glu	aag Lys	ctc Leu 495	tct Ser	1488
ccc Pro	cag Gln	tgc Cys	cag Gln 500	ccc Pro	ctc Leu	cac His	aat Asn	gag Glu 505	ctg Leu	tca Ser	tct Ser	aga Arg	gga Gly 510	tcc Ser	cgg Arg	1536
gct Gly	gac Gly	tac Gly	aaa Gly	gac Gly	cat Gly	gac Gly	ggg Gly	gat Gly	tat Gly	aaa Gly	gat Gly	cat Gly	gac Gly	atc Gly	gac Gly	1584

ES 2 661 967 T3

Ala	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Gly	Asp	Tyr	Lys	Asp	His	Asp	Ile	Asp	
	515						520					525				
tac	aag	gat	gac	gat	gac	aag	atc	tct	gtc	att	gat	gca	ctg	cag	tac	1632
Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ile	Ser	Val	Ile	Asp	Ala	Leu	Gln	Tyr	
	530					535					540					
aaa	tta	gag	ggc	acc	aca	aga	ttg	aca	aga	aaa	agg	gga	ttg	aag	tta	1680
Lys	Leu	Glu	Gly	Thr	Thr	Arg	Leu	Thr	Arg	Lys	Arg	Gly	Leu	Lys	Leu	
545					550					555					560	
gcc	aca	gct	ctg	tct	ctg	agc	aac	aaa	ttt	gtg	gag	ggg	agt	aga	tct	1728
Ala	Thr	Ala	Leu	Ser	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Val	Glu	Gly	Ser	Arg	Ser	
				565					570					575		
tag	tga															1734

<210> 16

<211> 576

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 16

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

ES 2 661 967 T3

165										170					175				
Leu	Tyr	Val	Ala 180	Phe	His	Asp	Pro	His 185	Arg	Cys	Gly	His	Ser 190	Gln	Pro				
Gln	Tyr	Gly 195	Thr	Phe	Cys	Glu	Lys 200	Phe	Gly	Asn	Gly	Glu 205	Ser	Gly	Met				
Gly	Arg 210	Ile	Pro	Asp	Trp	Thr 215	Pro	Gln	Ala	Tyr	Asp 220	Pro	Leu	Asp	Val				
Leu 225	Val	Pro	Tyr	Phe	Val 230	Pro	Asn	Thr	Pro	Ala 235	Ala	Arg	Ala	Asp	Leu 240				
Ala	Ala	Gln	Tyr	Thr 245	Thr	Val	Gly	Arg	Met 250	Asp	Gln	Gly	Val	Gly 255	Leu				
Val	Leu	Gln	Glu 260	Leu	Arg	Asp	Ala	Gly 265	Val	Leu	Asn	Asp	Thr 270	Leu	Val				
Ile	Phe	Thr 275	Ser	Asp	Asn	Gly	Ile 280	Pro	Phe	Pro	Ser	Gly 285	Arg	Thr	Asn				
Leu	Tyr 290	Trp	Pro	Gly	Thr	Ala 295	Glu	Pro	Leu	Leu	Val 300	Ser	Ser	Pro	Glu				
His 305	Pro	Lys	Arg	Trp	Gly 310	Gln	Val	Ser	Glu	Ala 315	Tyr	Val	Ser	Leu	Leu 320				
Asp	Leu	Thr	Pro	Thr 325	Ile	Leu	Asp	Trp	Phe 330	Ser	Ile	Pro	Tyr	Pro 335	Ser				
Tyr	Ala	Ile	Phe 340	Gly	Ser	Lys	Thr	Ile 345	His	Leu	Thr	Gly	Arg 350	Ser	Leu				
Leu	Pro	Ala 355	Leu	Glu	Ala	Glu	Pro 360	Leu	Trp	Ala	Thr	Val 365	Phe	Gly	Ser				
Gln	Ser 370	His	His	Glu	Val	Thr 375	Met	Ser	Tyr	Pro	Met 380	Arg	Ser	Val	Gln				
His 385	Arg	His	Phe	Arg	Leu 390	Val	His	Asn	Leu	Asn 395	Phe	Lys	Met	Pro	Phe 400				
Pro	Ile	Asp	Gln	Asp 405	Phe	Tyr	Val	Ser	Pro 410	Thr	Phe	Gln	Asp	Leu 415	Leu				
Asn	Arg	Thr	Thr 420	Ala	Gly	Gln	Pro	Thr 425	Gly	Trp	Tyr	Lys	Asp 430	Leu	Arg				
His	Tyr	Tyr 435	Tyr	Arg	Ala	Arg	Trp 440	Glu	Leu	Tyr	Asp	Arg 445	Ser	Arg	Asp				

ES 2 661 967 T3

Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu
450 455 460

Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His
465 470 475 480

Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser
485 490 495

Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn Glu Leu Ser Ser Arg Gly Ser Arg
500 505 510

Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
515 520 525

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Ser Val Ile Asp Ala Leu Gln Tyr
530 535 540

Lys Leu Glu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Arg Lys Arg Gly Leu Lys Leu
545 550 555 560

Ala Thr Ala Leu Ser Leu Ser Asn Lys Phe Val Glu Gly Ser Arg Ser
565 570 575

<210> 17

<211> 1737

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia química

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1737)

<400> 17

atg ccc ccg ccc cgc acc ggc cgc ggc ctg ctg tgg ctg ggc ctg gtg Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val 1 5 10 15	48
ctg agc agc gtg tgc gtg gcc ctg ggc cgt ccc cgg aac gca ctg ctg Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu 20 25 30	96
ctc ctc gcg gat gac gga ggc ttt gag agt ggc gcg tac aac aac agc Leu Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser 35 40 45	144
gcc atc gcc acc ccg cac ctg gac gcc ttg gcc cgc cgc agc ctc ctc Ala Ile Ala Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu 50 55 60	192
ttt cgc aat gcc ttc acc tcg gtc agc agc tgc tct ccc agc cgc gcc Phe Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala 65 70 75 80	240
agc ctc ctc act ggc ctg ccc cag cat cag aat ggg atg tac ggg ctg	288

ES 2 661 967 T3

Ser	Leu	Leu	Thr	Gly 85	Leu	Pro	Gln	His	Gln 90	Asn	Gly	Met	Tyr	Gly 95	Leu		
cac His	cag Gln	gac Asp	gtg Val 100	cac His	cac His	ttc Phe	aac Asn	tcc Ser 105	ttc Phe	gac Asp	aag Lys	gtg Val 110	cgg Arg	agc Ser	ctg Leu	336	
ccg Pro	ctg Leu	ctg Leu 115	ctc Leu	agc Ser	caa Gln	gct Ala	ggt Gly 120	gtg Val	cgc Arg	aca Thr	ggc Gly	atc Ile 125	atc Ile	ggg Gly	aag Lys	384	
aag Lys	cac His 130	gtg Val	ggg Gly	ccg Pro	gag Glu	acc Thr 135	gtg Val	tac Tyr	ccg Pro	ttt Phe	gac Asp 140	ttt Phe	gcg Ala	tac Tyr	acg Thr	432	
gag Glu 145	gag Glu	aat Asn	ggc Gly	tcc Ser	gtc Val 150	ctc Leu	cag Gln	gtg Val	ggg Gly	cgg Arg 155	aac Asn	atc Ile	act Thr	aga Arg	att Ile 160	480	
aag Lys	ctg Leu	ctc Leu	gtc Val	cgg Arg 165	aaa Lys	ttc Phe	ctg Leu	cag Gln	act Thr 170	cag Gln	gat Asp	gac Asp	cgg Arg	cct Pro 175	ttc Phe	528	
ttc Phe	ctc Leu	tac Tyr	gtc Val 180	gcc Ala	ttc Phe	cac His	gac Asp	ccc Pro 185	cac His	cgc Arg	tgt Cys	ggg Gly	cac His 190	tcc Ser	caa Gln	576	
ccc Pro	cag Gln	tac Tyr 195	gga Gly	acc Thr	ttc Phe	tgt Cys	gag Glu 200	aag Lys	ttt Phe	ggc Gly	aac Asn	gga Gly 205	gag Glu	agc Ser	ggc Gly	624	
atg Met 210	ggt Gly	cgt Arg	atc Ile	cca Pro	gac Asp	tgg Trp 215	acc Thr	ccc Pro	cag Gln	gcc Ala	tac Tyr 220	gac Asp	cca Pro	ctg Leu	gac Asp	672	
gtg Val 225	ctg Leu	gtg Val	cct Pro	tac Tyr	ttc Phe 230	gtc Val	ccc Pro	aac Asn	acc Thr	ccg Pro 235	gca Ala	gcc Ala	cga Arg	gcc Ala	gac Asp 240	720	
ctg Leu	gcc Ala	gct Ala	cag Gln	tac Thr 245	acc Thr	acc Thr	gtc Val	ggc Gly	cgc Arg	atg Met 250	gac Asp	caa Gln	gga Gly	gtt Val 255	gga Gly	768	
ctg Leu	gtg Val	ctc Leu	cag Gln 260	gag Glu	ctg Leu	cgt Arg	gac Asp	gcc Ala 265	ggt Gly	gtc Val	ctg Leu	aac Asn	gac Asp 270	aca Thr	ctg Leu	816	
gtg Val	atc Ile	ttc Phe 275	acg Thr	tcc Ser	gac Asp	aac Asn	ggg Gly 280	atc Ile	ccc Pro	ttc Phe	ccc Pro	agc Ser 285	ggc Gly	agg Arg	acc Thr	864	
aac Asn 290	ctg Leu	tac Tyr	tgg Trp	ccg Pro	ggc Gly	act Thr 295	gct Ala	gaa Glu	ccc Pro	tta Leu 300	ctg Leu	gtg Val	tca Ser	tcc Ser	ccg Pro	912	
gag Glu 305	cac His	cca Pro	aaa Lys	cgc Arg	tgg Trp 310	ggc Gly	caa Gln	gtc Val	agc Ser	gag Glu 315	gcc Ala	tac Tyr	gtg Val	agc Ser	ctc Leu 320	960	
cta Leu	gac Asp	ctc Leu	acg Thr 325	ccc Pro	acc Thr	atc Ile	ttg Leu	gat Asp	tgg Trp 330	ttc Phe	tcg Ser	atc Ile	ccg Pro	tac Tyr 335	ccc Pro	1008	
agc Ser	tac Tyr	gcc Ala	atc Ile 340	ttt Phe	ggc Gly	tcg Ser	aag Lys	acc Thr 345	atc Ile	cac His	ctc Leu	act Thr	ggc Gly 350	cgg Arg	tcc Ser	1056	
ctc Leu	ctg Leu	ccg Pro	gcg Ala	ctg Leu	gag Glu	gcc Ala	gag Glu	ccc Pro	ctc Leu	tgg Trp	gcc Ala	acc Thr	gtc Val	ttt Phe	ggc Gly	1104	

ES 2 661 967 T3

355	360	365	
agc Ser 370	cag Gln 375	agc Ser 380	1152
cag Gln 385	cac His 390	cgg Arg 395	1200
ttt Phe 405	ccc Pro 410	acc Thr 415	1248
ctg Leu 420	aac Asn 425	ggc Gly 430	1296
cgt Arg 435	cat His 440	tac Tyr 445	1344
gac Asp 450	ccc Pro 455	cgc Arg 460	1392
ctt Leu 465	ctg Leu 470	gag Gln 475	1440
cac His 485	gac Asp 490	gtc Val 495	1488
tct Ser 500	ccc Pro 505	cta Leu 510	1536
cgg Arg 515	gct Ala 520	gat Asp 525	1584
gac Asp 530	tac Tyr 535	aag Lys 540	1632
tac Tyr 545	aaa Lys 550	agg Arg 555	1680
tta Leu 565	gcc Ala 570	gag Glu 575	1728
tct Ser 580	tag Ser 585	tga Ser 590	1737

<210> 18
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 18

ES 2 661 967 T3

Met Pro Pro Pro Arg Thr Gly Arg Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Val Cys Val Ala Leu Gly Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu
 20 25 30
 Leu Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser
 35 40 45
 Ala Ile Ala Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu
 50 55 60
 Phe Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala
 65 70 75 80
 Ser Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu
 85 90 95
 His Gln Asp Val His His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu
 100 105 110
 Pro Leu Leu Leu Ser Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys
 115 120 125
 Lys His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr
 130 135 140
 Glu Glu Asn Gly Ser Val Leu Gln Val Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile
 145 150 155 160
 Lys Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe
 165 170 175
 Phe Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gln
 180 185 190
 Pro Gln Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly
 195 200 205
 Met Gly Arg Ile Pro Asp Trp Thr Pro Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp
 210 215 220
 Val Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp
 225 230 235 240
 Leu Ala Ala Gln Tyr Thr Thr Val Gly Arg Met Asp Gln Gly Val Gly
 245 250 255
 Leu Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu
 260 265 270
 Val Ile Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr

ES 2 661 967 T3

275 280 285
 Asn Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro
 290 295 300
 Glu His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu
 305 310 315 320
 Leu Asp Leu Thr Pro Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro
 325 330 335
 Ser Tyr Ala Ile Phe Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser
 340 345 350
 Leu Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly
 355 360 365
 Ser Gln Ser His His Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val
 370 375 380
 Gln His Arg His Phe Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro
 385 390 395 400
 Phe Pro Ile Asp Gln Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu
 405 410
 Leu Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu
 420 425 430
 Arg His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg
 435 440 445
 Asp Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln
 450 455 460
 Leu Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr
 465 470 475 480
 His Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu
 485 490 495
 Ser Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn Glu Leu Ser Ser Arg Gly Ser
 500 505 510
 Arg Ala Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile
 515 520 525
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Ser Val Ile Asp Ala Leu Gln
 530 535 540
 Tyr Lys Leu Glu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Arg Lys Arg Gly Leu Lys
 545 550 555 560
 Leu Ala Thr Ala Leu Ser Leu Ser Asn Lys Phe Val Glu Gly Ser Arg
 565 570 575

Ser

- 5 <210> 19
 <211> 1521
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia química

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1521)

<400> 19

atg	ccg	tct	tct	gtc	tgc	tgg	ggc	atc	ctc	ctg	ctg	gca	ggc	ctg	tgc	48
Met	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Trp	Gly	Ile	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Cys	
1				5					10					15		
tgc	ctg	gtc	cct	gtc	tcc	ctg	gct	cgt	ccc	cgg	aac	gca	ctg	ctg	ctc	96
Cys	Leu	Val	Pro	Val	Ser	Leu	Ala	Arg	Pro	Arg	Asn	Ala	Leu	Leu	Leu	
			20					25					30			
ctc	gcg	gat	gac	gga	ggc	ttt	gag	agt	ggc	gcg	tac	aac	aac	agc	gcc	144
Leu	Ala	Asp	Asp	Gly	Gly	Phe	Glu	Ser	Gly	Ala	Tyr	Asn	Asn	Ser	Ala	
		35					40					45				
atc	gcc	acc	ccg	cac	ctg	gac	gcc	ttg	gcc	cgc	cgc	agc	ctc	ctc	ttt	192
Ile	Ala	Thr	Pro	His	Leu	Asp	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Ser	Leu	Leu	Phe	
						55					60					
cgc	aat	gcc	ttc	acc	tgc	gtc	agc	agc	tgc	tct	ccc	agc	cgc	gcc	agc	240
Arg	Asn	Ala	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Pro	Ser	Arg	Ala	Ser	
65					70				75					80		
ctc	ctc	act	ggc	ctg	ccc	cag	cat	cag	aat	ggg	atg	tac	ggg	ctg	cac	288
Leu	Leu	Thr	Gly	Leu	Pro	Gln	His	Gln	Asn	Gly	Met	Tyr	Gly	Leu	His	
				85					90				95			
cag	gac	gtg	cac	cac	ttc	aac	tcc	ttc	gac	aag	gtg	cgg	agc	ctg	ccg	336
Gln	Asp	Val	His	His	Phe	Asn	Ser	Phe	Asp	Lys	Val	Arg	Ser	Leu	Pro	
			100					105					110			
ctg	ctg	ctc	agc	caa	gct	ggc	gtg	cgc	aca	ggc	atc	atc	ggg	aag	aag	384
Leu	Leu	Leu	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Arg	Thr	Gly	Ile	Ile	Gly	Lys	Lys	
			115				120					125				
cac	gtg	ggg	ccg	gag	acc	gtg	tac	ccg	ttt	gac	ttt	gcg	tac	acg	gag	432
His	Val	Gly	Pro	Glu	Thr	Val	Tyr	Pro	Phe	Asp	Phe	Ala	Tyr	Thr	Glu	
		130				135					140					
gag	aat	ggc	tcc	gtc	ctc	cag	gtg	ggg	cgg	aac	atc	act	aga	att	aag	480
Glu	Asn	Gly	Ser	Val	Leu	Gln	Val	Gly	Arg	Asn	Ile	Thr	Arg	Ile	Lys	
145					150				155					160		
ctg	ctc	gtc	cgg	aaa	ttc	ctg	cag	act	cag	gat	gac	cgg	cct	ttc	ttc	528
Leu	Leu	Val	Arg	Lys	Phe	Leu	Gln	Thr	Gln	Asp	Asp	Arg	Pro	Phe	Phe	
				165					170					175		
ctc	tac	gtc	gcc	ttc	cac	gac	ccc	cac	cgc	tgt	ggg	cac	tcc	caa	ccc	576

10

ES 2 661 967 T3

Leu	Tyr	Val	Ala 180	Phe	His	Asp	Pro	His 185	Arg	Cys	Gly	His	Ser 190	Gln	Pro		
cag Gln	tac Tyr	gga Gly 195	acc Thr	ttc Phe	tgt Cys	gag Glu	aag Lys 200	ttt Phe	ggc Gly	aac Asn	gga Gly	gag Glu 205	agc Ser	ggc Gly	atg Met	624	
ggc Gly	cgt Arg 210	atc Ile	cca Pro	gac Asp	tgg Trp	acc Thr 215	ccc Pro	cag Gln	gcc Ala	tac Tyr	gac Asp 220	cca Pro	ctg Leu	gac Asp	gtg Val	672	
ctg Leu 225	gtg Val	cct Pro	tac Tyr	ttc Phe	gtc Val 230	ccc Pro	aac Asn	acc Thr	ccg Pro	gca Ala 235	gcc Ala	cga Arg	gcc Ala	gac Asp	ctg Leu 240	720	
gcc Ala	gct Ala	cag Gln	tac Tyr	acc Thr 245	acc Thr	gtc Val	ggc Gly	cgc Arg	atg Met 250	gac Asp	caa Gln	gga Gly	gtt Val	gga Gly 255	ctg Leu	768	
gtg Val	ctc Leu	cag Gln 260	gag Glu	ctg Leu	cgt Arg	gac Asp	gcc Ala	ggc Gly 265	gtc Val	ctg Leu	aac Asn	gac Asp	aca Thr 270	ctg Leu	gtg Val	816	
atc Ile	ttc Phe	acg Thr 275	tcc Ser	gac Asp	aac Asn	ggg Gly	atc Ile 280	ccc Pro	ttc Phe	ccc Pro	agc Ser	ggc Gly 285	agg Arg	acc Thr	aac Asn	864	
ctg Leu	tac Tyr 290	tgg Trp	ccg Pro	ggc Gly	act Thr	gct Ala 295	gaa Glu	ccc Pro	tta Leu	ctg Leu	gtg Val 300	tca Ser	tcc Ser	ccg Pro	gag Glu	912	
cac His 305	cca Pro	aaa Lys	cgc Arg	tgg Trp	ggc Gly 310	caa Gln	gtc Val	agc Ser	gag Glu	gcc Ala 315	tac Tyr	gtg Val	agc Ser	ctc Leu	cta Leu 320	960	
gac Asp	ctc Leu	acg Thr	ccc Pro	acc Thr 325	atc Ile	ttg Leu	gat Asp	tgg Trp	ttc Phe 330	tgc Ser	atc Ile	ccg Pro	tac Tyr	ccc Pro 335	agc Ser	1008	
tac Tyr	gcc Ala	atc Ile	ttt Phe 340	ggc Gly	tcg Ser	aag Lys	acc Thr	atc Ile 345	cac His	ctc Leu	act Thr	ggc Gly	cgg Arg 350	tcc Ser	ctc Leu	1056	
ctg Leu	ccg Pro	gcg Ala 355	ctg Leu	gag Glu	gcc Ala	gag Glu	ccc Pro 360	ctc Leu	tgg Trp	gcc Ala	acc Thr	gtc Val 365	ttt Phe	ggc Gly	agc Ser	1104	
cag Gln 370	agc Ser	cac His	cac His	gag Glu	gtc Val	acc Thr 375	atg Met	tcc Ser	tac Tyr	ccc Pro	atg Met 380	cgc Arg	tcc Ser	gtg Val	cag Gln	1152	
cac His 385	cgg Arg	cac His	ttc Phe	cgc Arg	ctc Leu 390	gtg Val	cac His	aac Asn	ctc Leu	aac Asn 395	ttc Phe	aag Lys	atg Met	ccc Pro	ttt Phe 400	1200	
ccc Pro	atc Ile	gac Asp	cag Gln	gac Asp 405	ttc Phe	tac Tyr	gtc Val	tca Ser	ccc Pro 410	acc Thr	ttc Phe	cag Gln	gac Asp	ctc Leu 415	ctg Leu	1248	
aac Asn	cgc Arg	acc Thr	aca Thr 420	gct Ala	ggc Gly	cag Gln	ccc Pro	acg Thr 425	ggc Gly	tgg Trp	tac Tyr	aag Lys	gac Asp 430	ctc Leu	cgt Arg	1296	
cat His	tac Tyr	tac Tyr 435	tac Tyr	cgg Arg	gcg Ala	cgc Arg	tgg Trp 440	gag Glu	ctc Leu	tac Tyr	gac Asp	cgg Arg 445	agc Ser	cgg Arg	gac Asp	1344	
ccc Pro	cac His 450	gag Glu	acc Thr	cag Gln	aac Asn	ctg Leu 455	gcc Ala	acc Thr	gac Asp	ccg Pro	cgc Arg	ttt Phe 460	gct Ala	cag Gln	ctt Leu	1392	
ctg Leu 465	gag Glu	atg Met	ctt Leu	cgg Arg	gac Asp 470	cag Gln	ctg Leu	gcc Ala	aag Lys	tgg Trp 475	cag Gln	tgg Trp	gag Glu	acc Thr	cac His 480	1440	
gac Asp	ccc Pro	tgg Trp	gtg Val	tgc Cys 485	gcc Ala	ccc Pro	gac Asp	ggc Gly	gtc Val 490	ctg Leu	gag Glu	gag Glu	aag Lys	ctc Leu 495	tct Ser	1488	
ccc Pro	cag Gln	tgc Cys 500	cag Pro	ccc Pro	ctc Leu	cac His	aac Asn	gag Glu 505	ctg Leu	tga						1521	

<210> 20

<211> 506

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 20

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 Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu
20 25 30

Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala
35 40 45

Ile Ala Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe
50 55 60

Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser
65 70 75 80

Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu His
85 90 95

Gln Asp Val His His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro
100 105 110

Leu Leu Leu Ser Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys
115 120 125

His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu
130 135 140

Glu Asn Gly Ser Val Leu Gln Val Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile Lys
145 150 155 160

Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe Phe
165 170 175

ES 2 661 967 T3

Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gln Pro
 180 185 190
 Gln Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met
 195 200 205
 Gly Arg Ile Pro Asp Trp Thr Pro Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val
 210 215 220
 Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu
 225 230 235 240
 Ala Ala Gln Tyr Thr Thr Val Gly Arg Met Asp Gln Gly Val Gly Leu
 245 250 255
 Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val
 260 265 270
 Ile Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn
 275 280 285
 Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu
 290 295 300
 His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu
 305 310 315 320
 Asp Leu Thr Pro Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro Ser
 325 330 335
 Tyr Ala Ile Phe Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser Leu
 340 345 350
 Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser
 355 360 365
 Gln Ser His His Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gln
 370 375 380
 His Arg His Phe Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe
 385 390 395 400
 Pro Ile Asp Gln Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu Leu
 405 410 415
 Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg
 420 425 430
 His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp
 435 440 445
 Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu

ES 2 661 967 T3

	450		455		460												
	Leu 465	Glu Met	Leu Arg	Asp 470	Gln Leu Ala Lys	Trp 475 Gln Trp Glu Thr His 480											
	Asp	Pro Trp Val	Cys 485	Ala Pro Asp Gly	Val 490	Leu Glu Glu Lys Leu Ser 495											
	Pro	Gln Cys	Gln 500	Pro Leu His Asn	Glu 505	Leu											
5	<210> 21 <211> 1524 <212> ADN <213> Secuencia Artificial																
10	<220> <223> Secuencia quimérica																
15	<220> <221> CDS <222> (1)..(1524)																
	<400> 21																
	atg Met 1	ccc Pro	ccg Pro	ccc Pro	cgc Arg 5	acc Thr	ggc Gly	cgc Arg	ggc Gly	ctg Leu 10	ctg Leu	tgg Trp	ctg Leu	ggc Gly	ctg Leu 15	gtg Val	48
	ctg Leu	agc Ser	agc Ser	gtg Val 20	tgc Cys	gtg Val	gcc Ala	ctg Leu	ggc Gly 25	cgt Arg	ccc Pro	cgg Arg	aac Asn	gca Ala 30	ctg Leu	ctg Leu	96
	ctc Leu	ctc Leu	gcg Ala 35	gat Asp	gac Asp	gga Gly	ggc Gly	ttt Phe 40	gag Glu	agt Ser	ggc Gly	gcg Ala	tac Tyr 45	aac Asn	aac Asn	agc Ser	144
	gcc Ala	atc Ile 50	gcc Ala	acc Thr	ccg Pro	cac His	ctg Leu 55	gac Asp	gcc Ala	ttg Leu	gcc Ala	cgc Arg 60	cgc Arg	agc Ser	ctc Leu	ctc Leu	192
	ttt Phe 65	cgc Arg	aat Asn	gcc Ala	ttc Phe	acc Thr 70	tcg Ser	gtc Val	agc Ser	agc Ser	tgc Cys 75	tct Ser	ccc Pro	agc Ser	cgc Arg	gcc Ala 80	240
	agc Ser	ctc Leu	ctc Leu	act Thr	ggc Gly 85	ctg Leu	ccc Pro	cag Gln	cat His	cag Gln 90	aat Asn	ggg Gly	atg Met	tac Tyr	ggg Gly 95	ctg Leu	288
	cac His	cag Gln	gac Asp	gtg Val 100	cac His	cac His	ttc Phe	aac Asn	tcc Ser 105	ttc Phe	gac Asp	aag Lys	gtg Val	cgg Arg 110	agc Ser	ctg Leu	336
	ccg Pro	ctg Leu	ctg Leu 115	ctc Leu	agc Ser	caa Gln	gct Ala	ggt Gly 120	gtg Val	cgc Arg	aca Thr	ggc Gly	atc Ile 125	atc Ile	ggg Gly	aag Lys	384
	aag Lys	cac His 130	gtg Val	ggg Gly	ccg Pro	gag Glu	acc Thr 135	gtg Val	tac Tyr	ccg Pro	ttt Phe	gac Asp 140	ttt Phe	gcg Ala	tac Tyr	acg Thr	432
	gag Glu 145	gag Glu	aat Asn	ggc Gly	tcc Ser	gtc Val 150	ctc Leu	cag Gln	gtg Val	ggg Gly	cgg Arg 155	aac Asn	atc Ile	act Thr	aga Arg	att Ile 160	480

ES 2 661 967 T3

aag Lys	ctg Leu	ctc Leu	gtc Val	cgg Arg 165	aaa Lys	ttc Phe	ctg Leu	cag Gln	act Thr 170	cag Gln	gat Asp	gac Asp	cgg Arg	cct Pro 175	ttc Phe	528
ttc Phe	ctc Leu	tac Tyr	gtc Val 180	gcc Ala	ttc Phe	cac His	gac Asp	ccc Pro 185	cac His	cgc Arg	tgt Cys	ggg Gly	cac His 190	tcc Ser	caa Gln	576
ccc Pro	cag Gln	tac Tyr 195	gga Gly	acc Thr	ttc Phe	tgt Cys	gag Glu 200	aag Lys	ttt Phe	ggc Gly	aac Asn	gga Gly 205	gag Glu	agc Ser	ggc Gly	624
atg Met 210	ggc Gly	cgt Arg	atc Ile	cca Pro	gac Asp	tgg Trp 215	acc Thr	ccc Pro	cag Gln	gcc Ala	tac Tyr 220	gac Asp	cca Pro	ctg Leu	gac Asp	672
gtg Val 225	ctg Leu	gtg Val	cct Pro	tac Tyr	ttc Phe 230	gtc Val	ccc Pro	aac Asn	acc Thr	ccg Pro 235	gca Ala	gcc Ala	cga Arg	gcc Ala	gac Asp 240	720
ctg Leu	gcc Ala	gct Ala	cag Gln	tac Tyr 245	acc Thr	acc Thr	gtc Val	ggc Gly	cgc Arg 250	atg Met	gac Asp	caa Gln	gga Gly	gtt Val 255	gga Gly	768
ctg Leu	gtg Val	ctc Leu	cag Gln 260	gag Glu	ctg Leu	cgt Arg	gac Asp	gcc Ala 265	ggc Gly	gtc Val	ctg Leu	aac Asn	gac Asp 270	aca Thr	ctg Leu	816
gtg Val	atc Ile	ttc Phe 275	acg Thr	tcc Ser	gac Asp	aac Asn	ggg Gly 280	atc Ile	ccc Pro	ttc Phe	ccc Pro	agc Ser 285	ggc Gly	agg Arg	acc Thr	864
aac Asn 290	ctg Leu	tac Tyr	tgg Trp	ccg Pro	ggc Gly	act Thr 295	gct Ala	gaa Glu	ccc Pro	tta Leu 300	ctg Leu	gtg Val	tca Ser	tcc Ser	ccg Pro	912
gag Glu 305	cac His	cca Pro	aaa Lys	cgc Arg	tgg Trp 310	ggc Gly	caa Gln	gtc Val	agc Ser	gag Glu 315	gcc Ala	tac Tyr	gtg Val	agc Ser	ctc Leu 320	960
cta Leu	gac Asp	ctc Leu	acg Thr	ccc Pro 325	acc Thr	atc Ile	ttg Leu	gat Asp	tgg Trp 330	ttc Phe	tcg Ser	atc Ile	ccg Pro	tac Tyr 335	ccc Pro	1008
agc Ser	tac Tyr	gcc Ala	atc Ile 340	ttt Phe	ggc Gly	tcg Ser	aag Lys	acc Thr 345	atc Ile	cac His	ctc Leu	act Thr 350	ggc Gly	cgg Arg	tcc Ser	1056
ctc Leu	ctg Leu	ccg Pro 355	gcg Ala	ctg Leu	gag Glu	gcc Ala	gag Glu 360	ccc Pro	ctc Leu	tgg Trp	gcc Ala	acc Thr 365	gtc Val	ttt Phe	ggc Gly	1104
agc Ser 370	cag Gln	agc Ser	cac His	cac His	gag Glu	gtc Val 375	acc Thr	atg Met	tcc Ser	tac Tyr	ccc Pro 380	atg Met	cgc Arg	tcc Ser	gtg Val	1152
cag Gln 385	cac His	cgg Arg	cac His	ttc Phe	cgc Arg 390	ctc Leu	gtg Val	cac His	aac Asn	ctc Leu 395	aac Asn	ttc Phe	aag Lys	atg Met	ccc Pro 400	1200
ttt Phe	ccc Pro	atc Ile	gac Asp	cag Gln 405	gac Asp	ttc Phe	tac Tyr	gtc Val	tca Ser 410	ccc Pro	acc Thr	ttc Phe	cag Gln	gac Asp 415	ctc Leu	1248
ctg Leu	aac Asn	cgc Arg	acc Thr 420	aca Thr	gct Ala	ggc Gly	cag Gln	ccc Pro 425	acg Thr	ggc Gly	tgg Trp	tac Tyr	aag Lys 430	gac Asp	ctc Leu	1296
cgt Leu	cat Pro	tac Ile	tac Ile	tac Ile	cgg Arg	gcg Arg	cgc Arg	tgg Trp	gag Glu	ctc Leu	tac Ile	gac Asp	cgg Arg	agc Ser	cgg Arg	1344

ES 2 661 967 T3

Arg	His	Tyr	Tyr	Tyr	Arg	Ala	Arg	Trp	Glu	Leu	Tyr	Asp	Arg	Ser	Arg	
		435					440					445				
gac	ccc	cac	gag	acc	cag	aac	ctg	gcc	acc	gac	ccg	cgc	ttt	gct	cag	1392
Asp	Pro	His	Glu	Thr	Gln	Asn	Leu	Ala	Thr	Asp	Pro	Arg	Phe	Ala	Gln	
	450					455					460					
ctt	ctg	gag	atg	ctt	cgg	gac	cag	ctg	gcc	aag	tgg	cag	tgg	gag	acc	1440
Leu	Leu	Glu	Met	Leu	Arg	Asp	Gln	Leu	Ala	Lys	Trp	Gln	Trp	Glu	Thr	
465					470					475					480	
cac	gac	ccc	tgg	gtg	tgc	gcc	ccc	gac	ggc	gtc	ctg	gag	gag	aag	ctc	1488
His	Asp	Pro	Trp	Val	Cys	Ala	Pro	Asp	Gly	Val	Leu	Glu	Glu	Lys	Leu	
				485					490					495		
tct	ccc	cag	tgc	cag	ccc	cta	cac	aat	gag	ctc	tga					1524
Ser	Pro	Gln	Cys	Gln	Pro	Leu	His	Asn	Glu	Leu						
			500					505								

<210> 22

<211> 507

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 22

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

ES 2 661 967 T3

Lys Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe
 165 170 175
 Phe Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gln
 180 185 190
 Pro Gln Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly
 195 200 205
 Met Gly Arg Ile Pro Asp Trp Thr Pro Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp
 210 215 220
 Val Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp
 225 230 235 240
 Leu Ala Ala Gln Tyr Thr Thr Val Gly Arg Met Asp Gln Gly Val Gly
 245 250 255
 Leu Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu
 260 265 270
 Val Ile Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr
 275 280 285
 Asn Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro
 290 295 300
 Glu His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu
 305 310 315 320
 Leu Asp Leu Thr Pro Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro
 325 330 335
 Ser Tyr Ala Ile Phe Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser
 340 345 350
 Leu Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly
 355 360 365
 Ser Gln Ser His His Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val
 370 375 380
 Gln His Arg His Phe Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro
 385 390 395 400
 Phe Pro Ile Asp Gln Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu
 405 410 415
 Leu Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu
 420 425 430

ES 2 661 967 T3

Arg His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg
 435 440 445

Asp Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln
 450 455 460

Leu Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr
 465 470 475 480

His Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu
 485 490 495

Ser Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn Glu Leu
 500 505

<210> 23

<211> 1653

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia quimérica

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1653)

<400> 23

atg ccg tct tct gtc tcg tgg ggc atc ctc ctg ctg gca ggc ctg tgc Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys 1 5 10 15	48
tgc ctg gtc cct gtc tcc ctg gct cgt ccc cgg aac gca ctg ctg ctc Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Arg 25 Pro Arg Asn Ala Leu Leu 20 25 30	96
ctc gcg gat gac gga ggc ttt gag agt ggc gcg tac aac aac agc gcc Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala 35 40 45	144
atc gcc acc ccg cac ctg gac gcc ttg gcc cgc cgc agc ctc ctc ttt Ile Ala Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe 50 55 60	192
cgc aat gcc ttc acc tcg gtc agc agc tgc tct ccc agc cgc gcc agc Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser 65 70 75 80	240
ctc ctc act ggc ctg ccc cag cat cag aat ggg atg tac ggg ctg cac Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu His 85 90 95	288
cag gac gtg cac cac ttc aac tcc ttc gac aag gtg cgg agc ctg ccg Gln Asp Val His His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro 100 105 110	336
ctg ctg ctc agc caa gct ggt gtg cgc aca ggc atc atc ggg aag aag Leu Leu Leu Ser Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys 115 120 125	384
cac gtg ggg ccg gag acc gtg tac ccg ttt gac ttt gcg tac acg gag His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu 130 135 140	432

ES 2 661 967 T3

gag Glu 145	aat Asn	ggc Gly	tcc Ser	gtc Val	ctc Leu 150	cag Gln	gtg Val	ggg Gly	cgg Arg	aac Asn 155	atc Ile	act Thr	aga Arg	att Ile	aag Lys 160	480
ctg Leu	ctc Leu	gtc Val	cgg Arg	aaa Lys 165	ttc Phe	ctg Leu	cag Gln	act Thr	cag Gln 170	gat Asp	gac Asp	cgg Arg	cct Pro	ttc Phe 175	ttc Phe	528
ctc Leu	tac Tyr	gtc Val	gcc Ala 180	ttc Phe	cac His	gac Asp	ccc Pro	cac His 185	cgc Arg	tgt Cys	ggg Gly	cac His	tcc Ser 190	caa Gln	ccc Pro	576
cag Gln	tac Tyr	gga Gly 195	acc Thr	ttc Phe	tgt Cys	gag Glu	aag Lys 200	ttt Phe	ggc Gly	aac Asn	gga Gly 205	gag Glu	agc Ser	ggc Gly	atg Met	624
ggg Gly	cgt Arg 210	atc Ile	cca Pro	gac Asp	tgg Trp 215	acc Thr	ccc Pro	cag Gln	gcc Ala	tac Tyr	gac Asp 220	cca Pro	ctg Leu	gac Asp	gtg Val	672
ctg Leu 225	gtg Val	cct Pro	tac Tyr	ttc Phe	gtc Val 230	ccc Pro	aac Asn	acc Thr	ccg Pro	gca Ala 235	gcc Ala	cga Arg	gcc Ala	gac Asp	ctg Leu 240	720
gcc Ala	gct Ala	cag Gln	tac Tyr	acc Thr 245	acc Thr	gtc Val	ggc Gly	cgc Arg	atg Met 250	gac Asp	caa Gln	gga Gly	gtt Val	gga Gly 255	ctg Leu	768
gtg Val	ctc Leu	cag Gln	gag Glu 260	ctg Leu	cgt Arg	gac Asp	gcc Ala	ggg Gly 265	gtc Val	ctg Leu	aac Asn	gac Asp	aca Thr 270	ctg Leu	gtg Val	816
atc Ile	ttc Phe	acg Thr 275	tcc Ser	gac Asp	aac Asn	ggg Gly	atc Ile 280	ccc Pro	ttc Phe	ccc Pro	agc Ser	ggc Gly 285	agg Arg	acc Thr	aac Asn	864
ctg Leu	tac Tyr 290	tgg Trp	ccg Pro	ggc Gly	act Thr	gct Ala 295	gaa Glu	ccc Pro	tta Leu	ctg Leu	gtg Val 300	tca Ser	tcc Ser	ccg Pro	gag Glu	912
cac His 305	cca Pro	aaa Lys	cgc Arg	tgg Trp	ggc Gly 310	caa Gln	gtc Val	agc Ser	gag Glu	gcc Ala 315	tac Tyr	gtg Val	agc Ser	ctc Leu	cta Leu 320	960
gac Asp	ctc Leu	acg Thr	ccc Pro	acc Thr 325	atc Ile	ttg Leu	gat Asp	tgg Trp	ttc Phe 330	tcg Ser	atc Ile	ccg Pro	tac Tyr	ccc Pro 335	agc Ser	1008
tac Tyr	gcc Ala	atc Ile	ttt Phe 340	ggc Gly	tcg Ser	aag Lys	acc Thr	atc Ile 345	cac His	ctc Leu	act Thr	ggc Gly	cgg Arg 350	tcc Ser	ctc Leu	1056
ctg Leu	ccg Pro	gcg Ala 355	ctg Leu	gag Glu	gcc Ala	gag Glu	ccc Pro 360	ctc Leu	tgg Trp	gcc Ala	acc Thr	gtc Val 365	ttt Phe	ggc Gly	agc Ser	1104
cag Gln 370	agc Ser	cac His	cac His	gag Glu	gtc Val	acc Thr 375	atg Met	tct Ser	tac Tyr	ccc Pro	atg Met 380	cgc Arg	tcc Ser	gtg Val	cag Gln	1152
cac His 385	cgg Arg	cac His	ttc Phe	cgc Arg	ctc Leu 390	gtg Val	cac His	aac Asn	ctc Leu	aac Asn 395	ttc Phe	aag Lys	atg Met	ccc Pro	ttt Phe 400	1200
ccc Pro	atc Ile	gac Asp	cag Gln	gac Asp 405	ttc Phe	tac Tyr	gtc Val	tca Ser	ccc Pro 410	acc Thr	ttc Phe	cag Gln	gac Asp	ctc Leu 415	ctg Leu	1248

ES 2 661 967 T3

aac cgc acc aca gct ggt cag ccc acg ggc tgg tac aag gac ctc cgt Asn Arg Thr Thr 420 Ala Gly Gln Pro Thr 425 Gly Trp Tyr Lys Asp 430 Leu Arg	1296
cat tac tac tac cgg gcg cgc tgg gag ctc tac gac cgg agc cgg gac His Tyr Tyr 435 Tyr Arg Ala Arg Trp 440 Glu Leu Tyr Asp Arg 445 Ser Arg Asp	1344
ccc cac gag acc cag aac ctg gcc acc gac ccg cgc ttt gct cag ctt Pro His 450 Glu Thr Gln Asn 455 Ala Thr Asp Pro Arg 460 Phe Ala Gln Leu	1392
ctg gag atg ctt cgg gac cag ctg gcc aag tgg cag tgg gag acc cac Leu Glu Met Leu Arg Asp 470 Gln Leu Ala Lys Trp 475 Gln Trp Glu Thr His 480	1440
gac ccc tgg gtg tgc gcc ccc gac ggc gtc ctg gag gag aag ctc tct Asp Pro Trp Val 485 Cys Ala Pro Asp Gly Val 490 Leu Glu Glu Lys Leu Ser 495	1488
ccc cag tgc cag ccc ctc cac aat gag ctg tca tct aga tct gtc att Pro Gln Cys 500 Gln Pro Leu His Asn 505 Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ile	1536
gat gca ctg cag tac aaa tta gag ggc acc aca aga ttg aca aga aaa Asp Ala Leu 515 Gln Tyr Lys Leu Glu 520 Gly Thr Thr Arg Leu Thr Arg Lys	1584
agg gga ttg aag tta gcc aca gct ctg tct ctg agc aac aaa ttt gtg Arg Gly Leu Lys Leu Ala Thr 535 Ala Leu Ser Leu Ser 540 Asn Lys Phe Val	1632
gag ggt agt aga tct tag tga Glu Gly Ser Arg Ser 545	1653

<210> 24

<211> 549

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 24

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 Arg Pro Arg Asn Ala Leu Leu Leu
20 25 30

Leu Ala Asp Asp Gly Gly Phe Glu Ser Gly Ala Tyr Asn Asn Ser Ala
35 40 45

Ile Ala Thr Pro His Leu Asp Ala Leu Ala Arg Arg Ser Leu Leu Phe
50 55 60

Arg Asn Ala Phe Thr Ser Val Ser Ser Cys Ser Pro Ser Arg Ala Ser
65 70 75 80

Leu Leu Thr Gly Leu Pro Gln His Gln Asn Gly Met Tyr Gly Leu His
85 90 95

ES 2 661 967 T3

Gln Asp Val His His Phe Asn Ser Phe Asp Lys Val Arg Ser Leu Pro
 100 105 110
 Leu Leu Leu Ser Gln Ala Gly Val Arg Thr Gly Ile Ile Gly Lys Lys
 115 120 125
 His Val Gly Pro Glu Thr Val Tyr Pro Phe Asp Phe Ala Tyr Thr Glu
 130 135 140
 Glu Asn Gly Ser Val Leu Gln Val Gly Arg Asn Ile Thr Arg Ile Lys
 145 150 155 160
 Leu Leu Val Arg Lys Phe Leu Gln Thr Gln Asp Asp Arg Pro Phe Phe
 165 170 175
 Leu Tyr Val Ala Phe His Asp Pro His Arg Cys Gly His Ser Gln Pro
 180 185 190
 Gln Tyr Gly Thr Phe Cys Glu Lys Phe Gly Asn Gly Glu Ser Gly Met
 195 200 205
 Gly Arg Ile Pro Asp Trp Thr Pro Gln Ala Tyr Asp Pro Leu Asp Val
 210 215 220
 Leu Val Pro Tyr Phe Val Pro Asn Thr Pro Ala Ala Arg Ala Asp Leu
 225 230 235 240
 Ala Ala Gln Tyr Thr Thr Val Gly Arg Met Asp Gln Gly Val Gly Leu
 245 250 255
 Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu Val
 260 265 270
 Ile Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr Asn
 275 280 285
 Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro Glu
 290 295 300
 His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu Leu
 305 310 315 320
 Asp Leu Thr Pro Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro Ser
 325 330 335
 Tyr Ala Ile Phe Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser Leu
 340 345 350
 Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly Ser
 355 360 365

ES 2 661 967 T3

Gln Ser His His Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val Gln
 370 375 380

His Arg His Phe Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro Phe
 385 390 395 400

Pro Ile Asp Gln Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu Leu
 405 410 415

Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu Arg
 420 425 430

His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg Asp
 435 440 445

Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln Leu
 450 455 460

Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr His
 465 470 475 480

Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu Ser
 485 490 495

Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ile
 500 505 510

Asp Ala Leu Gln Tyr Lys Leu Glu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Arg Lys
 515 520 525

Arg Gly Leu Lys Leu Ala Thr Ala Leu Ser Leu Ser Asn Lys Phe Val
 530 535 540

Glu Gly Ser Arg Ser
 545

<210> 25
 <211> 1656
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia química

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1656)

<400> 25

atg	ccc	ccg	ccc	cgc	acc	ggc	cgc	ggc	ctg	ctg	tgg	ctg	ggc	ctg	gtg	48
Met	Pro	Pro	Pro	Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Trp	Leu	Gly	Leu	Val	
1				5					10					15		
ctg	agc	agc	gtg	tgc	gtg	gcc	ctg	ggc	cgt	ccc	cgg	aac	gca	ctg	ctg	96
Leu	Ser	Ser	Val	Cys	Val	Ala	Leu	Gly	Arg	Pro	Arg	Asn	Ala	Leu	Leu	

ES 2 661 967 T3

20						25						30						
ctc Leu	ctc Leu	gcg Ala 35	gat Asp	gac Asp	gga Gly	ggc Gly	ttt Phe 40	gag Glu	agt Ser	ggc Gly	gcg Ala	tac Tyr 45	aac Asn	aac Asn	agc Ser	144		
gcc Ala	atc Ile 50	gcc Ala	acc Thr	ccg Pro	cac His	ctg Leu 55	gac Asp	gcc Ala	ttg Leu	gcc Ala	cgc Arg 60	cgc Arg	agc Ser	ctc Leu	ctc Leu	192		
ttt Phe 65	cgc Arg	aat Asn	gcc Ala	ttc Phe	acc Thr 70	tcg Ser	gtc Val	agc Ser	agc Ser	tcg Cys 75	tct Ser	ccc Pro	agc Ser	cgc Arg	gcc Ala 80	240		
agc Ser	ctc Leu	ctc Leu	act Thr	ggc Gly 85	ctg Leu	ccc Pro	cag Gln	cat His	cag Gln 90	aat Asn	ggg Gly	atg Met	tac Tyr	ggg Gly 95	ctg Leu	288		
cac His	cag Gln	gac Asp	gtg Val 100	cac His	cac His	ttc Phe	aac Asn	tcc Ser 105	ttc Phe	gac Asp	aag Lys	gtg Val	cgg Arg 110	agc Ser	ctg Leu	336		
ccg Pro	ctg Leu	ctg Leu 115	ctc Leu	agc Ser	caa Gln	gct Ala	ggg Gly 120	gtg Val	cgc Arg	aca Thr	ggc Gly	atc Ile 125	atc Ile	ggg Gly	aag Lys	384		
aag Lys	cac His 130	gtg Val	ggg Gly	ccg Pro	gag Glu	acc Thr 135	gtg Val	tac Tyr	ccg Pro	ttt Phe	gac Asp 140	ttt Phe	gcg Ala	tac Tyr	acg Thr	432		
gag Glu 145	gag Glu	aat Asn	ggc Gly	tcc Ser	gtc Val 150	ctc Leu	cag Gln	gtg Val	ggg Gly	cgg Arg 155	aac Asn	atc Ile	act Thr	aga Arg	att Ile 160	480		
aag Lys	ctg Leu	ctc Leu	gtc Val	cgg Arg 165	aaa Lys	ttc Phe	ctg Leu	cag Gln	act Thr 170	cag Gln	gat Asp	gac Asp	cgg Arg	cct Pro 175	ttc Phe	528		
ttc Phe	ctc Leu	tac Tyr	gtc Val 180	gcc Ala	ttc Phe	cac His	gac Asp	ccc Pro 185	cac His	cgc Arg	tgt Cys	ggg Gly	cac His 190	tcc Ser	caa Gln	576		
ccc Pro	cag Gln	tac Tyr 195	gga Gly	acc Thr	ttc Phe	tgt Cys	gag Glu 200	aag Lys	ttt Phe	ggc Gly	aac Asn	gga Gly 205	gag Glu	agc Ser	ggc Gly	624		
atg Met	ggg Gly 210	cgt Arg	atc Ile	cca Pro	gac Asp	tgg Trp 215	acc Thr	ccc Pro	cag Gln	gcc Ala	tac Tyr 220	gac Asp	cca Pro	ctg Leu	gac Asp	672		
gtg Val 225	ctg Leu	gtg Val	cct Pro	tac Tyr	ttc Phe 230	gtc Val	ccc Pro	aac Asn	acc Thr	ccg Pro 235	gca Ala	gcc Ala	cga Arg	gcc Ala	gac Asp 240	720		
ctg Leu	gcc Ala	gct Ala	cag Gln	tac Tyr 245	acc Thr	acc Thr	gtc Val	ggc Gly	cgc Arg 250	atg Met	gac Asp	caa Gln	gga Gly	gtt Val 255	gga Gly	768		
ctg Leu	gtg Val	ctc Leu	cag Gln 260	gag Glu	ctg Leu	cgt Arg	gac Asp	gcc Ala 265	ggg Gly	gtc Val	ctg Leu	aac Asn	gac Asp 270	aca Thr	ctg Leu	816		
gtg Val	atc Ile	ttc Phe 275	acg Thr	tcc Ser	gac Asp	aac Asn	ggg Gly 280	atc Ile	ccc Pro	ttc Phe	ccc Pro	agc Ser 285	ggc Gly	agg Arg	acc Thr	864		
aac Asn	ctg Leu 290	tac Tyr	tgg Trp	ccg Pro	ggc Gly	act Thr 295	gct Ala	gaa Glu	ccc Pro	tta Leu 300	ctg Leu	gtg Val	tca Ser	tcc Ser	ccg Pro	912		

ES 2 661 967 T3

gag Glu 305	cac His	cca Pro	aaa Lys	cgc Arg	tgg Trp 310	ggc Gly	caa Gln	gtc Val	agc Ser	gag Glu 315	gcc Ala	tac Tyr	gtg Val	agc Ser	ctc Leu 320	960
cta Leu	gac Asp	ctc Leu	acg Thr	ccc Pro 325	acc Thr	atc Ile	ttg Leu	gat Asp	tgg Trp 330	ttc Phe	tgc Ser	atc Ile	ccg Pro	tac Tyr 335	ccc Pro	1008
agc Ser	tac Tyr	gcc Ala	atc Ile 340	ttt Phe	ggc Gly	tgc Ser	aag Lys	acc Thr 345	atc Ile	cac His	ctc Leu	act Thr	ggc Gly 350	cgg Arg	tcc Ser	1056
ctc Leu	ctg Leu	ccg Pro 355	gcg Ala	ctg Leu	gag Glu	gcc Ala	gag Glu 360	ccc Pro	ctc Leu	tgg Trp	gcc Ala	acc Thr 365	gtc Val	ttt Phe	ggc Gly	1104
agc Ser	cag Gln 370	agc Ser	cac His	cac His	gag Glu	gtc Val 375	acc Thr	atg Met	tct Ser	tac Tyr	ccc Pro 380	atg Met	cgc Arg	tcc Ser	gtg Val	1152
cag Gln 385	cac His	cgg Arg	cac His	ttc Phe	cgc Arg 390	ctc Leu	gtg Val	cac His	aac Asn	ctc Leu 395	aac Asn	ttc Phe	aag Lys	atg Met	ccc Pro 400	1200
ttt Phe	ccc Pro	atc Ile	gac Asp	cag Gln 405	gac Asp	ttc Phe	tac Tyr	gtc Val	tca Ser 410	ccc Pro	acc Thr	ttc Phe	cag Gln 415	gac Asp	ctc Leu	1248
ctg Leu	aac Asn	cgc Arg	acc Thr 420	aca Thr	gct Ala	ggc Gly	cag Gln	ccc Pro 425	acg Thr	ggc Gly	tgg Trp	tac Tyr	aag Lys 430	gac Asp	ctc Leu	1296
cgt Arg	cat His	tac Tyr 435	tac Tyr	tac Tyr	cgg Arg	gcg Ala	cgc Arg 440	tgg Trp	gag Glu	ctc Leu	tac Tyr	gac Asp 445	cgg Arg	agc Ser	cgg Arg	1344
gac Asp	ccc Pro 450	cac His	gag Glu	acc Thr	cag Gln	aac Asn 455	ctg Leu	gcc Ala	acc Thr	gac Asp	ccg Pro 460	cgc Arg	ttt Phe	gct Ala	cag Gln	1392
ctt Leu 465	ctg Leu	gag Glu	atg Met	ctt Leu	cgg Arg 470	gac Asp	cag Gln	ctg Leu	gcc Ala	aag Lys 475	tgg Trp	cag Gln	tgg Trp	gag Glu	acc Thr 480	1440
cac His	gac Asp	ccc Pro	tgg Trp	gtg Val 485	tgc Cys	gcc Ala	ccc Pro	gac Asp	ggc Gly 490	gtc Val	ctg Leu	gag Glu	gag Glu	aag Lys 495	ctc Leu	1488
tct Ser	ccc Pro	cag Gln	tgc Cys 500	cag Gln	ccc Pro	ctc Leu	cac His	aat Asn 505	gag Glu	ctg Leu	tca Ser	tct Ser	aga Arg 510	tct Ser	gtc Val	1536
att Ile	gat Asp	gca Ala 515	ctg Leu	cag Gln	tac Tyr	aaa Lys	tta Leu 520	gag Glu	ggc Gly	acc Thr	aca Thr	aga Arg 525	ttg Leu	aca Thr	aga Arg	1584
aaa Lys	agg Arg 530	gga Gly	ttg Leu	aag Lys	tta Leu	gcc Ala 535	aca Thr	gct Ala	ctg Leu	tct Ser	ctg Leu 540	agc Ser	aac Asn	aaa Lys	ttt Phe	1632
gtg Val 545	gag Glu	ggc Gly	agt Ser	aga Arg	tct Ser 550	tag	tga									1656

<210> 26
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 26

ES 2 661 967 T3

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

ES 2 661 967 T3

Leu Val Leu Gln Glu Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Asn Asp Thr Leu
 260 265 270
 Val Ile Phe Thr Ser Asp Asn Gly Ile Pro Phe Pro Ser Gly Arg Thr
 275 280 285
 Asn Leu Tyr Trp Pro Gly Thr Ala Glu Pro Leu Leu Val Ser Ser Pro
 290 295 300
 Glu His Pro Lys Arg Trp Gly Gln Val Ser Glu Ala Tyr Val Ser Leu
 305 310 315 320
 Leu Asp Leu Thr Pro Thr Ile Leu Asp Trp Phe Ser Ile Pro Tyr Pro
 325 330 335
 Ser Tyr Ala Ile Phe Gly Ser Lys Thr Ile His Leu Thr Gly Arg Ser
 340 345 350
 Leu Leu Pro Ala Leu Glu Ala Glu Pro Leu Trp Ala Thr Val Phe Gly
 355 360 365
 Ser Gln Ser His His Glu Val Thr Met Ser Tyr Pro Met Arg Ser Val
 370 375 380
 Gln His Arg His Phe Arg Leu Val His Asn Leu Asn Phe Lys Met Pro
 385 390 395 400
 Phe Pro Ile Asp Gln Asp Phe Tyr Val Ser Pro Thr Phe Gln Asp Leu
 405 410 415
 Leu Asn Arg Thr Thr Ala Gly Gln Pro Thr Gly Trp Tyr Lys Asp Leu
 420 425 430
 Arg His Tyr Tyr Tyr Arg Ala Arg Trp Glu Leu Tyr Asp Arg Ser Arg
 435 440 445
 Asp Pro His Glu Thr Gln Asn Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Ala Gln
 450 455 460
 Leu Leu Glu Met Leu Arg Asp Gln Leu Ala Lys Trp Gln Trp Glu Thr
 465 470 475 480
 His Asp Pro Trp Val Cys Ala Pro Asp Gly Val Leu Glu Glu Lys Leu
 485 490 495
 Ser Pro Gln Cys Gln Pro Leu His Asn Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val
 500 505 510
 Ile Asp Ala Leu Gln Tyr Lys Leu Glu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Arg
 515 520 525
 Lys Arg Gly Leu Lys Leu Ala Thr Ala Leu Ser Leu Ser Asn Lys Phe
 530 535 540
 Val Glu Gly Ser Arg Ser
 545 550

5 <210> 27
 <211> 709
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(709)

5 <400> 27

gctagcaggt taatTTTTaa aaagcagtca aaagtccaag tggcccttgg cagcatttac	60
tctctctggt tgctctggtt aataatctca ggagcacaaa cattccagat ccaggttaat	120
ttttaaaaag cagtcaaaaag tccaagtggc ccttggcagc atttactctc tctgtttgct	180
ctgggtaata atctcaggag cacaaacatt ccagatccgg cgcgccaggg ctggaagcta	240
cctttgacat catttcctct gcgaatgcat gtataatttc tacagaacct attagaaagg	300
atcacccagc ctctgctttt gtacaacttt cccttaaaaa actgccaatt cactgctgt	360
ttggcccaat agtgagaact ttttcctgct gcctcttggg gcttttgcct atggccccta	420
ttctgctgc tgaagacact cttgccagca tggacttaaa cccctccagc tctgacaatc	480
ctctttctct tttgttttac atgaagggtc tggcagccaa agcaatcact caaagttcaa	540
accttatcat tttttgcttt gttcctcttg gccttgggtt tgtacatcag ctttgaaaat	600
accatcccag ggtaaatgct ggggttaatt tataactaag agtgctctag ttttgcaata	660
caggacatgc tataaaaatg gaaagatggt gctttctgag agactgcag	709

10 <210> 28
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> cebador

20 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(26)

<400> 28

cgtccccgga acgcactgct gctcct	26
------------------------------	----

25 <210> 29
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> cebador

35 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(36)

<400> 29

gcggcctcta gatgacagct cattgtggag gggctg	36
---	----

40 <210> 30
 <211> 78
 <212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador

ES 2 661 967 T3

<220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(78)
 5 <400> 30
 ggccgcatgc cgtcttctgt ctcgtggggc atcctcctgc tggcaggcct gtgctgcctg 60
 gtccctgtct ccctggct 78
 10 <210> 31
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <220>
 <221> unión_cebador
 20 <222> (1)..(74)
 <400> 31
 agccagggag acagggacca ggcagcacag gcctgccagc aggaggatgc cccacgagac 60
 agaagacggc atgc 74
 25 <210> 32
 <211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <220>
 <221> unión_cebador
 35 <222> (1)..(81)
 <400> 32
 ggccgcatgc ccccgccccg caccggccgc ggctgctgt ggctgggcct ggtgctgagc 60
 40 agcgtgtgcg tggccctggg c 81
 <210> 33
 <211> 77
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 50 <220>
 <221> unión_cebador
 <400> 33
 gcccagggcc acgcacacgc tgctcagcac caggcccagc cacagcaggc cgcggccggt 60
 gcggggcggg ggcattgc 77
 55 <210> 34
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador
 5 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(27)
 <400> 34
 10 agatctctgt cattgatgca ctgcagt 27
 <210> 35
 <211> 29
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <220>
 <221> unión_cebador
 <222> (1)..(29)
 25 <400> 35
 agatctacta ccctccacaa atttgtgc 29

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia nucleotídica que codifica una sulfatasa quimérica, consistiendo dicha sulfatasa quimérica en el orden de secuencia N-terminal-C-terminal: a) un péptido señal o bien de la secuencia aminoacídica de α -antitripsina humana (hAAT) o la secuencia aminoacídica de iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana, perteneciendo dicha secuencia al siguiente grupo de SEQ ID No. 2 o SEQ ID No. 4; b) una secuencia aminoacídica de sulfatasa humana desprovista de su péptido señal y c) el dominio de unión a LDLR de ApoB.
2. La secuencia nucleotídica según la reivindicación 1, en la que la sulfatasa humana es sulfamidasa humana.
3. La secuencia nucleotídica según la reivindicación 2, en la que la sulfamidasa humana tiene la secuencia de SEQ ID No. 8.
4. La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio de unión a LDLR de ApoB tiene la secuencia de SEQ ID No. 10.
5. La secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene la secuencia perteneciente al siguiente grupo:
 - a) ensamblaje del módulo hAATsp-SGSH-3xflag de SEQ ID No. 11,
 - b) ensamblaje del módulo hIDSsp-SGSH-3xflag de SEQ ID No. 13,
 - c) ensamblaje del módulo hAATsp-SGSH-3xflag-ApoB de SEQ ID No. 15,
 - d) ensamblaje del módulo hIDSsp-SGSH-3xflag-ApoB de SEQ ID No. 17,
 - e) ensamblaje del módulo hAATsp-SGSH de SEQ ID No. 19,
 - f) ensamblaje del módulo hIDSsp-SGSH de SEQ ID No. 21,
 - g) ensamblaje del módulo hAATsp-SGSH-ApoB de SEQ ID No. 23,
 - h) ensamblaje del módulo hIDSsp-SGSH-ApoB de SEQ ID No. 25.
6. Un plásmido recombinante que comprende la secuencia nucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores bajo el control de un promotor específico del hígado, preferiblemente el promotor específico del hígado es el promotor de globulina de hormona tiroidea humana (TBG), más preferiblemente el promotor de globulina de hormona tiroidea humana (TBG) tiene la secuencia de SEQ ID No. 27.
7. El plásmido recombinante según la reivindicación 6, que es capaz de ensamblarse en un vector vírico para terapia génica de trastornos lisosómicos pertenecientes al grupo de: vector lentivíricos, vectores adenovíricos dependientes de auxiliares o vectores de AAV, preferiblemente es el plásmido recombinante AAV2.1.
8. Un vector vírico que comprende el plásmido recombinante según la reivindicación 6 o 7.
9. El vector vírico según la reivindicación 8 perteneciente al grupo de vectores víricos de AAV, preferiblemente el vector de AAV de serotipo 8.
10. Una sulfatasa quimérica consistente en el orden de secuencia N-terminal-C-terminal: a) un péptido señal de o bien la secuencia aminoacídica de α -antitripsina humana (hAAT) o la secuencia aminoacídica de iduronato-2-sulfatasa (IDS) humana, perteneciendo dicha secuencia aminoacídica al siguiente grupo de SEQ ID No. 2 o SEQ ID No. 4; b) una secuencia aminoacídica de sulfatasa humana desprovista de su péptido señal y c) el dominio de unión a LDLR de ApoB.
11. La sulfatasa quimérica según la reivindicación 10, en la que la sulfatasa humana es sulfamidasa humana, preferiblemente la secuencia aminoacídica de sulfamidasa humana tiene la secuencia de SEQ ID No. 8.
12. La sulfatasa quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 anteriores, en la que el dominio de unión a LDLR de ApoB tiene la secuencia de SEQ ID No. 10.
13. La sulfatasa quimérica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 10 a 12, que tiene la secuencia perteneciente al siguiente grupo:
 - a) hAATsp-SGSH-3xflag de secuencia aminoacídica SEQ ID No. 12,
 - b) hIDSsp-SGSH-3xflag de secuencia aminoacídica SEQ ID No. 14,
 - c) hAATsp-SGSH-3xflag-ApoB de secuencia aminoacídica SEQ ID No. 16,

- d) hIDSsp-SGSH-3xflag-ApoB de secuencia aminoacídica SEQ ID No. 18,
 - e) hAATsp-SGSH de secuencia aminoacídica SEQ ID No. 20,
 - f) hIDSsp-SGSH de secuencia aminoacídica SEQ ID No. 22,
 - g) hAATsp-SGSH-ApoB de secuencia aminoacídica SEQ ID No. 24,
 - 5 h) hIDSsp-SGSH-ApoB de secuencia aminoacídica SEQ ID No. 26.
14. El plásmido recombinante según la reivindicación 6 o 7 o el vector vírico según la reivindicación 8 o 9 o la sulfatasa quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 anteriores para uso como medicamento.
15. El plásmido recombinante o vector vírico o sulfatasa quimérica según la reivindicación 14 para uso en el tratamiento de trastornos lisosómicos.
- 10 16. El plásmido recombinante o vector vírico o sulfatasa quimérica según la reivindicación 14 para uso en el tratamiento de MPS, preferiblemente la MPS es MPS de tipo IIIA.
17. El plásmido recombinante o vector vírico o sulfatasa quimérica para uso según la reivindicación 15 o 16, en los que dicho uso es mediante terapia génica.
- 15 18. Una composición farmacéutica que comprende el plásmido recombinante según la reivindicación 6 o 7 o el vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 anteriores o la sulfatasa quimérica según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 anteriores y diluyentes y/o excipientes y/o portadores adecuados.
19. La composición farmacéutica según la reivindicación 18 para uso en el tratamiento de trastornos lisosómicos, preferiblemente MPS, más preferiblemente MPS de tipo IIIA.

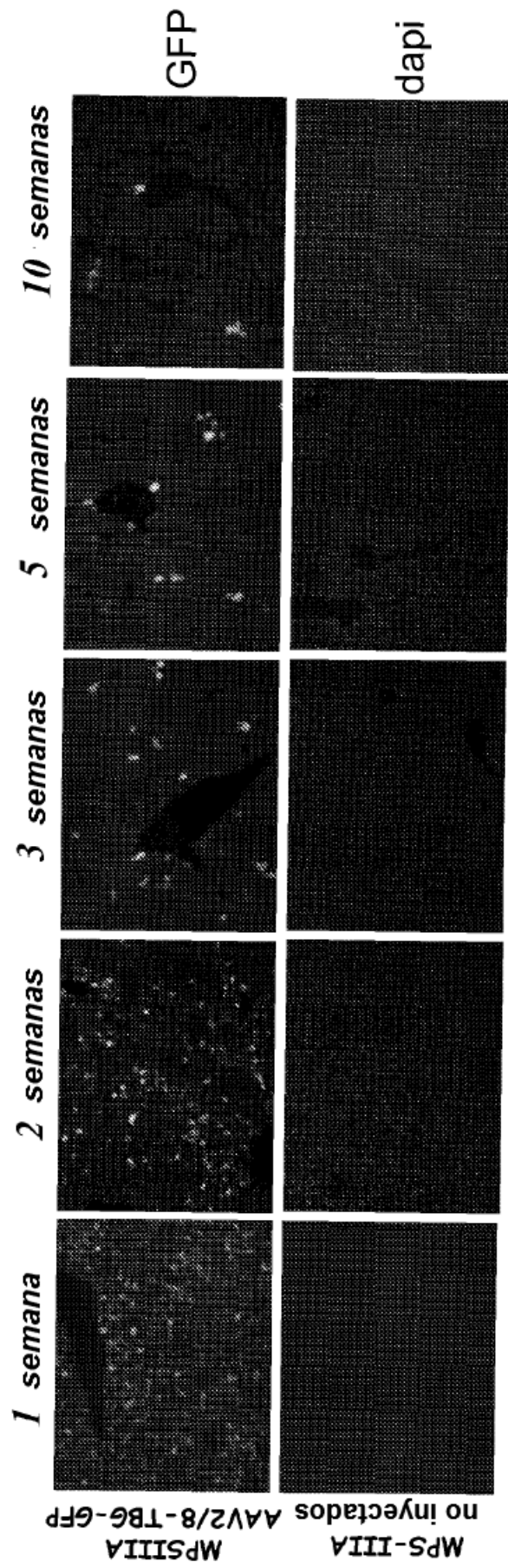


Figura 1

Actividad de SGSH en suero

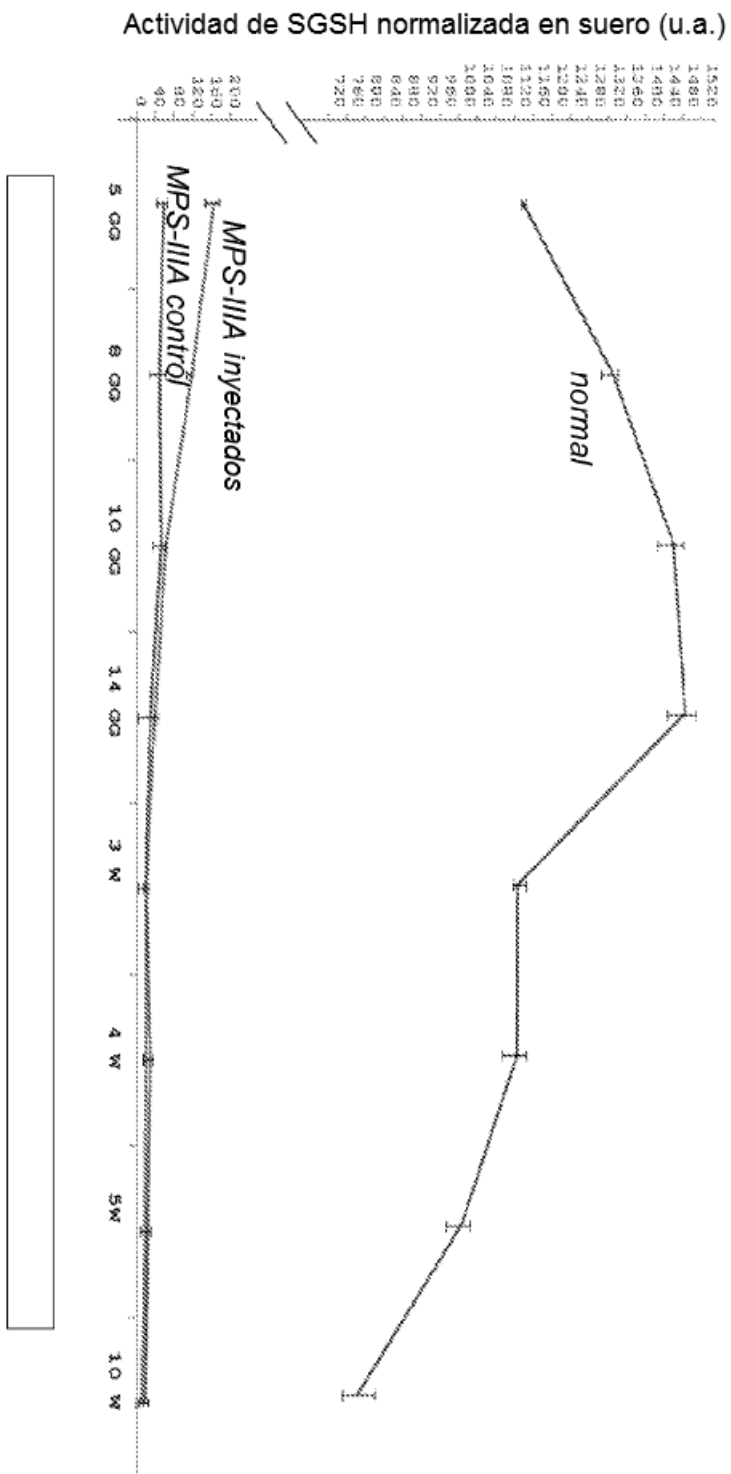


Figura 2A

Actividad de SGSH en el hígado

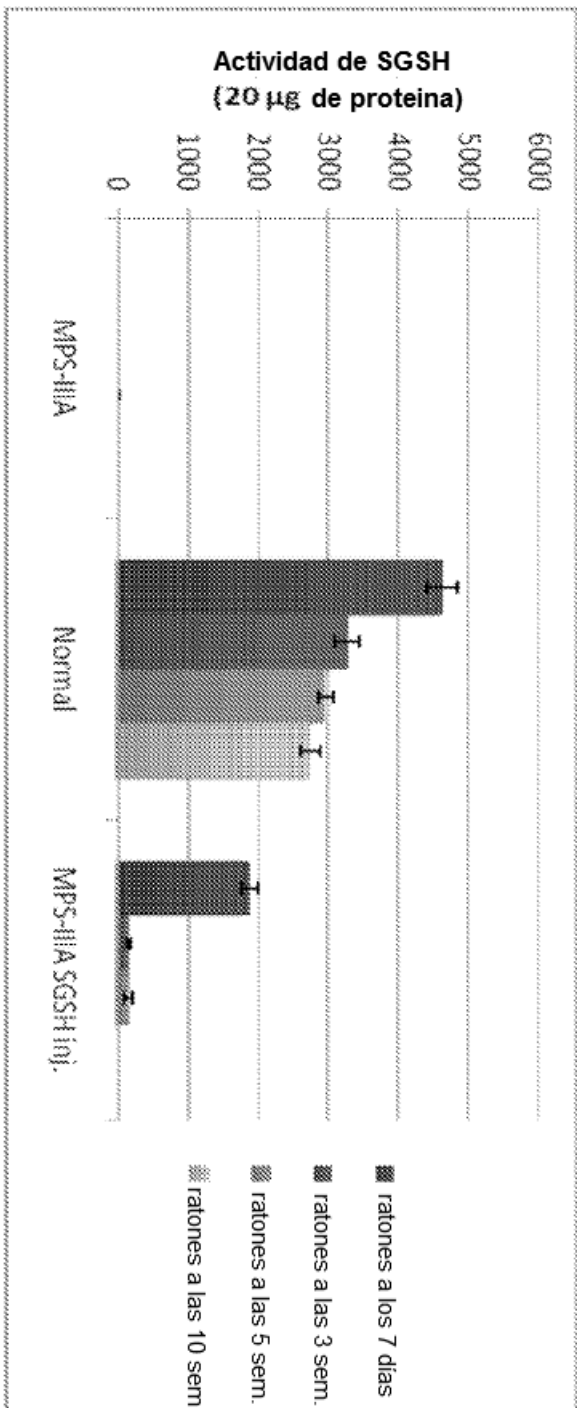


Figura 2B

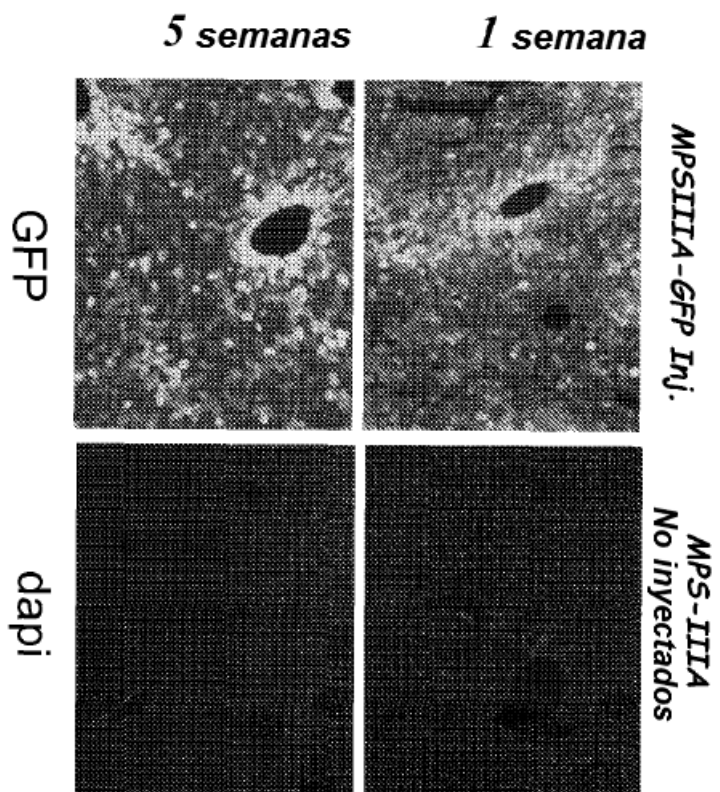
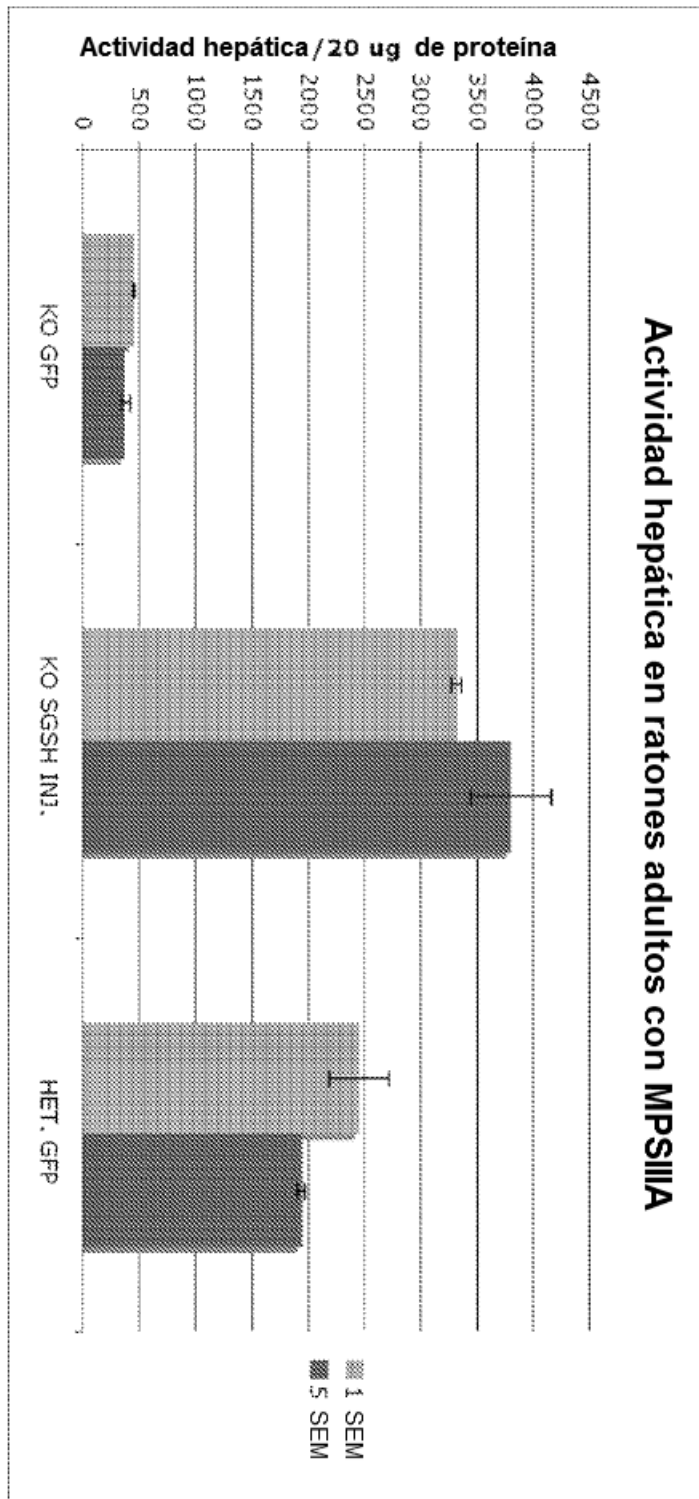
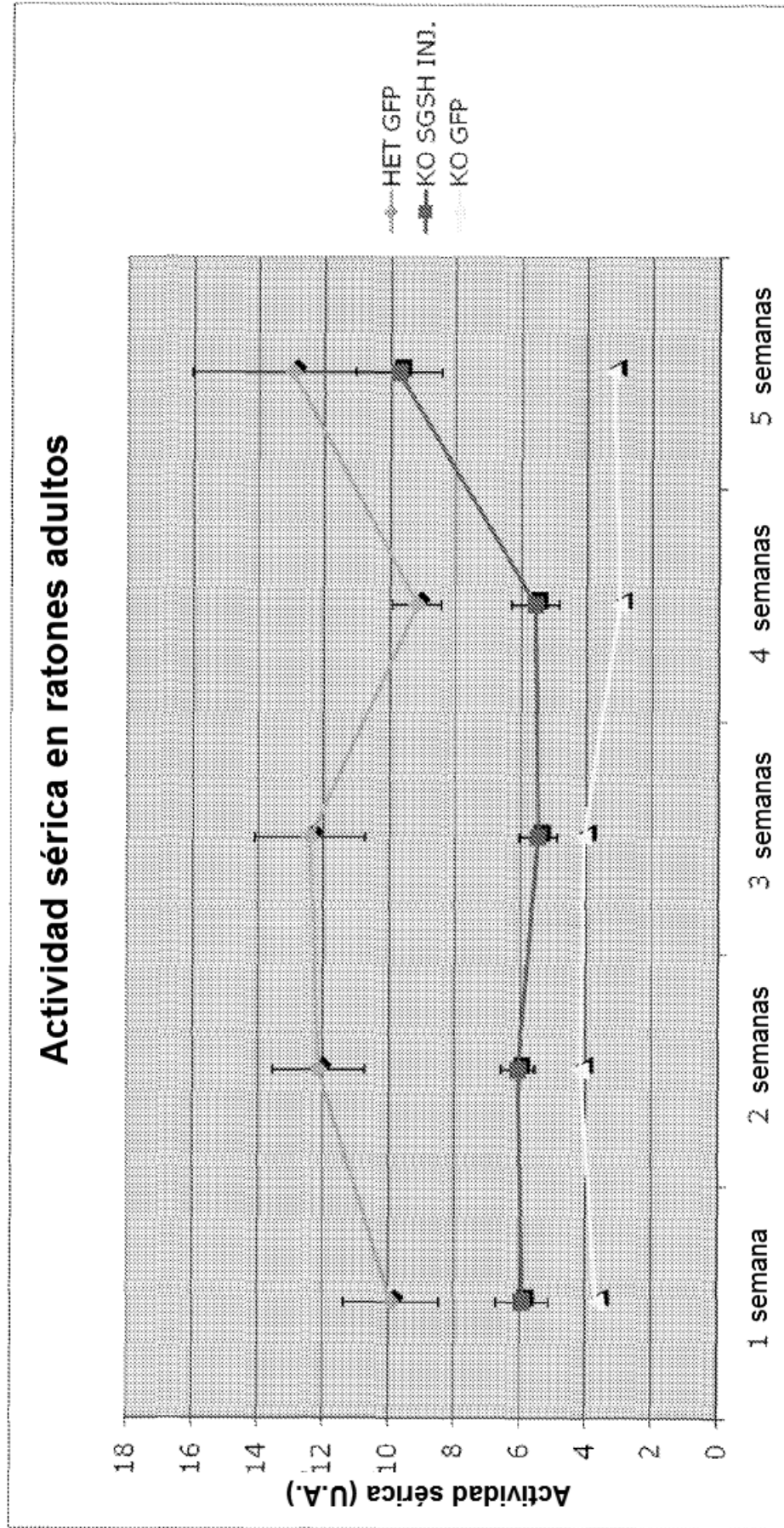


Figura 3

**Figura 4A**

**Figura 4B**

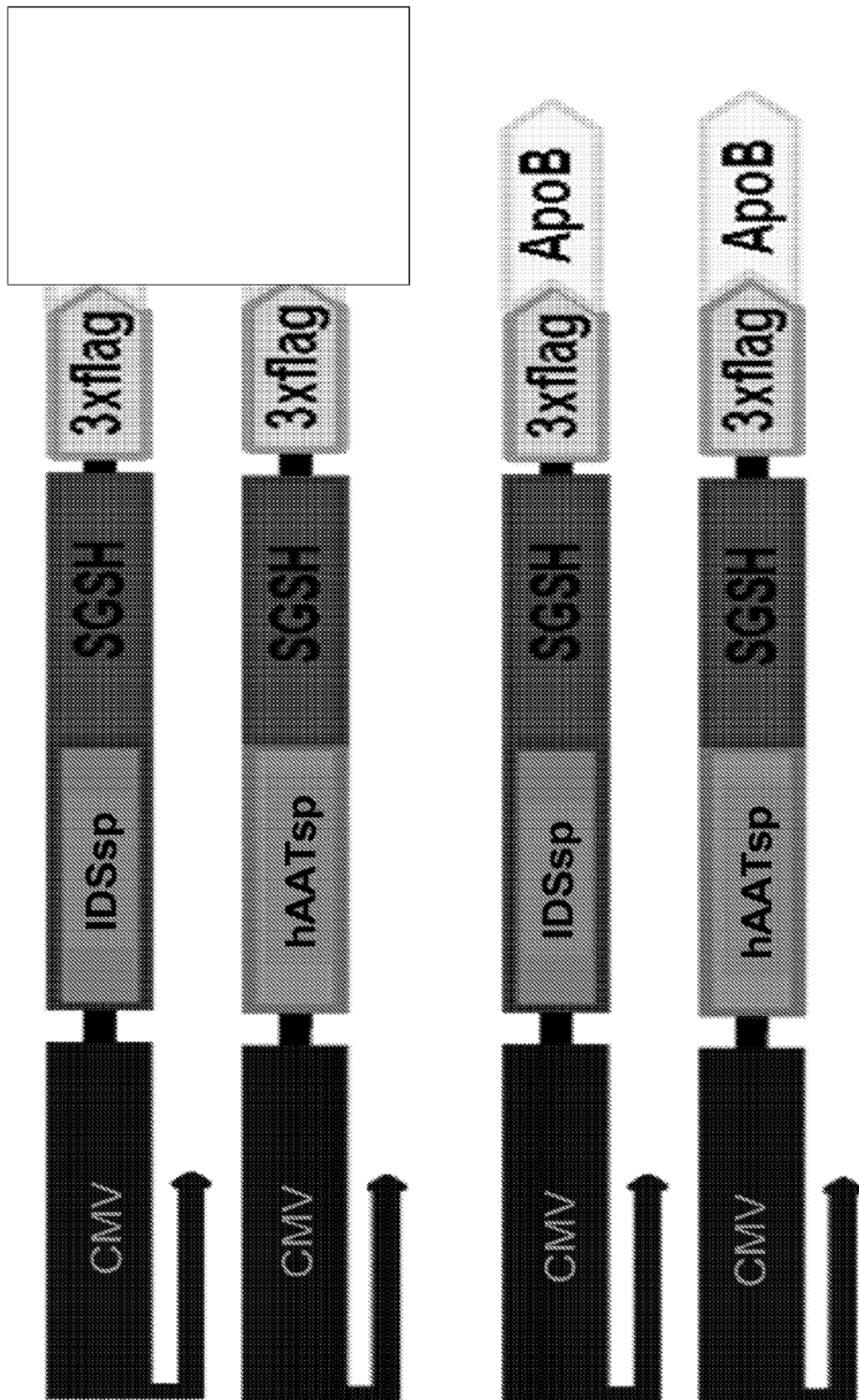


Figure 5

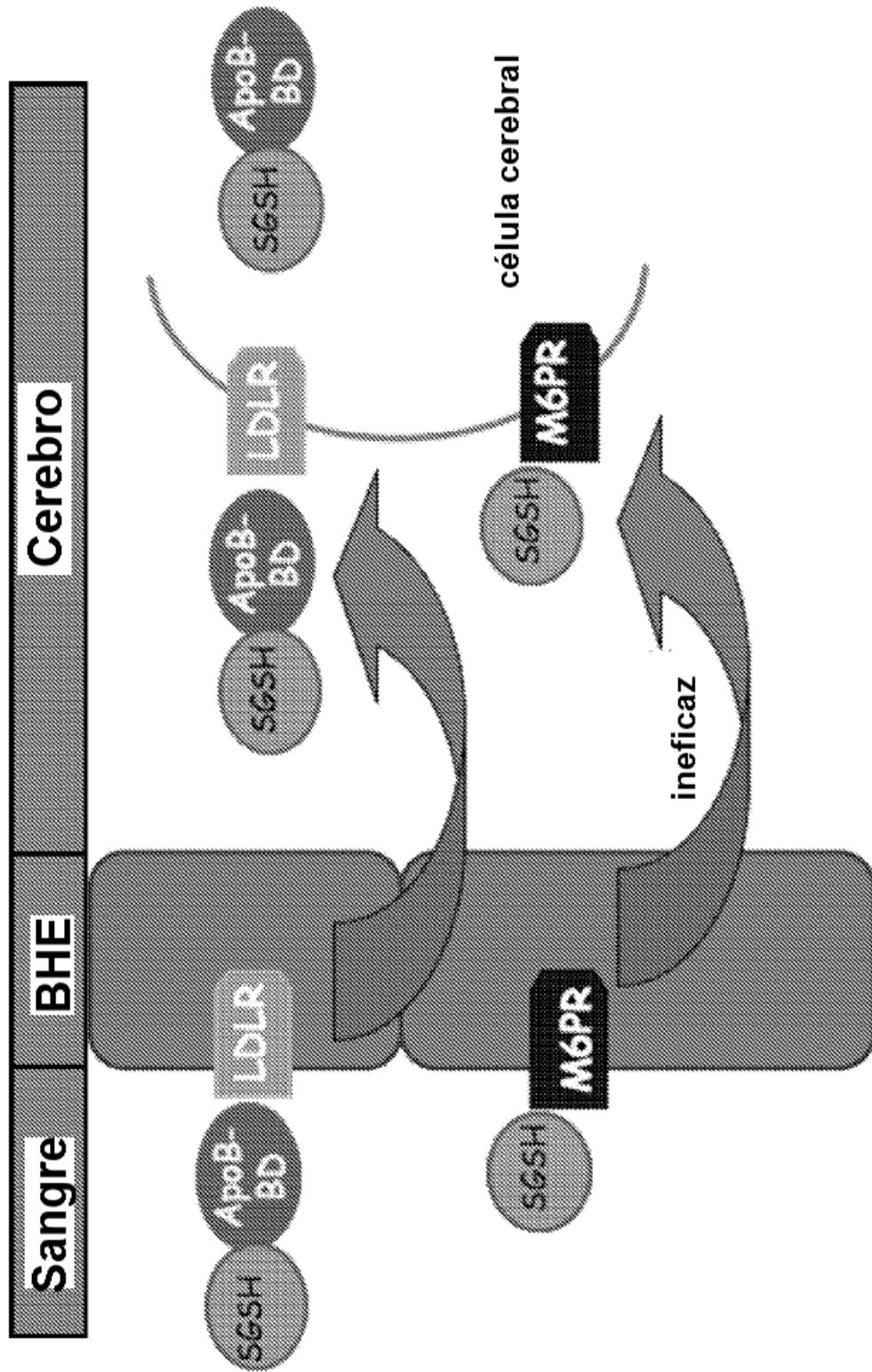


Figura 6

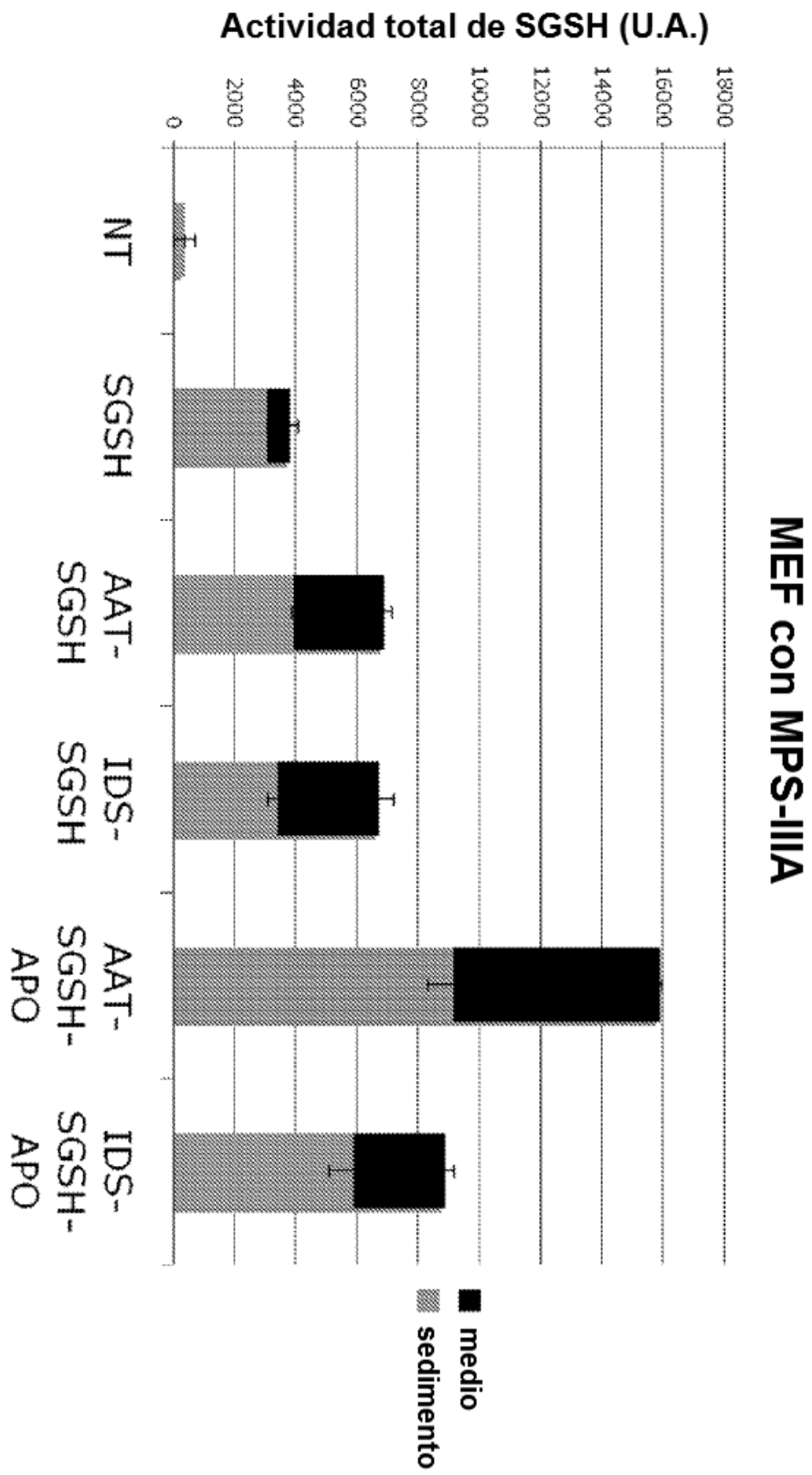


Figura 7A

Eficacia de secreción en MEF con MPSIIIA

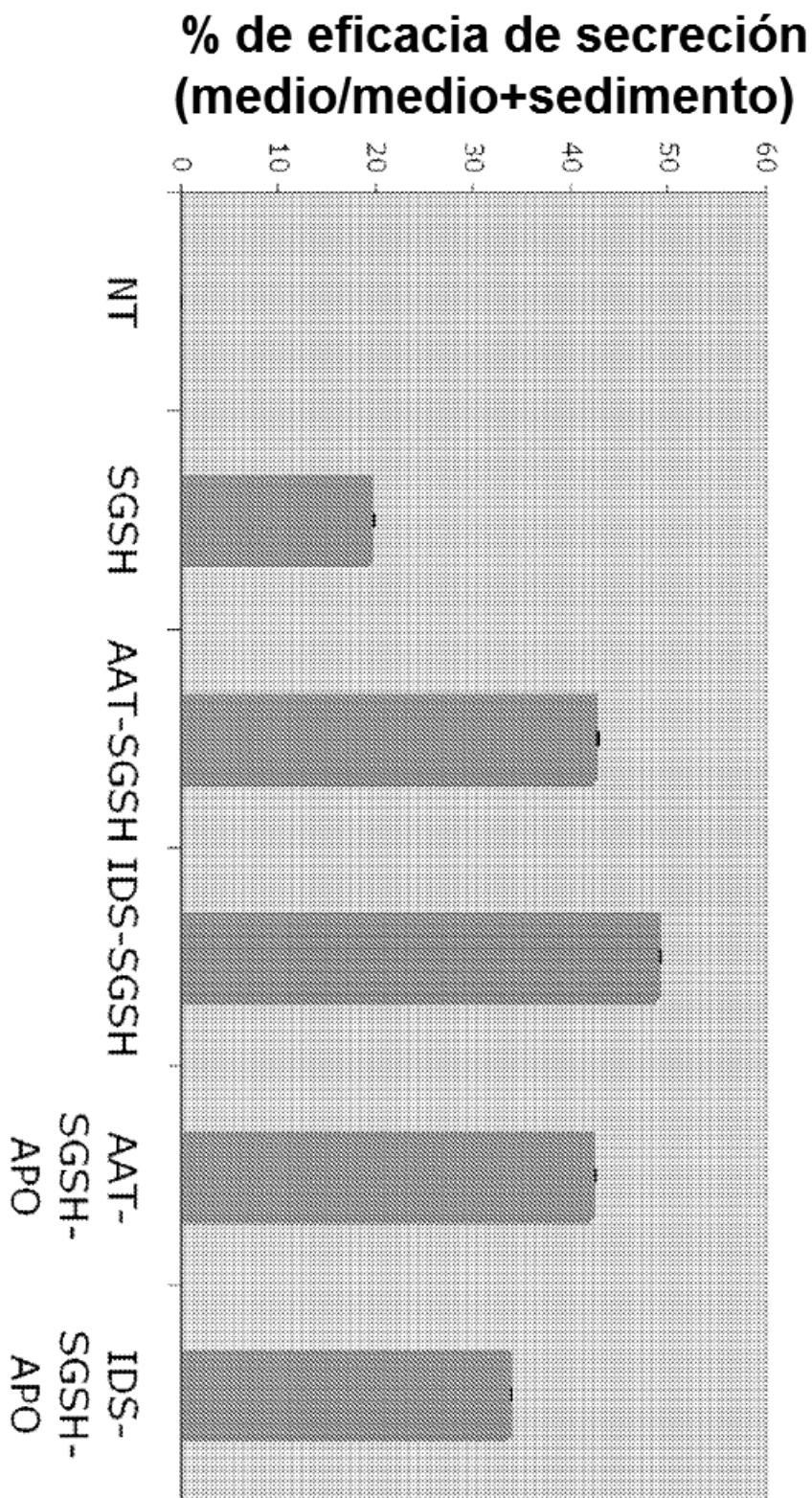


Figura 7B

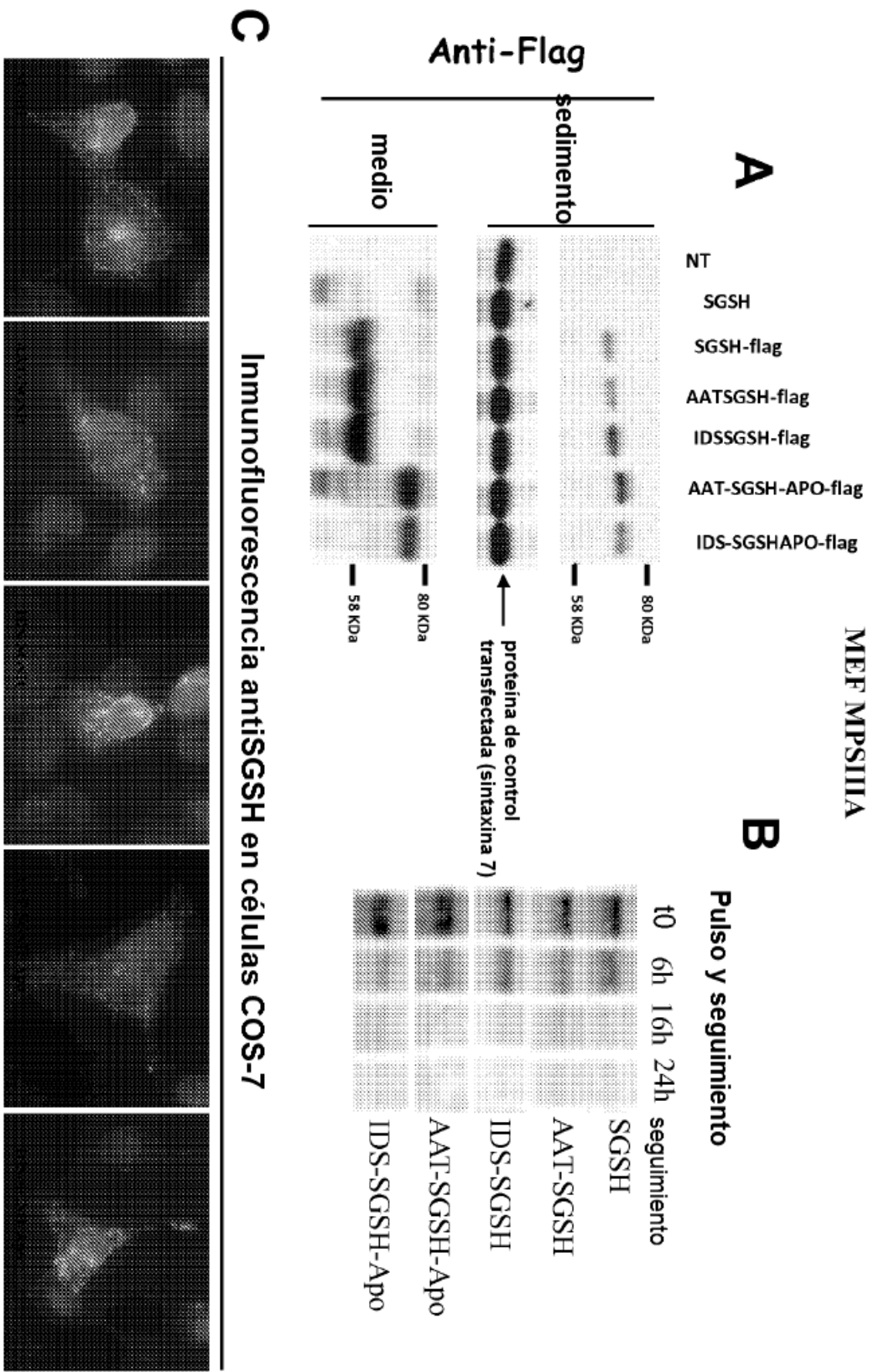
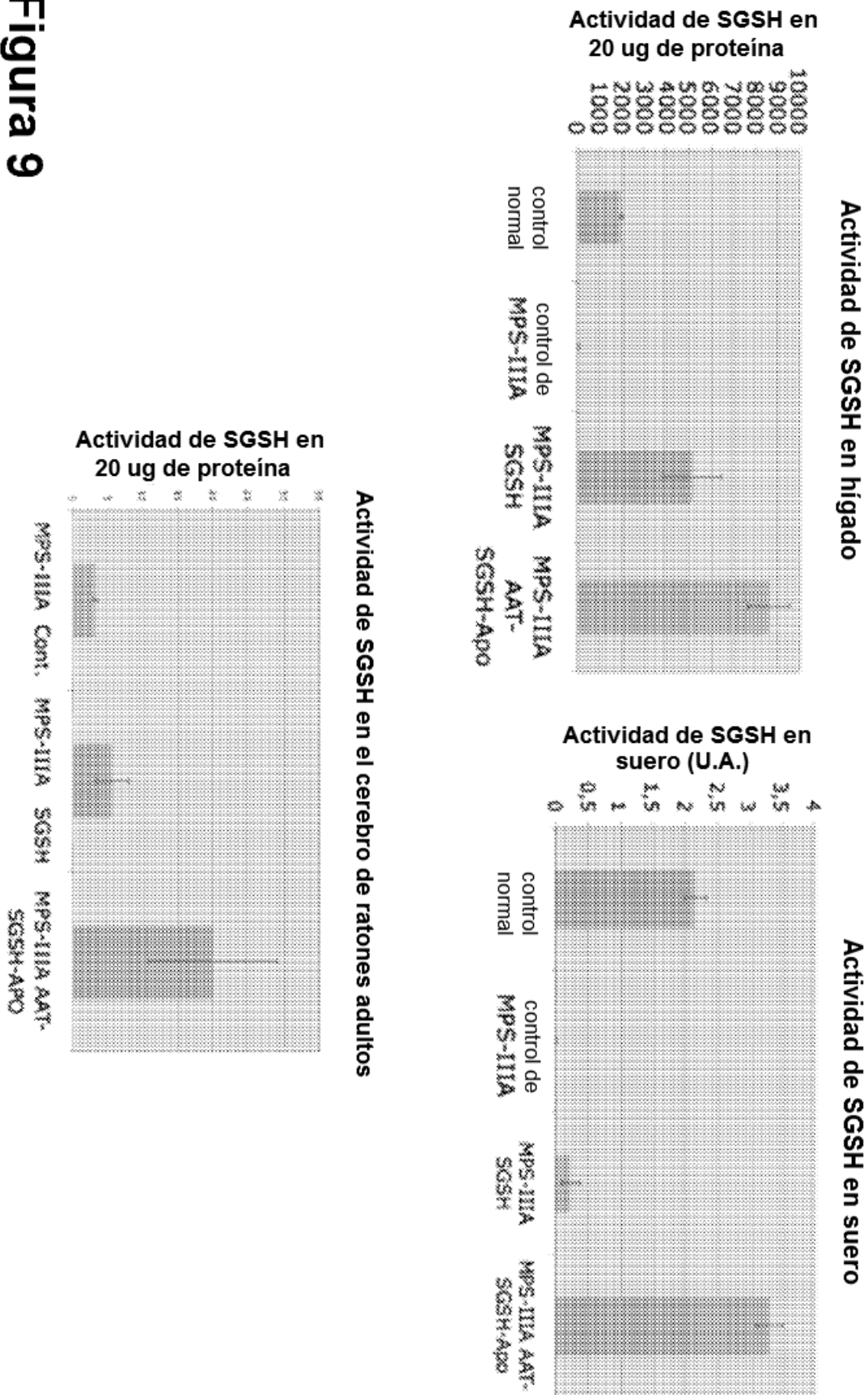


Figura 8

Figura 9



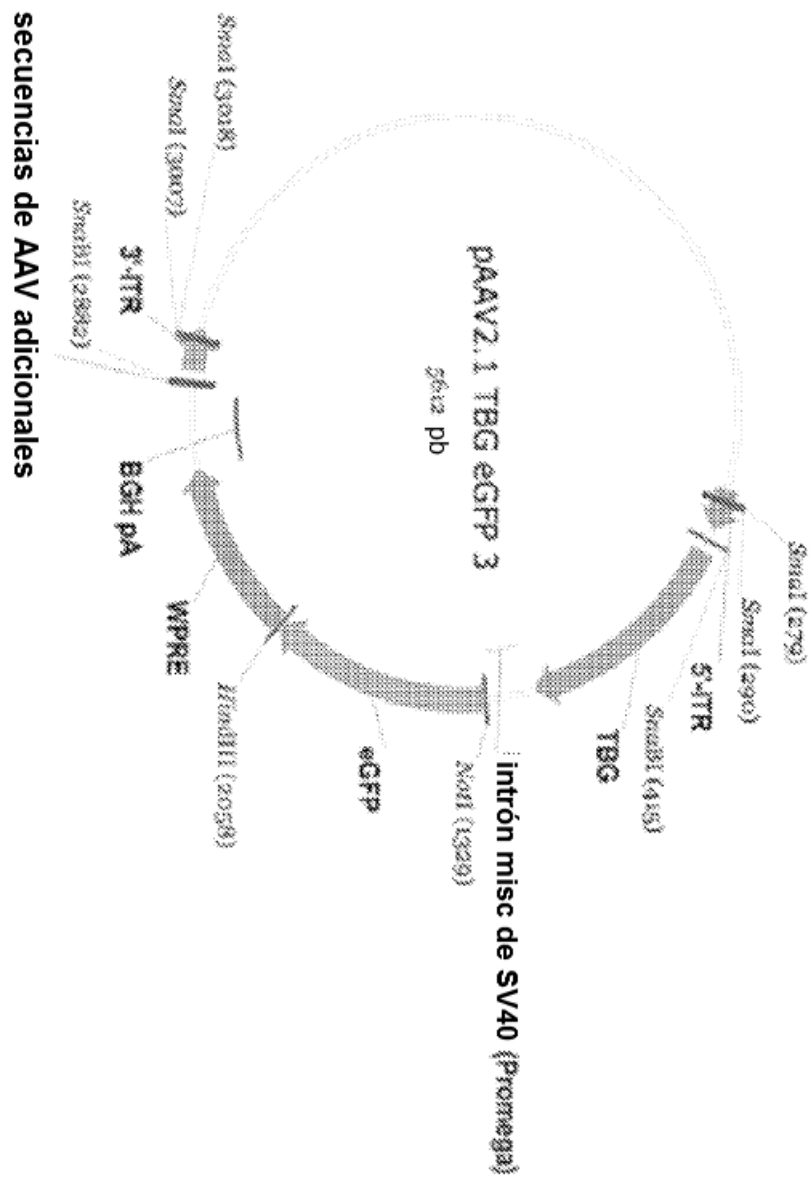


FIG. 10