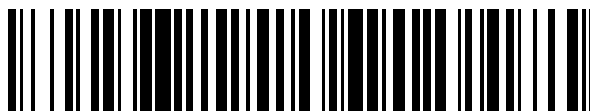


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 561**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2013 PCT/US2013/057632**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014 WO14036468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2013 E 13773443 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2890791**

54 Título: **Transferencia del gen acuaporina mediada por un virus adenoasociado (aav) para el tratamiento del síndrome de Sjögren**

30 Prioridad:

31.08.2012 US 201261695753 P

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

04.11.2019

73 Titular/es:

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

**6011 Executive Boulevard, Suite 325, MSC 7660
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

CHIORINI, JOHN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 729 561 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

Transferencia del gen acuaporina mediada por un virus adenoasociado (aav) para el tratamiento del síndrome de Sjögren

5

CAMPO

La presente invención se refiere al uso de una terapia génica para proteger a las personas que sufren del síndrome de Sjögren, de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. También se refiere al tratamiento de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren en pacientes que sufren de dicha xerostomía. Más específicamente, la presente invención se refiere a vectores de virus adenoasociados y viriones que codifican la proteína acuaporina-1, y al uso de dichos vectores y viriones para tratar a un sujeto que sufre de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren.

15 ANTECEDENTES/ INTRODUCCIÓN

El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune sistémica donde las células inmunitarias atacan y destruyen las glándulas exocrinas que producen saliva y lágrimas. El síndrome de Sjögren también puede afectar a múltiples órganos, incluidos los riñones y los pulmones. Se estima que aproximadamente 4 millones de personas en los Estados Unidos sufren del síndrome de Sjögren. Nueve de cada diez pacientes con Sjögren son mujeres, con la edad de aparición promedio siendo cerca de los 40 años. El síndrome de Sjögren puede ocurrir en todos los grupos etarios, tanto de mujeres como de hombres. El síndrome de Sjögren puede ocurrir independientemente, caso en que se lo denominaba como síndrome de Sjögren primario, o puede desarrollarse años después de la aparición de un trastorno reumático asociado, caso en que se lo denominará síndrome de Sjögren secundario. La prevalencia del síndrome de Sjögren primario varía entre aproximadamente el 0,05 % y el 5 % de la población, y se ha informado que la incidencia de casos diagnosticados es de aproximadamente 4 por 100,000 personas por año (Kok y col., 2003, Ann Rheum Dis 62, 11038-1046).

La xerostomía (boca seca) y la xeroftalmía (conjuntivitis sicca, ojos secos) son características del síndrome de Sjögren (Fox y col., 1985, Lancet 1, 1432-1435). Las células epiteliales glandulares activadas inmunológicamente o apoptóticas que exponen autoantígenos en individuos predispuestos podrían provocar una lesión tisular mediada de manera autoinmunitaria (véase, por ejemplo, Voulgarelis y col., 2010m Nat Rev Rheumatol 6, 529-537; Xanthou y col., 1999, Clin Exp Immunol 118, 154-163). La activación inmunitaria se presenta típicamente como infiltrados de células focales, mononucleares (T, B y macrófagos) proximales a las células epiteliales ductales (epitelitis) y forma sialadenitis (véase, por ejemplo, Voulgarelis y col., Ibid.). Aunque el mecanismo patogénico para esta exocrinopatía autoinmune no se ha aclarado por completo, se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ constituyen entre el 60 y el 70 por ciento de las células mononucleares que se infiltran en las glándulas (véase, por ejemplo, Skopouli y col., 1991, J Rheumatol 18, 210-214). Se ha informado que la activación anormal de las células proinflamatorias Th1 (véase, por ejemplo, Bombardieri y col., 2004, Arthritis Res Ther 6, R447-R456; Vosters y col., 2009, Arthritis Rheum 60, 3633-3641) y Th17 (véase, por ejemplo, Nguyen y col., 2008, Arthritis and Rheumatism 58, 734-743) es central para la introducción del SS en modelos humanos o animales.

La activación de las células Th1 y Th17 se inicia mediante la presentación del antígeno, que requiere el compromiso no solo del receptor de células T (TCR) a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de las células presentadoras de antígeno (APC), sino también de la señalización coestimuladora adecuada (véase, por ejemplo, Smith-Garvin y col., 2009, Ann Rev Immunol 27, 591-619). Una de las vías cruciales de la coestimulación es la interacción de CD28 en la célula T con B7.1 (CD80)/ B7.2 (CD86) en células presentadoras de antígeno. El antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4; también denominado CD152) muestra una amplia gama de actividades en la tolerancia inmune. La función principal del CTLA-4 es unirse a B7 y competir por su interacción con CD28, con lo que se detiene la ruta B7: CD28 y, posteriormente, se inicia la desactivación de la respuesta de las células T y se mantiene la homeostasis inmune (véase, por ejemplo, Perkins y col., 1996, J Immunol 156, 4154-4159). Además, el CTLA-4 se expresa de forma constitutiva en las células T reguladoras naturales CD4+CD25+Foxp3+ (nTreg), que desempeñan un papel crucial en la tolerancia inmune y, en última instancia, en la protección contra enfermedades autoinmunes (véase, por ejemplo, Sakaguchi y col., 2006, Immunological Reviews 212, 8-27). El CTLA-4 es requerido por las células nTreg para suprimir las respuestas inmunes al afectar la potencia de las APC para activar células T efectivas (véase, por ejemplo, Wing y col., 2008, Science 322, 271-275; Takahashi y col., 2000, J Exp Med 192, 303-310). Se sabe que la autoinmunidad de las células T está controlada por los balances entre las células Th17/Treg (véase, por ejemplo, Eisenstein y col., 2009, Pediatric Research 65, 26R-31R) y las células Th1/Th2 (véase, por ejemplo, Nicholson y col., 1996, Current Opinion Immunol 8, 837-842). Por lo tanto, el CTLA-4 podría representar un objetivo terapéutico importante, cambiando el balance de células T de T17 y/o Th1

proinflamatorias hacia la supresión de células Treg y/o Th2. Otras manifestaciones inmunológicas del síndrome de Sjögren incluyen la formación de anticuerpos auto-reactivos, como los anticuerpos antinucleares (ANA), los anticuerpos SSA (por ejemplo, SSA/Ro), los anticuerpos SSB (por ejemplo, SSB/La) y los anticuerpos M3R.

- 5 Mientras que algunos tratamientos que han demostrado ser efectivos para ciertas enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, en la actualidad no existen terapias efectivas para el tratamiento del síndrome de Sjögren. Por ejemplo, se ha demostrado que los agentes del factor de necrosis tumoral (TNF) tienen efectos beneficiosos en el tratamiento de la artritis reumatoide, así como en otras enfermedades y artritis inflamatorias. El Etanercept (ENBREL™), una proteína de fusión del receptor 2 de TNF soluble y la región Fc de la inmunoglobulina IgG1, se comercializa para varias de estas afecciones. Sin embargo, en un ensayo clínico de pacientes con síndrome de Sjögren (véase, por ejemplo, Moutsopoulos y col., 2008, Ann Rheum Dis 67, 1437-1443) se demostró que el Etanercept no es efectivo. Además, se ha demostrado que la administración de un vector de AAV que codifica la proteína de fusión del receptor 1-Fc soluble de TNF a las glándulas salivales de un modelo murino del síndrome de Sjögren tiene un efecto negativo en la función de las glándulas salivales (véase, por ejemplo, Vosters y col., 2009, Arthritis Res Ther 11, R189).

Como se analizó anteriormente, una característica del síndrome de Sjögren es la xerostomía (boca seca), que resulta de la destrucción de las glándulas salivales mediada por el sistema inmunitario y la posterior pérdida de la capacidad de producir saliva. La acuaporina-1 (AQP-1; anteriormente conocida como CHIP28) es una proteína de 28 kilodaltones presente en los túbulos renales y eritrocitos, que tiene similitud con otras proteínas de los canales de membrana (véase, por ejemplo, Preston y Agre, 1991, PNAS 88, páginas 11110-11114). La AQP-1 es una proteína de membrana plasmática que forma canales en la membrana, facilitando así el movimiento rápido del agua transmembrana en respuesta a un gradiente osmótico. Aunque los miembros de esta familia generalmente muestran solo un 30 % de identidad, se conservan varias características. Por ejemplo, el tamaño total de cada subunidad es de aproximadamente 30 kDa. Además, los análisis de hidropatía de estas proteínas son similares, lo que sugiere seis hélices transmembrana y la presencia de dos motivos distintivos de Asn-Pro-Ala (o variantes cercanas). Un análisis estructural detallado de AQP-1 ha sido descrito por Heymann y col., Journal of Structural Biology 121, 191-206 (1998).

- 30 De manera similar, se ha identificado una familia de proteínas de acuaporina, que incluye AQP-2, AQP-3, AQP-4, AQP-5, AQP-6, AQP-7, AQP-8, AQP-9, AQP-10 y AQP -11,

El trabajo anterior ha intentado usar la transferencia mediada por virus de un gen que codifica la AQP-1 para restaurar la secreción de líquido en las glándulas parótidas de cerdos en miniatura sometidos a radiación para destruir la función de la glándula parótida (véase, por ejemplo, Gao y col., 2011, Gene Therapy, 18, páginas 38-42). Sin embargo, no hay informes de que alguien intente restaurar el flujo de saliva en pacientes que sufren del síndrome de Sjögren, ya que se cree que la causa de la xerostomía en esta enfermedad está relacionada con el sistema inmunitario, como con los autoanticuerpos o citoquinas proinflamatorias.

- 40 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de una composición eficaz para proteger y tratar a los sujetos que sufren de la xerostomía asociada con el síndrome de Sjögren.

RESUMEN

- 45 La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas por las reivindicaciones. La descripción proporciona un procedimiento basado en la transferencia génica para proteger a un sujeto de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. El procedimiento comprende la administración al sujeto un vector de AAV, o un virión que comprende dicho vector, que codifica una proteína de acuaporina (AQP). También se proporcionan procedimientos para producir tales proteínas AQP, vectores AAV y viriones AAV. También se proporcionan moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas AQP de la invención y sus usos.

La descripción proporciona un tratamiento para la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. Dicho tratamiento comprende un vector de AAV, o un virión que comprende un vector tal, que codifica una proteína AQP-1. La administración de un tratamiento de este tipo a un sujeto lo protege de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren.

La descripción también proporciona un preventivo para la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. Dicho preventivo comprende un vector de AAV, o un virión que comprende un vector tal, que codifica una proteína AQP-1. La administración de un preventivo de este tipo a un sujeto lo protege de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren.

La descripción proporciona una célula de la glándula salival transfectada con un vector de AAV que codifica una proteína AQP-1. La célula de la glándula salival puede ser la de un sujeto con síndrome de Sjögren.

- 5 La descripción también proporciona un virión de AAV que comprende un vector de AAV que codifica una proteína AQP-1 para el tratamiento o prevención de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. También se proporciona el uso de un vector de AAV, o un virión que comprende un vector tal que codifica una proteína AQP-1 para la fabricación de un medicamento para proteger a un sujeto de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 15 **Figura 1. Medición in vitro de la disminución del volumen regulatorio (RVD) después del tratamiento con proteínas morfogenéticas óseas (BMP-6) en células de la glándula salival humana (HSG).** A) La BMP6 induce el cambio de volumen de las células de la HSG, las células se colocaron en la solución salina hipertónica (HTS) en presencia de diferentes dosis de BMP-6 (1 ng, 6 ng o 150 ng), y/o sin BMP-6 como control B) La curva de respuesta a la dosis de BMP-6 induce el cambio de volumen celular. El grupo de 6 ng muestra una inhibición significativa de la recuperación del cambio del volumen celular, los datos se presentan como error estándar de la media.

- 20 **Figura 2.PCR cuantitativa (qPCR) de genes seleccionados.** PCR cuantitativa de genes seleccionados extraídos de células de la HSG después del tratamiento con BMP-6 que muestra acuerdo con los resultados del estudio de micromatrices en muestras de pacientes con síndrome de Sjögren. Los resultados obtenidos usando la plataforma de micromatrices personalizada se validaron mediante el examen de la correlación entre los niveles de expresión en la micromatriz y los resultados de qPCR obtenidos para un subconjunto de genes. Los datos se promedian en al
25 menos dos experimentos independientes.

- 30 **Figura 3. Análisis inmunohistoquímico de células de glándulas salivales humanas (HSG).** Las células de la HSG se trataron con 6 ng/ml de BMP-6 durante 4 días. Las células de la HSG se lavaron calentando (a 37 °C) el tampón fosfato salino y después se sometieron a tinción inmunohistoquímica mediante anticuerpos específicos de antifaloidina y anti-AQP-5.A) En el panel izquierdo, se mostró la faloidina conjugada a tetrametilrodamina (TRITC) con fluorescencia roja.B) En el panel derecho, se mostró el anticuerpo específico para AQP-5 conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) con fluorescencia verde.(En el panel superior: células sin tratamiento de BMP-6; en el panel inferior: células tratadas con BMP-6).

- 35 **Figura 4.La AQP induce la recuperación de la disfunción de RVD en células de la HSG tratadas con BMP-6.** A):Las células de la HSG como control se incubaron con solución HTS solo para estimular la reacción de la RVD sin BMP-6 y AQP-5; la regulación de la RVD en las células de la HSG se inhibió completamente mediante el tratamiento con BMP-6 (6 ng); sin embargo, la disfunción de la RVD se recuperó gradualmente mediante el suministro de AQP-5 con diferentes dosis de 0,1 µg, 0,5 µg, 1,0 µg y 3,0 µg B):La curva de respuesta a la dosis de AQP-5 induce la
40 recuperación de la disfunción de la RVD en el volumen de células de la HSG modificado por BMP-6; los datos se presentan como error estándar de la media.C) Recuperación inducida por AQP1 de la disminución del volumen regulatorio inducida por la adición de solución hipotónica (HTS) de 150 mOsm. Las células de control son células normales de la glándula salival humana (HSG) cultivadas en medios DMEM.BMP6: Células tratadas con 6 ng/ml de BMP6 durante 96 horas. MBP6+AQP-1:Células tratadas con BMP6 y transfectadas con un vector de AAV2 que
45 expresa AQP-1.Acuaporina-1:Células de control tratadas y transfectadas con un vector AAV2 que expresa la AQP-1 sola.

- 50 **Figura 5. Efecto de la AQP-1 sobre la saliva y el flujo de lágrimas en un modelo de ratón del síndrome de Sjögren** A). Cambio en el flujo de saliva estimulada por pilocarpina en ratones Aec1/Aec2 tratados con AAV2-AQP1 en comparación con los controles de GFP; B) Cambio en el flujo de lágrimas estimulado por pilocarpina en ratones Aec1/Aec2 tratados con AAV2-AQP1 en comparación con los controles de GFP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 55 Se entenderá que esta invención se refiere a las realizaciones según las caracterizaciones en las reivindicaciones. También debe entenderse que la terminología usada en esta invención tiene el propósito de describir únicamente la invención particular.

- 60 Tal como se usa en esta invención y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno(una)" y "el(la)" incluye referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las

reivindicaciones pueden ser redactadas de forma que excluyan cualquier elemento opcional. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico. Como tales, los términos "un(a)", "uno(a) o más" y "al menos uno(a)" se pueden usar de manera indistinta. Esta declaración pretende servir como una base antecedente para el uso de dicha terminología exclusiva como "solamente", "únicamente" y similares con relación a la enumeración de los elementos de las reivindicaciones o el uso de una limitación "negativa". De manera similar, los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" se pueden usar indistintamente.

Como se usa en esta invención, los términos aislado, aislamiento, purificado y similares, no se refieren necesariamente al grado de pureza de una célula o molécula de la presente invención. Dichos términos, en cambio, se refieren a células o moléculas que se han separado de su medio natural o de componentes del entorno donde se producen. Por ejemplo, una célula o molécula de origen natural (por ejemplo, una molécula de ADN, una proteína, etc.) presente en un animal vivo, incluidos los humanos, no está aislada. Sin embargo, la misma célula o molécula, separada de algunos o todos los materiales coexistentes en el animal, se considera aislada. Como un ejemplo adicional, según la presente invención, las moléculas de proteína que están presentes en una muestra de sangre obtenida de un individuo se considerarían aisladas. Debe apreciarse que las moléculas de proteína obtenidas de una muestra de sangre de este tipo que usan etapas de purificación adicionales también se denominarán como aisladas, según la noción de que aislado no se refiere al grado de pureza de la proteína.

Los expertos en la materia entenderán que la secuencia de una proteína puede variar, o alterarse, con poco o ningún efecto sobre la actividad de esa proteína. Según la presente invención, tales proteínas se denominan variantes, variantes alélicas, mutantes, isoformas u homólogos. Tales variantes pueden surgir naturalmente como resultado de un individuo que lleva dos alelos diferentes que codifican variantes alélicas, o pueden construirse usando técnicas como la ingeniería genética. Con respecto a la nomenclatura de proteínas y sus variantes, una forma de la proteína puede designarse arbitrariamente como la forma de referencia (por ejemplo, el tipo salvaje) y otras formas designadas como mutantes, variantes, isoformas u homólogos. Por ejemplo, si un alelo particular, y por lo tanto su proteína codificada, se asocia con una característica fenotípica particular (por ejemplo, la ausencia de una enfermedad), o se encuentra en la mayoría de una población, es posible referirse a la forma codificada de la proteína como una "forma de tipo salvaje", mientras que otras formas pueden denominarse variantes, mutantes, isoformas u homólogos. Con respecto a la presente invención, una proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 o SEQ ID NO: 14 se considerará como la proteína del tipo salvaje (wt).

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado según lo entiende comúnmente un experto en la materia al que pertenece esta invención.

La presente invención proporciona una nueva terapia génica para proteger a un sujeto de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. Los inventores han descubierto que la administración de un virión de virus adenoasociado (AAV) que comprende un vector AAV que codifica una proteína acuaporina-1 (AQP-1) a un sujeto protege lo protege de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. Este descubrimiento es sorprendente porque se piensa que el mecanismo del síndrome de Sjögren es autoinmune. Por ejemplo, el síndrome de Sjögren se caracteriza por una inflamación crónica en los epitelios secretores, y se piensa que la pérdida de la función de la glándula está relacionada con esta inflamación en curso. Un mecanismo propuesto para esta pérdida de la función de la glándula en el síndrome de Sjögren es la producción de autoanticuerpos que se unen a los receptores muscarínicos en la superficie de las células acinares, bloqueando así las señales que disparan la función de las células acinares. Dado este mecanismo, es sorprendente que la función salival pueda restaurarse mediante la introducción de AQP-1, ya que se esperaría que la producción continua de anticuerpos inhiba la función de las células acinares.

Proteínas

Como se usa en esta invención, una proteína de acuaporina, también denominada proteína AQP, es cualquier proteína que exhibe actividad de una proteína de acuaporina ejemplar (por ejemplo, acuaporina humana), tal como la capacidad de formar un canal que permita el paso del agua.

Una proteína AQP puede tener una secuencia AQP de tipo salvaje (wt) (es decir, tiene la misma secuencia de aminoácidos que una proteína AQP natural), puede ser cualquier porción de una proteína AQP de tipo salvaje, o puede ser una variante de la proteína AQP natural, siempre que dicha porción o variante retenga la capacidad de formar un canal que permita el paso del agua. Los ensayos para determinar la capacidad de una proteína AQP de la presente invención para formar un canal que permita el paso del agua son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Lui y col., Journal of Biological Chemistry 281, 15485-15495 (2006)).

En una realización, una proteína útil en la presente invención es una proteína AQP-1 que comprende la secuencia de aminoácidos completa de una proteína AQP-1 de origen natural. Un ejemplo de una proteína AQP-1 es la Referencia del NCBI No. NP_932766.1 (SEQ ID NO:2). Otro ejemplo de una proteína AQP-1 es la Referencia del NCBI No. NP_001171989.1 (SEQ ID NO:5). Otro ejemplo de una proteína AQP-1 es la Referencia del NCBI No. NP_001171990.1 (SEQ ID NO:8). Otro ejemplo de una proteína AQP-1 es la Referencia del NCBI No. NP_001171991.1 (SEQ ID NO:14).

En otra realización, una proteína útil en la presente invención es una proteína AQP que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína AQP de origen natural seleccionada de las siguientes: AQP-2, AQP-3, AQP-4, AQP-5, AQP-6, AQP-7, AQP-8, AQP-9, AQP-10 y AQP-11. En la materia se conocen ejemplos de estas proteínas AQP, como la Referencia del NCBI No. NP_000477 (AQP-2), la Referencia del NCBI No. NP_004916 (AQP-3), la Referencia del NCBI No. NP_001641 (AQP-4), la Referencia del NCBI No. NP_001642 (AQP-5), la Referencia del NCBI No. NP_001643 (AQP-6), la Referencia del NCBI No. NP_001161 (AQP-7) y la Referencia del NCBI No. NP_066190 (AQP-9).

En una realización, una proteína AQP-1 es una porción de la secuencia de aminoácidos de una proteína AQP-1, en donde dicha porción de una proteína AQP-1 retiene la capacidad de formar un canal en una membrana celular que permite el paso del agua. También se sabe en la materia que existen varias isoformas de la proteína AQP-1. Por lo tanto, en una realización, una proteína AQP-1 es una isoforma de una proteína AQP-1, donde dicha isoforma retiene la capacidad de formar un canal que permite el paso del agua. En una realización, una proteína AQP-1 es una porción de una isoforma u otra variante natural de una proteína AQP-1, en donde dicha porción retiene la capacidad de formar un canal en una membrana que permite el paso del agua. Los expertos en la materia conocen procedimientos para producir porciones funcionales y variantes de proteínas AQP-1, tales como variantes conservadoras, de proteína AQP-1.

En la presente invención también se incluyen variantes de proteína AQP-1 que han sido alteradas mediante manipulación genética. Con respecto a tales variantes, cualquier tipo de alteración en la secuencia de aminoácidos es permisible siempre que la variante retenga al menos una actividad de la proteína AQP-1 descrita en esta invención. Los ejemplos de tales variaciones incluyen, entre otros, supresiones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, sustituciones de aminoácidos y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, los expertos en la materia entienden bien que uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) aminoácidos a menudo se pueden eliminar de los extremos amino- y/o carboxi-terminales de una proteína sin afectar significativamente la actividad de esa proteína. De manera similar, uno o más aminoácidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) a menudo se pueden insertar en una proteína sin afectar significativamente la actividad de la proteína.

Como se ha indicado, las proteínas variantes aisladas de la presente invención también pueden contener sustituciones de aminoácidos en comparación con la proteína AQP-1 de tipo salvaje descrita en esta invención. Cualquier sustitución de aminoácidos está permitida siempre que la actividad de la proteína no se vea afectada significativamente. A este respecto, en la materia se aprecia que los aminoácidos puedan clasificarse en grupos con base en sus propiedades físicas. Los ejemplos de tales grupos incluyen, entre otros, aminoácidos cargados, aminoácidos no cargados, aminoácidos polares no cargados y aminoácidos hidrófobos. Las variantes preferidas que contienen sustituciones son aquellas donde un aminoácido es sustituido con un aminoácido del mismo grupo. Tales sustituciones se denominan sustituciones conservadoras.

Los residuos naturales pueden dividirse en clases, con base en las propiedades de la cadena lateral:

- 1) hidrófobos: Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) hidrófilos neutrales: Cys, Ser, Thr;
- 3) ácidos: Asp, Glu;
- 4) básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) residuos que afectan la orientación de la cadena: Gly, Pro; y
- 6) aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

Por ejemplo, las sustituciones no conservadoras pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase.

En la realización de cambios de aminoácidos, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de sus características de hidrofobicidad y carga. Los índices hidropáticos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina

(+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos para conferir una función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la materia (Kyte y col., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-31). Se sabe que

- 5 ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntaje hidropático similar y aún retienen una actividad biológica similar. Al realizar cambios basados en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 , y se prefieren aún más particularmente aquellos dentro de $\pm 0,5$.
- 10 También se entiende en la materia que la sustitución de aminoácidos similares se puede realizar de manera efectiva sobre la base de la hidrofiliidad, particularmente cuando se pretende el uso de la proteína o el péptido biológica y funcionalmente equivalente allí creado para la invención inmunológica, como en el caso presente. La mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, gobernada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína. Los
- 15 siguientes valores de hidrofiliidad se asignaron a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al realizar cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 , y se prefieren particularmente aquellos dentro de $\pm 0,5$. También se pueden
- 20 identificar epítomos de secuencias de aminoácidos primarios en base a la hidrofiliidad.

Los expertos en la materia pueden determinar las sustituciones deseadas de aminoácidos (conservadoras o no conservadoras) en el momento que se deseen dichas sustituciones. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos

25 pueden usarse para identificar residuos importantes de la proteína AQP-1, o para aumentar o disminuir la afinidad de las proteínas AQP-1 descritas en esta invención. Las sustituciones de aminoácidos ejemplares se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Sustituciones de aminoácidos	
Aminoácido original	Sustituciones ejemplares
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

- 30 Por lo tanto, en una realización de la presente invención, la variante de proteína AQP-1 comprende al menos una sustitución de aminoácido, donde la sustitución es una sustitución conservadora. En una realización, el aminoácido original es sustituido con una sustitución que se muestra en la Tabla 1.

- 35 Mientras que las proteínas de la presente invención pueden consistir en su totalidad en las secuencias descritas en esta invención, y las variantes descritas de las mismas, dichas proteínas pueden contener adicionalmente secuencias de aminoácidos que no confieren actividad AQP-1, pero que presentan otras funciones útiles. Cualquier

- secuencia de aminoácidos adicional y útil puede agregarse a la secuencia de proteína aislada, siempre que las secuencias adicionales no tengan un efecto no deseado en la capacidad de la proteína para formar un canal que permita el paso del agua. Por ejemplo, las proteínas aisladas de la presente invención pueden contener secuencias de aminoácidos que son útiles para visualizar o purificar el péptido. Dichas secuencias actúan como marcadores (por ejemplo, enzimas) o etiquetas (por ejemplo, sitios de unión de anticuerpos). Los ejemplos de tales marcadores y etiquetas incluyen, entre otros, β -galactosidasa, luciferasa, glutatión-s-transferasa, tiorredoxina, etiquetas HIS, etiquetas de biotina y etiquetas fluorescentes. Los expertos en la materia conocen otras secuencias útiles para marcar y etiquetar proteínas.
- 10 Además de las modificaciones descritas anteriormente, las proteínas aisladas de la presente invención pueden modificarse aún más, siempre que dicha modificación no afecte significativamente la capacidad de la proteína para formar un canal que permita el paso del agua. Dichas modificaciones pueden realizarse, por ejemplo, para aumentar la estabilidad, solubilidad o capacidad de absorción de la proteína. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen, entre otros, pegilación, glicosilación, fosforilación, acetilación, miristilación, palmitoilación, amidación y/u otra
- 15 modificación química del péptido.

Una proteína AQP-1 de la invención se puede derivar de cualquier especie que exprese una proteína AQP-1 funcional. Una proteína AQP-1 de la presente invención puede presentar la secuencia de una proteína AQP-1 humana o de otro mamífero o una porción de la misma. Los ejemplos adicionales incluyen, entre otros, murinos, felinos, caninos, equinos, bovinos, ovinos, porcinos u otros animales de compañía, otros animales del zoológico u otras proteínas AQP-1 de ganado. En una realización, una proteína AQP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína AQP-1 humana o una porción de la misma. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos AQP-1 derivada de seres humanos es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:11. En una realización, una proteína AQP-1 tiene la secuencia de aminoácidos de una proteína AQP-1 murina o una porción de la misma. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos AQP-1 derivada de un ratón es la representada en la SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1 se deriva de la especie que está siendo protegida de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. En una realización, una proteína AQP-1 se deriva de una especie para la cual la proteína no es inmunogénica en el sujeto siendo protegido de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren.

30 Una realización de la presente invención es una proteína AQP-1 unida a un segmento de fusión; tal proteína se denomina proteína de fusión AQP-1. Dicha proteína tiene un dominio de proteína AQP-1 (también denominado en esta invención como dominio de AQP-1) y un segmento de fusión. Un segmento de fusión es un segmento de aminoácidos de cualquier tamaño que puede mejorar las propiedades de la proteína AQP-1. Por ejemplo, un segmento de fusión de la invención puede aumentar la estabilidad de una proteína de fusión AQP-1, agregar flexibilidad o mejorar o estabilizar la multimerización de la proteína de fusión AQP-1. Los ejemplos de segmentos de fusión incluyen, entre otros, un segmento de fusión de inmunoglobulina, un segmento de fusión de albúmina y cualquier otro segmento de fusión que aumente la vida media biológica de la proteína, proporcione flexibilidad a la proteína y/o permita o estabilice la multimerización. El uso de uno o más segmentos de fusión se encuentra dentro del alcance de la descripción. Los segmentos de fusión se pueden unir al extremo amino y/o carboxi-terminal de la proteína AQP-1 de la invención. Tal como se usa en esta invención, el término "unir" se refiere a combinar mediante acoplamiento usando técnicas de ingeniería genética. En una realización de este tipo, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína AQP-1 está unida físicamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un segmento de fusión de tal manera que las dos secuencias de codificación están en fase y el producto de transcripción forma una proteína de fusión continua. En una realización, una proteína AQP-1 puede unirse a un

45 segmento de fusión de manera directa o mediante un ligador de uno o más aminoácidos.

Una realización de la descripción es una proteína AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:11 y la SEC. ID NO:14. Una realización es una proteína AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 60 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 65 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 70 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1

60 ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1

comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 75 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 80 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 85 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 90 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1 comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En cada una de estas invenciones, la proteína AQP-1 respectiva conserva la capacidad de formar un canal que permite el paso del agua.

15 Una realización es una proteína de fusión AQP-1, donde el dominio AQP-1 de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o el 95 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una proteína de fusión AQP-1, donde el dominio AQP-1 de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 60 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, la SEC. ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una proteína de fusión AQP-1, donde el dominio AQP-1 de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 65 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, la SEC. ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una proteína de fusión AQP-1, donde el dominio AQP-1 de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 70 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, la SEC. ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una proteína de fusión AQP-1, donde el dominio AQP-1 de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 75 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, la SEC. ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una proteína de fusión AQP-1, donde el dominio AQP-1 de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 80 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, la SEC. ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una proteína de fusión AQP-1, donde el dominio AQP-1 de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 85 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, la SEC. ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una proteína de fusión AQP-1, donde el dominio AQP-1 de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 90 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEC. ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una proteína de fusión AQP-1, donde el dominio AQP-1 de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEC. ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una proteína de fusión AQP-1 que comprende al menos una parte de una proteína AQP-1 que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEC. ID NO:11 y SEQ ID NO:14, y un segmento de fusión. En cada una de estas invenciones, la proteína AQP-1 respectiva conserva la capacidad de formar un canal que permite el paso del agua.

Ácidos nucleicos

50 La descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de AQP-1 de la invención. Una realización es una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína AQP-1 que no es una proteína de fusión. Una realización es una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión AQP-1.

55 En una realización, una molécula de ácido nucleico codifica una proteína AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una molécula de ácido nucleico codifica una proteína

AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 70 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEC. ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una molécula de ácido nucleico codifica una proteína AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 75 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEC. ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una molécula de ácido nucleico codifica una proteína AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 80 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEC. ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una molécula de ácido nucleico codifica una proteína AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 85 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEC. ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una molécula de ácido nucleico codifica una proteína AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 90 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEC. ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En una realización, una proteína AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 95 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En cada una de estas invenciones, la proteína AQP-1 codificada por la molécula de ácido nucleico respectiva retiene la capacidad de formar un canal que permite el paso del agua.

En una realización, una molécula de ácido nucleico codifica una proteína de fusión AQP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. Una realización es una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión AQP-1, donde el dominio AQP-1 de la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14. En cada una de estas invenciones, la proteína AQP-1 codificada por la molécula de ácido nucleico respectiva retiene la capacidad de formar un canal que permite el paso del agua.

En una realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:13. Una realización es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos el 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:13. Una realización es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos un 70 % a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:13. Una realización es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos un 75 % a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:13. Una realización es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos un 80 % a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:13. Una realización es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos un 85 % a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:13. Una realización es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos un 90 % a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:13. Una realización es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que es idéntica en al menos el 95 % a la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:13. En cada una de estas invenciones, la proteína AQP-1 codificada por la molécula de ácido nucleico respectiva retiene la capacidad de formar un canal que permite el paso del agua.

Vectores y viriones

El virus adenoasociado (AAV) es un miembro único y no patógeno de la familia *Parvoviridae* de pequeños virus animales de ADN de una sola hebra, no encapsulados. Los AAV requieren un virus auxiliar (por ejemplo, un adenovirus) para la replicación y, por lo tanto, no se replican tras la administración a un sujeto. El AAV puede infectar una variedad relativamente amplia de tipos de células y estimular solo una respuesta inmunitaria leve, particularmente en comparación con otros virus, como el adenovirus. Se han identificado varios serotipos de AAV.

Los ejemplos incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y AAV12, que parecen ser de origen simio o humano. También se han encontrado AAV en otros animales, incluyendo aves (por ejemplo, el AAV aviar o AAV), bovinos (por ejemplo, el AAV bovino o BAAV), caninos, equinos, ovinos y porcinos.

Los vectores de AAV son moléculas de ácido nucleico recombinante donde al menos una parte del genoma de AAV es reemplazada por una molécula heteróloga de ácido nucleico. Es posible usar el ADN de cualquier AAV de la presente invención para construir un vector de AAV. Un ejemplo de un genoma de AAV1 es la Accesoión al Banco de Genes No. AF063497. Un ejemplo de un genoma de AAV2 es la Referencia del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) No. NC_001401.2. Un ejemplo de un genoma de AAV3 es la Referencia del NCBI No. NC_001729.1. Un ejemplo de un genoma de AAV4 es la Accesoión al Banco de Genes No. U89790. Un ejemplo de un genoma de AAV5 es la Accesoión al Banco de Genes No. AF085716. Un ejemplo de un genoma de AAV6 es la Accesoión al Banco de Genes No. AF028704.1. Un ejemplo de un genoma de AAV7 es la Accesoión al Banco de Genes No. AF513851. Un ejemplo de un genoma de AAV8 es la Accesoión al Banco de Genes No. AF513852. Un ejemplo de un genoma de AAV9 es la Accesoión al Banco de Genes No. AY530579. Un ejemplo de un genoma de AAV10 es la Accesoión al Banco de Genes No. AY631965. Un ejemplo de un genoma de AAV11 es la Accesoión al Banco de Genes No. AY631966. Un ejemplo de un genoma de AAV12 es la Accesoión al Banco de Genes No. DQ813647.1. Un ejemplo de un genoma de BAAV es la Accesoión al Banco de Genes No. AY388617.1. Un ejemplo de un genoma de AAV es la Accesoión al Banco de Genes No. AY186198.1

Es posible reemplazar aproximadamente 4,7 kilobases (kb) de ADN del genoma de AAV, por ejemplo, eliminando la replicación viral y los genes de la cápside. A menudo, la molécula heteróloga de ácido nucleico está simplemente flanqueada por repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV en cada extremo. Los ITR sirven como orígenes de replicación y contienen elementos que actúan *in cis* y son necesarios para el rescate, integración, escisión de vectores de clonación y empaquetado. Dichos vectores también incluyen típicamente un promotor unido operativamente a la molécula heteróloga de ácido nucleico para controlar la expresión.

Un vector de AAV se puede empaquetar en una cápside de AAV *in vitro* con la ayuda de un virus o funciones auxiliares expresadas en células para producir un virión de AAV. El serotipo y el tropismo celular de un virión de AAV son conferidos por la naturaleza de las proteínas de la cápside viral.

Se ha demostrado que los vectores y viriones de AAV transducen células de manera eficiente, incluyendo tanto células en división como no en división. Se ha demostrado que los vectores y viriones de AAV son seguros y conducen a una persistencia a largo plazo *in vivo* y a la expresión en una variedad de tipos de células.

Como se usa en esta invención, un vector de AAV que codifica una proteína AQP-1 es una molécula de ácido nucleico que comprende: una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína AQP-1 de la invención, una ITR unida al extremo 5' de la molécula de ácido nucleico AQP-1 y una ITR unida al extremo 3' de la molécula de ácido nucleico AQP-1. Los ejemplos de ITR incluyen, entre otros, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV, BAAV y otras ITR de AAV conocidas por los expertos en la materia. En una realización, una ITR de AAV se selecciona de la ITR de AAV2, AAV5, AAV6 Y BAAV. En una realización, una ITR de AAV es una ITR de AAV2. En una realización, una ITR de AAV es una ITR de AAV5. En una realización, una ITR de AAV es una ITR de AAV6. En una realización, una ITR de AAV es una ITR de BAAV.

Un vector de AAV de la invención también puede incluir otras secuencias, tales como secuencias de control de la expresión. Los ejemplos de secuencias de control de la expresión incluyen, entre otros, un promotor, un potenciador, un represor, un sitio de unión a ribosoma, un sitio de empalme de ARN, un sitio de poliadenilación, una secuencia de terminación transcripcional y un sitio de unión a micro ARN. Los ejemplos de promotores incluyen, entre otros, un promotor de AAV, tal como un promotor p5, p19 o p40, un promotor de adenovirus, tal como un promotor posterior adenoviral principal, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de papiloma, promotor del virus de polioma, un promotor del virus sincitial respiratorio (RSV), un promotor del virus del sarcoma, un promotor de SV40, otros promotores virales, un promotor de actina, un promotor de amilasa, un promotor de inmunoglobulina, un promotor de calicreína, un promotor de metalotioneína, un promotor de choque térmico, un promotor endógeno, un promotor regulado por rapamicina u otras moléculas pequeñas, otros promotores celulares y otros promotores conocidos por los expertos en la materia. En una realización, el promotor es un promotor de AAV. En una realización, el promotor es un promotor de CMV. La selección de secuencias de control de expresión a incluir puede ser realizada por un experto en la materia.

La descripción proporciona vectores de AAV de diferentes serotipos (según lo determinado por el serotipo de las ITR en dicho vector) que codifican una proteína AQP-1 de la invención. Dicho vector de AAV puede seleccionarse de un vector de AAV1, un vector de AAV2, un vector de AAV3, un vector de AAV4, un vector de AAV5, un vector de AAV6, un vector de AAV7, un vector de AAV8, un vector de AAV9, un vector de AAV10, un vector de AAV11, un vector de

AAV12, un vector de AAV y un vector de BAAV, donde cualquiera de tales vectores codifica una proteína AQP-1 de la invención. Una realización es un vector de AAV2, un vector de AAV5, un vector de AAV6 o un vector de BAAV, donde el vector respectivo codifica una proteína AQP-1 de la invención. Una realización es un vector de AAV2 que codifica una proteína AQP-1 de la invención. Una realización es un vector de AAV5 que codifica una proteína AQP-1 de la invención. Una realización es un vector de AAV6 que codifica una proteína AQP-1 de la invención. Una realización es un vector de BAAV que codifica una proteína AQP-1 de la invención.

Una realización es un vector de AAV que comprende una ITR de AAV y un promotor de CMV unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína AQP-1 de la invención. Una realización es un vector de AAV que comprende una ITR de AAV y un promotor de CMV unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión AQP-1 de la invención. Una realización es un vector de AAV2 que comprende una ITR de AAV2 y un promotor de CMV unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína AQP-1 de la invención. Una realización es un vector de AAV2 que comprende una ITR de AAV2 y un promotor de CMV unido operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión AQP-1 de la invención.

Una realización es un vector de AAV que tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:18.

La descripción proporciona vectores de plásmidos que codifican una proteína AQP-1 de la invención. Dichos vectores plásmidos también incluyen regiones de control, tales como ITR de AAV, un promotor operativamente unido a la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína AQP-1, uno o más sitios de empalme, un sitio de poliadenilación y un sitio de terminación de la transcripción. Dichos vectores plasmídicos también incluyen típicamente una serie de sitios de enzimas de restricción, así como también una molécula de ácido nucleico que codifica la resistencia a fármacos.

La presente invención también proporciona un virión de AAV. Como se usa en esta invención, un virión de AAV es un vector de AAV que codifica una proteína AQP-1 de la invención encapsulada en una cápside de AAV. Los ejemplos de cápsidas de AAV incluyen cápsidas de AAV1, cápsidas de AAV2, cápsidas de AAV3, cápsidas de AAV4, cápsidas de AAV5, cápsidas de AAV6, cápsidas de AAV7, cápsidas de AAV8, cápsidas de AAV9, cápsidas de AAV10, cápsulas de AAV 11, cápsulas de AAV12, cápsulas de AAV, cápsulas de BAAV y cápsidas de otros serotipos de AAV conocidos por los expertos en la materia. En una realización, la cápside es una cápside quimérica, es decir, una cápside que comprende proteínas VP de más de un serotipo. Como se usa en esta invención, el serotipo de un virión de AAV de la invención es el serotipo conferido por las proteínas de la cápside VP. Por ejemplo, un virión de AAV2 es un virión que comprende las proteínas VP1, VP2 y VP3 de AAV2. Se puede usar cualquier virión de AAV para poner en práctica los procedimientos de la invención siempre que el virión sea capaz de transducir eficientemente células ductales o acinares.

Una realización de la descripción es un virión de AAV seleccionado de un virión de AAV2, un virión de AAV5, un virión de AAV6 y un virión de BAAV, donde el vector de AAV dentro del virión codifica una proteína AQP-1 de la presente invención. Una realización es un virión de AAV2, donde el vector de AAV dentro del virión codifica una proteína AQP-1 de la presente invención. Una realización es un virión de AAV5, donde el vector de AAV dentro del virión codifica una proteína AQP-1 de la invención. Una realización es un virión de AAV6, donde el vector de AAV dentro del virión codifica una proteína AQP-1 de la invención. Una realización es un virión de BAAV, donde el vector de AAV dentro del virión codifica una proteína AQP-1 de la presente invención.

Los procedimientos útiles para producir vectores de AAV y viriones de AAV descritos en esta invención resultan conocidos para los expertos en la materia y también se ejemplifican en los Ejemplos. Brevemente, un vector de AAV de la presente invención se puede producir usando técnicas de ADN o ARN recombinantes para aislar secuencias de ácido nucleico de interés y unirlos como se describe en esta invención, por ejemplo, usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, como la digestión de la enzima de restricción, ligación, amplificación por PCR y similares. Los procedimientos para producir un virión de AAV de la invención incluyen típicamente (a) introducir un vector de AAV de la invención en un huésped, (b) introducir un vector auxiliar en la célula huésped, donde el vector auxiliar comprende las funciones virales que faltan en el vector de AAV y (c) introducir un virus auxiliar en la célula huésped. Todas las funciones para la replicación y empaquetamiento de viriones de AAV deben estar presentes a fin de lograr la replicación y empaquetamiento del vector de AAV en viriones de AAV. En algunos casos, al menos una de las funciones virales codificadas por el vector auxiliar puede ser expresada por la célula huésped. La introducción de los vectores y el virus auxiliar se puede llevar a cabo usando técnicas estándares y puede ocurrir simultánea o secuencialmente. Las células huésped después son cultivadas para producir viriones de AAV, que después se purifican usando técnicas estándares, como los gradientes de CsCl. La actividad residual del virus auxiliar puede inactivarse usando procedimientos conocidos, como la inactivación por calor. Dichos procedimientos generalmente

dan como resultado títulos elevados de viriones de AAV altamente purificados que están listos para su uso. En alguna invención, un vector de AAV de un serotipo especificado se empaqueta en una cápside del mismo serotipo. Por ejemplo, un vector de AAV2 se puede empaquetar en una cápside de AAV2. En otra invención, un vector de AAV de un serotipo especificado se empaqueta en una cápside de un serotipo diferente para modificar el tropismo del virión resultante. Los expertos en la materia pueden determinar combinaciones de serotipos vectoriales de AAV y serotipos de cápside de AAV.

Composiciones y procedimientos de uso

10 La descripción proporciona una composición que comprende un vector de AAV que codifica una proteína AQP de la presente invención, tal como AQP-1 o una proteína AQP-5 de la presente invención. La descripción también proporciona una composición que comprende un virión de AAV que comprende un vector de AAV que codifica una proteína AQP, tal como una proteína AQP-1 o AQP-5 de la invención. Dichas composiciones también pueden incluir una solución acuosa, tal como un tampón fisiológicamente compatible. Los ejemplos de excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas. En algunas invenciones, los excipientes se agregan, por ejemplo, para mantener la estabilidad de las partículas o evitar la agregación. Los ejemplos de dichos excipientes incluyen, entre otros, magnesio para mantener la estabilidad de las partículas, ácido plurónico para reducir la adherencia, manitol para reducir la agregación, y similares, conocidos por los expertos en la materia.

20 Una composición de la invención se formula convenientemente en una forma adecuada para la administración a un sujeto. Los expertos en la materia conocen técnicas para formular tales composiciones. Por ejemplo, un vector de AAV o virión de la invención se puede combinar con solución salina u otra solución farmacéuticamente aceptable; en algunas realizaciones, también se añaden excipientes. En otra realización, una composición que comprende un vector de AAV o virión se seca, y es posible agregar una solución salina u otra solución farmacéuticamente aceptable a la composición antes de la administración.

30 La descripción proporciona una composición para su uso en un procedimiento destinado a proteger a un sujeto de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. Dicho procedimiento incluye la etapa de administrar al sujeto un vector de la invención. Dicho vector codificará una proteína AQP-1 o una AQP5 de la invención. Se puede usar cualquier procedimiento de administración, siempre que el vector se incorpore a las células y, en particular, a las células ductales y acinares. Los ejemplos de tales procedimientos incluyen, entre otros, la transducción de células usando ADN desnudo, que incluye el ADN encapsulado en lípidos, el suministro a células usando virus recombinantes y el suministro a células usando minicélulas (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los EE. UU. No. 20030199088). Con respecto al uso de virus, se puede usar cualquier virus que sea capaz de suministrar el gen AQP-1 o AQP-5 dentro de una célula, resultando de este modo en la expresión de la proteína AQP correspondiente.

40 Un ejemplo de un virus útil es un virus adenoasociado (AAV). Una realización es un virión de AAV que comprende un vector de AAV que codifica una proteína AQP-1 o AQP-5 de la invención. Tal como se usa en esta invención, la capacidad de un virión de AAV de la invención para proteger a un sujeto de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren o la xeroftalmía relacionada con el mismo síndrome se refiere a la capacidad de dicho virión del AAV para prevenir, tratar o mejorar los síntomas relacionados con la xerostomía o xeroftalmía relacionadas con el síndrome de Sjögren. Según la presente invención, el tratamiento de los síntomas de la xerostomía o la xeroftalmía puede referirse a la eliminación total o parcial de los síntomas. Es decir, tratar o proteger a un individuo de los síntomas hace referencia a restaurar el estado fisiológico del individuo a un nivel clínicamente aceptable. Por ejemplo, con respecto al flujo de saliva o lágrimas, los procedimientos de la presente invención pueden devolver dicho flujo al 70, 80, 85, 90, 5 o 0 % del valor observado en un individuo normal (es decir, un individuo que se sabe que está libre de síndrome de Sjögren).

50 En una realización, un virión de AAV de la invención previene los síntomas de la xerostomía o la xeroftalmía relacionadas con el síndrome de Sjögren. En una realización, un virión de AAV de la invención trata los síntomas de la xerostomía o la xeroftalmía relacionadas con el síndrome de Sjögren. En una realización, un virión de AAV de la invención mejora los síntomas de la xerostomía o la xeroftalmía relacionadas con el síndrome de Sjögren. En una realización, un virión de AAV de la invención previene la ocurrencia de los síntomas de la xerostomía o la xeroftalmía relacionadas con el síndrome de Sjögren en un sujeto, por ejemplo, en un sujeto susceptible a dichas condiciones. En una realización, un virión de AAV de la invención evita que los síntomas de la xerostomía o la xeroftalmía relacionadas con el síndrome de Sjögren empeoren. En una realización, un virión de AAV de la invención reduce los síntomas de la xerostomía o la xeroftalmía relacionadas con el síndrome de Sjögren en un sujeto. En una realización, un virión de AAV de la invención permite que un sujeto se recupere de los síntomas de la xerostomía o

5 Ila xeroftalmía relacionadas con el síndrome de Sjögren. La xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren puede provocar una serie de síntomas que incluyen, entre otros, los siguientes: función salival reducida, que puede provocar xerostomía (boca seca); reducción de la función de la glándula lagrimal, que puede resultar en xeroftalmía (conjuntivitis sicca, ojos secos); infiltración de células inmunitarias (por ejemplo, células T, células B, macrófagos) de las glándulas salivales; infiltración de células inmunes de las glándulas lagrimales; aumento de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, citoquinas de células Th1, citoquinas de células Th17); disminución de citoquinas nTreg, aumento de autoanticuerpos circulantes, como los anticuerpos antinucleares (ANA), los anticuerpos SSA (por ejemplo, SSA/Ro), los anticuerpos SSB (por ejemplo, SSB/La) y los anticuerpos M3R; y fatiga. Los expertos en la materia conocen procedimientos para medir la presencia o gravedad de tales síntomas.

10 Bebido a que la administración de vectores de la presente invención a células de las glándulas salivales produce un efecto sistémico, dicha administración se puede usar como un procedimiento para tratar o proteger contra otros síntomas del síndrome de Sjögren, como la reducción de la función de la glándula lagrimal (xeroftalmía). Por lo tanto, una realización de la presente invención es un procedimiento para tratar o proteger a un sujeto de la función
 15 reducida de la glándula lagrimal. Dicho procedimiento incluye la etapa de administrar al sujeto un vector de la invención. Dicho vector codificará una proteína AQP de la invención tal como una proteína AQP-1 o AQP-5 de la invención. Debido a que la administración produce un efecto sistémico, el vector no necesita administrarse a las células lagrimales. Se puede usar cualquier procedimiento de administración, siempre que el vector se incorpore a las células y, en particular, a las células ductales y acinares. Los ejemplos de tales procedimientos incluyen, entre
 20 otros, la transducción de células usando ADN desnudo, que incluye ADN encapsulado en lípidos, el suministro a células usando virus recombinantes y el suministro a células usando minicélulas. Con respecto al uso de virus, se puede usar cualquier virus que sea capaz de administrar el gen AQP5 dentro de una célula, lo que da como resultado la expresión de la proteína AQP.

25 Como se ha discutido, el síndrome de Sjögren y sus síntomas relacionados son los resultados de un ataque autoinmune en las células de las glándulas exocrinas. Además, como se demuestra en los Ejemplos, la administración de vectores de la presente invención a células de las glándulas salivales da como resultado una reducción en dicha respuesta inmune. Por lo tanto, una realización de la presente invención es un procedimiento para reducir o eliminar una respuesta autoinmune a antígenos de células de las glándulas exocrinas. Dicho
 30 procedimiento incluye la etapa de administrar al sujeto un vector de la invención. Dicho vector codificará una proteína AQP-1 de la invención. Se puede usar cualquier procedimiento de administración, siempre que el vector se incorpore a las células y, en particular, a las células ductales y acinares.

La descripción proporciona un procedimiento que comprende administrar un virión de AAV que comprende un vector
 35 de AAV que codifica una proteína AQP a un sujeto, donde dicha administración mantiene la función de la glándula salival en dicho sujeto. Como se usa en esta invención, mantener la función de la glándula salival significa que la función de la glándula salival después de la administración de un virión de AAV de la invención a un sujeto es equivalente a la función de la glándula salival en ese sujeto antes de la administración del virión de AAV; por ejemplo, en el caso de un sujeto con función normal de las glándulas salivales, la función permanece normal
 40 después de la administración del virión de AAV; si el sujeto tiene síntomas, la función de la glándula salival no empeora después de la administración del virión de AAV, pero es equivalente a la función antes de la administración del virión de AAV. También se proporciona un procedimiento que comprende administrar un virión de AAV que comprende un vector de AAV que codifica una proteína AQP-1 de la invención a un sujeto, donde dicha administración mejora la función de la glándula salival en dicho sujeto. La descripción proporciona un procedimiento
 45 que comprende administrar un virión de AAV que comprende un vector de AAV que codifica una proteína AQP-1 de la invención a un sujeto, donde dicha administración mantiene la función de la glándula lagrimal en dicho sujeto. También se proporciona un procedimiento que comprende administrar un virión de AAV que comprende un vector de AAV que codifica una proteína AQP-1 de la invención a un sujeto, donde dicha administración mejora la función de la glándula lagrimal en dicho sujeto. Como se usa en este documento, un sujeto es cualquier animal susceptible al
 50 síndrome de Sjögren. Los sujetos incluyen humanos y otros mamíferos, como gatos, perros, caballos, otros animales de compañía, otros animales del zoológico, animales de laboratorio (por ejemplo, ratones) y ganado.

Un virión de AAV de la invención se puede administrar en una variedad de rutas. En algunas realizaciones, un virión de AAV se administra mediante aerosol. En algunas realizaciones, se administra un virión de AAV a la mucosa. En algunas realizaciones, un virión de AAV se administra directamente a un tejido u órgano. En algunas realizaciones,
 55 un virión de AAV de la invención se administra a una glándula salival. En algunas realizaciones, un virión de AAV de la invención se administra a una glándula lagrimal.

La descripción también proporciona un procedimiento para proteger a un sujeto de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren donde se administra un vector de AAV o virión de la invención a una glándula lagrimal del
 60 sujeto. En una realización, un vector o un AAV1, un AAV2, un AAV3, un AAV4, un AAV5, un AAV6, un AAV7, un

AAV8, un AAV9, un AAV10, un AAV11, un AAV12, un AAV o un BAAV de la invención se administra a una glándula lagrimal.

5 La descripción también proporciona procedimientos *ex vivo* para proteger a un sujeto de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. Dichos procedimientos pueden implicar administrar un vector de AAV o virión de la invención a una célula, tejido u órgano fuera del cuerpo del sujeto y después colocar esa célula, tejido u órgano dentro del cuerpo. Tales procedimientos resultan conocidos para los expertos en la materia.

10 La dosis de las composiciones descritas en esta invención para ser administrada a un sujeto de modo tal que sea efectiva (es decir, para proteger a un sujeto de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren) dependerá de la condición del sujeto, la forma de administración y el juicio del médico que la prescribe. A menudo, una sola dosis puede ser suficiente; sin embargo, la dosis puede repetirse si así se lo desea. En general, la dosis puede variar desde aproximadamente 10^4 partículas de virión por kilogramo hasta aproximadamente 10^{12} partículas de virión por kilogramo. Una dosis preferida se encuentra en el intervalo de aproximadamente 10^6 partículas de virión por kilogramo hasta alrededor de 10^{12} partículas de virión por kilogramo. Una forma más preferida se encuentra en el intervalo de aproximadamente 10^8 partículas de virión por kilogramo hasta alrededor de 10^{12} partículas de virión por kilogramo.

20 La descripción proporciona un tratamiento para la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. Dicho tratamiento comprende un vector de AAV, o un virión que comprende un vector tal, que codifica una proteína AQP-1. La administración de un tratamiento de este tipo a un sujeto lo protege de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren.

25 La descripción también proporciona un preventivo para la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. Dicho preventivo comprende un vector de AAV, o un virión que comprende un vector tal, que codifica una proteína AQP-1. La administración de un preventivo de este tipo a un sujeto lo protege de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren.

30 La descripción proporciona una célula de la glándula salival transfectada con un vector de AAV que codifica una proteína AQP-1. La célula de la glándula salival puede ser la de un sujeto con síndrome de Sjögren. En una realización, la célula de la glándula salival es la de un sujeto con síndrome de Sjögren.

35 La descripción proporciona un vector, y un virión de AAV que comprende un vector tal, que codifica una proteína AQP-1 de la invención para el tratamiento o la prevención de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. En una realización, dicho vector de AAV o virión es útil para proteger a un sujeto del síndrome de Sjögren. En una realización, dicho vector de AAV o virión es útil para tratar a un sujeto con xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren. En una realización, dicho vector de AAV o virión es útil para prevenir la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren en un sujeto. También se proporciona el uso de un vector de AAV, o un virión que comprende un vector tal, que codifica una proteína AQP-1 para la preparación de un medicamento para proteger a un sujeto de la xerostomía relacionada con el síndrome de Sjögren.

EJEMPLOS

45 Los siguientes ejemplos se brindan a efectos de proporcionarle a los expertos en la materia una descripción completa de cómo hacer y usar la presente invención y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni pretenden establecer que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. También se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos presentadas, pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Salvo que se indique lo contrario, las partes son partes por peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se encuentra en grados Celsius. Se usaron abreviaturas estándares.

55 **Ejemplo 1. Perfil de expresión de los receptores BMP-6 ACVR1A y BMPR1A**

60 La proteína morfogénica ósea 6 (BMP-6), al igual que los otros miembros de BMP, transmite señales a través de la ligación y la heterodimerización de BMP tipo 1 (ACVR1A) y los receptores de serina-treonina quinasa tipo 2 (BMPR1A), que posteriormente propagan la señal corriente abajo mediante la fosforilación de proteínas Smad. Los receptores de Smad fosforilados después se trasladan al núcleo donde afectan la regulación génica. El análisis del

papel de la BMP-6 en la regulación de la función de las glándulas salivales humanas se realizó primero mediante un análisis inmunofluorescente de los receptores BMPR1A y ACVR1A para BMP-6 en una línea celular de glándulas salivales (HSG) y en el tejido de glándulas salivales humanas. Brevemente, la línea celular HSG se cultivó con un Medio Esencial Mínimo IX (GIBCO) que contenía un 10 % de FBS (Invitrogen) y un 1 % de antibióticos a 37 °C en un 5 % de CO₂. Después, las células se lavaron con PBS, se fijaron con formalina al 4,0 %, 4,0 % de formalina (37 °C) durante 5 min. y se lavaron inmediatamente con un tampón PBS calentado a 37 °C. Después se tiñeron las células usando anticuerpos específicos para ACVR1A y BMPR1A según las instrucciones del fabricante.

Para el análisis inmunofluorescente del tejido de las glándulas salivales humanas, se extrajeron los tejidos de las glándulas submandibulares (SMG) y se fijaron usando formalina al 10 % %. Después de la fijación, los tejidos se deshidrataron con etanol, se embebieron en parafina según las técnicas estándares y se cortaron secciones de 5 µm. Las secciones se lavaron usando un tampón PBS y se tiñeron con anticuerpos específicos para los receptores BMP-6, ACVR1A y BMPR1A.

La imagen confocal de las células teñidas y del tejido salival mostró que se detectaron BMPR1A y ACVR1A tanto en la línea celular de glándulas salivales humanas HSG como en células ductales del tejido de glándulas salivales humanas.

Ejemplo 2. Inhibición de la hinchazón inducida por hipotonía de las células de las glándulas salivales humanas

Este ejemplo demuestra la capacidad de la BMP6 de inhibir la hinchazón inducida por hipotonía de las células de las glándulas salivales humanas.

La regulación del volumen celular es una función esencial acoplada a una variedad de procesos fisiológicos, tales como la proliferación celular, la diferenciación, la secreción de hierro o agua y la migración. Incluso bajo el estrés hipotónico impuesto por una disminución extracelular o aumento intracelular de la osmolaridad, las células pueden ajustar su volumen después de una inflamación osmótica transitoria mediante un mecanismo conocido como disminución del volumen regulatorio (RVD). Bajo condiciones patofisiológicas, las células a menudo experimentan una inflamación o contracción persistente sin mostrar la regulación del volumen. Dicha regulación del volumen deteriorada se acopla a los pasos iniciales de muerte celular necrótica y apoptótica. Por lo tanto, se examinó la capacidad de BMP-6 para mediar la inhibición de RVD en células de la HSG. Brevemente, como se describe en el Ejemplo 1, se realizaron cultivos de las células de la HSG. Se añadió la BMP-6 humana recombinante (R&D System), diluida en 1 mM de tampón Tris-HCl que contenía albúmina de suero bovino o humano al 0,1 %, y almacenada a -20 °C hasta su uso, a los cultivos de células de la HSG durante 4 días a una concentración de 0,1 ng/ml, 6 ng/ml o 150 ng/ml. Después del tratamiento con BMP-6, se midió la disminución del volumen regulatorio (RVD) según lo descrito por Lui y col., Journal of Biological Chemistry 281, 15485-15495 (2006). Brevemente, las células aisladas se cargaron con la sonda fluorescente calceína (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), se excitaron a 490 nm y la fluorescencia emitida se midió a 510 nm. El efecto de las concentraciones variables de BMP-6 en la RVD se examinó a continuación. Brevemente, las células de la HSG se cargaron con la sonda fluorescente calceína (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) y se excitaron a 490 nm. La fluorescencia emitida se midió a 510 nm (22). Se realizó la calibración in situ del tinte. La relación entre la fluorescencia del tinte y el cambio de volumen fue lineal en un rango de volumen de +35 a -355. El volumen celular se estimó usando un microscopio Olympus X51 conectado al software Universal Imaging MetaMorph. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 1 y demuestran que la BMP-6 induce la inhibición de RVD en células de la HSG de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 3. Cambios en la expresión génica inducidos por la BMP-6

Para identificar los cambios en la expresión génica asociados con la pérdida de RVD inducida por la BMP-6, se mapeó el transcriptoma sensible a la BMP6. Brevemente, como se describe en el Ejemplo 1, se realizaron cultivos de las células de la HSG. Las células cultivadas después fueron tratadas con concentraciones variables de BMP-6, como se describe en el Ejemplo 2. Después del tratamiento con BMP-6, el ARN total se extrajo con un RNeasy Mini Kit (Qiagen), según las recomendaciones del fabricante, y se analizó usando una micromatriz. En resumen, se cargaron 550 µl de Nano gel de ARN en un filtro de centrifugación y se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente; y 65 µl del gel se mezclaron con 1 µl de colorante Nano 6000 y se centrifugaron a 13000 g durante 10 min. a temperatura ambiente, después se cargaron 9,0 µl de esta mezcla de gel y colorante en 3 pocillos marcados con G de los Nano Chips de ARN (Agilent) y se cargaron 5,0 µl de Nano Market de ARN 6000 en los 12 pocillos de muestras, posteriormente, se agregaron 1,0 µl de muestras en cada uno de los 12 pocillos de muestras. Después se colocó el chip horizontalmente en el adaptador de los vórtices IKA y se lo sometió a vórtice durante 1 minuto antes de su carga en el bioanalizador Agilent 2100. El ARN total de ambas muestras de pacientes y las

muestras de control fue amplificado y marcado con un kit de amplificación lineal de entrada de ARN inferior (Agilent). Se marcó un total de 500 ng de ARN con cianina 3-CTP según las instrucciones del fabricante; brevemente, primero se mezclaron 500 ng de ARN total con 2,0 µl de espiga de ARN (One-Color Spike, Agilent) previamente diluida mediante una serie de concentraciones de 1:20, 1:25 y 1:10 en un tubo de 1,5 ml, incluyendo el cebador T7 que se incubó a 65 °C durante 10 min. La temperatura de reacción se cambió a 40 °C después de agregar 8,5 µl de reactivos de la mezcla maestra de ADNc (Agilent) durante 2 horas, y las muestras se movieron a un baño de agua en circulación a 65 °C. durante 15 min. La reacción fue subsiguientemente a 60 µl de la mezcla maestra de transcripción que incluía cianina 3-CTP (Agilent) para cada muestra durante 5 horas adicionales a 40 °C. El ARNc marcado y amplificado se purificó usando un kit de RNeasy Mini Kit (Qiagen). La calidad y el rendimiento del ARNc se analizaron con el uso del espectrofotómetro NanoDropt ND-1000 UV-VIS (versión 3.2.1). En la etapa de hibridación, solo se usaron ARNc con un rendimiento total >1,65 µg y una avidéz específica >9,0 pmol Cy3 por µg de ARNc. Las micromatrices se hibridaron según las recomendaciones del fabricante del Análisis de expresión génica basado en una micromatriz de un color (Agilent). Brevemente, cada tubo que contiene reagentes de reacción: 1,65 µg del nuevo ARNc marcado con Cy3, 11 µl de 10x de agente bloqueante (Agilent) y 2,2 µl de 25x tampón de fragmento (Agilent) se incubaron a 60 °C durante exactamente 30 min. y después se añadieron 55 µl de 2 x GE x tampón de hibridación (Agilent) a fin de detener la reacción de fragmentación. Después de centrifugar a temperatura ambiente (sobre mesa 13, 000 rpm durante 1 minuto), se cargaron 100 µl de la solución de muestra en cada matriz en los portaobjetos que después se montaron en la cámara de hibridación (Agilent). La cámara de portaobjetos definitivamente montada se colocó en un horno de hibridación a una velocidad de rotación de 10 rpm, a 65 °C, durante 17 horas. Después de desmontar las cámaras de hibridación de matrices, los portaobjetos se colocaron en el plato No. 1 con un tampón de lavado de expresión génica 1 (Agilent) y se lavaron durante 1 minuto a temperatura ambiente. Desde el plato del tampón de lavado 1, los portaobjetos se transfirieron directamente al plato No. 2 con un tampón de lavado de expresión génica 2 precalentado (37 °C) (Agilent). Después del procedimiento de lavado, los portaobjetos se escanearon inmediatamente usando un escáner de micromatrices (Modelo: Sistema Agilent G2565AA) para minimizar la oxidación ambiental y la pérdida de intensidades de señal. El archivo de datos de micromatrices (imágenes .tif) se extrajo usando el programa Agilent Feature Extraction (FE) (versión de software 9.5.1), para la expresión génica de un color, la expresión génica predeterminada se especifica en las propiedades de la plantilla de cuadrícula FE con la selección de "GE1_QCM_Feb07" en este protocolo. Una vez que se completa la extracción, se visualiza y analiza el informe de control de calidad (QC) con una tabla de resumen de valores métricos, lo que incluye determinar si la cuadrícula se ha colocado correctamente al inspeccionar la localización de puntos en las cuatro esquinas de la matriz. Aquellos chips que cumplen con el requisito de informes de control de calidad (se usan 9 criterios de evaluación de una tabla de "Métricas de evaluación para GE1_OCM-Feb07") se seleccionan para obtener estadísticas de datos adicionales a continuación.

Los resultados de este análisis indican que diferentes dosis de BMP-6 pueden inducir diferentes patrones de respuesta de los niveles de expresión génica. Varios de los cambios genéticos observados fueron verificados por qPCR (figura 2). El ARN humano total (500 ng) se transcribió de manera inversa usando un kit de síntesis de ADNc de primera hebra SuperScript (VLO™) según las instrucciones de fabricación (Invitrogen). Los componentes de la reacción eran 10x mezcla de enzimas SuperScript y 5x mezcla de reacción VILO con los cebadores aleatorios incluidos, MgCl₂ y dNTP, y los tubos se sometieron a un programa de PCR de 25 °C durante 10 min., 42 °C durante 60 min. y 85 °C durante 5 minutos. Las muestras finales de la primerast hebra de ADNc se almacenaron a -20 °C hasta su uso para la PCR en tiempo real. La expresión fue validada adicionalmente por qPCR usando una mezcla maestra de PCR universal Taqman (2x) (Applied Biosystem Inc). El ADNc se diluyó como una concentración final de 1,0 ng/µl. La primerast hebra del ADNc sintetizado a partir de ARN total humano se usó como plantilla para la PCR en tiempo real. La reacción se llevó a cabo en un tubo opcional que incluye 10 ng del ADNc sintetizado, 1,0 µl de sondas TaqMan y 10 µl de una mezcla maestra de PCR universal (2x) (Applied Biosystem) que contiene polimerasa de ADN AmpliTaq, glicosilasa de uracil-ADN, dNTP/DUTP, ROX™ referencia positiva y componentes de tampón optimizados que se compararon a Applied Biosystem con un volumen final total de 20 µl. La reacción de PCR en tiempo real se ejecutó en el Instrumento (ABI PRISM).

Ejemplo 4. Cambios en la expresión génica en ratones tratados con BMP-6

Para explorar adicionalmente los cambios en la expresión génica inducidos por BMP-6, se desarrollaron datos adicionales de micromatrices para ratones tratados con BMP6 in vivo después del tratamiento dirigido a glándulas salivales con vectores AAV5 que codifican la BMP6. La construcción de los vectores AAV5 BMP6 se ha descrito en Li y col. Tissue Eng. 2006 feb.;12(2):209-19. Los vectores se administraron en las glándulas submandibulares mediante instilación retrógrada como se describió anteriormente en (20). En resumen, se indujo una anestesia leve con una solución de ketamina (100 mg/ml, 1 ml/kg de peso corporal (BW); Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, EE.UU.) y xylazina (20 mg/ml, 0,7 ml/kg de peso corporal; Phoenix Scientific, St. Joseph, MO, EE.UU.) administrada por vía intramuscular (IM). Diez minutos después de la inyección IM de atropina (0,5 mg/kg de BW; Sigma, St. Louis,

MO, EE.UU.), A los ratones Aec1/Aec2 a la edad de 30 semanas se les administró un vector de 50 μ l en ambas glándulas submandibulares mediante instilación ductal retrógrada (1×10^{10} partículas/glándula) usando una cánula delgada (Intermedic PE10, Clay Adams, Parsippany, NJ, EE.UU.). La dosis del vector se eligió en función de los resultados publicados anteriormente, los cuales mostraron una actividad transgénica detectable por encima de 10^9 partículas/glándula (21). Se recolectaron las glándulas salivales del ratón, se extrajeron sus ARN (como se describe en el Ejemplo 2) y se identificaron los cambios en la expresión génica mediante el análisis de micromatrices, como se describe en el Ejemplo 2.

Los resultados de este análisis, enumerados en la Tabla 2, identificaron varios genes que se correlacionaban con el cambio en la actividad de la RVD. En este análisis, la AQP-5 mostró el cambio más significativo en la expresión.

Tabla 2. Los genes se correlacionaron con el cambio en la actividad de la RVD.

				0,1 ng de BMP	6 ng de BMP6	150 ng de BMP6	Ratones de BMP6
Símbolo	Ingrese el nombre del gen	Ubicación	Familia	Cambio múltiplo			
AQP5	Acuaporina 5	Membrana plasmática	Transportador	-1,458	-7,156		-1,896
COX7B	Subunidad VIIb del citocromo oxidasa	Citoplasma	Enzima	1,299	1,747		1,278
ERG1	Respuesta al crecimiento temprano 1	Núcleo	Regulador de transcripción	2,049	4,211		1,16
FAT1	Supresor de tumores FAT homólogo 1 (Drosophila)	Membrana plasmática	Otro	1,450	1,821		1,864
IGSF10	Miembro 10 de la superfamilia de inmunoglobulina	Desconocido	Otro	-1,388	-2,580		-1,216
NKRF	Factor de represión NKB	Núcleo	Regulador de transcripción	1,469	1,913		1,342
PPP2R2A	Proteína fosfatasa 2, subunidad reguladora B, α	Citoplasma	fosfatasa	1,343	1,493		-1,237

Ejemplo 5. El análisis de inmunofluorescencia de BMP-6 indujo cambios en la expresión de acuaporina-5

15

Para investigar más a fondo el efecto de BMP-6 sobre los cambios en la expresión de la acuaporina-5, se realizó una formación de imágenes confocal en células de la HSG tratadas con BMP-6. Brevemente, como se describe en el Ejemplo 1, se realizaron cultivos de las células de la HSG. Las células cultivadas después se trataron con BMP-6, como se describe en el Ejemplo 2, y se tiñeron con anticuerpos específicos para AQP-5 según las instrucciones del fabricante. Como control, se tomaron imágenes de cultivos separados de células de la HSG, con o sin tratamiento con BMP-6, con faloidina, que tiene una alta afinidad por la actina. Los resultados de este análisis, que se muestran en la figura 3, demuestran que el tratamiento de las células de la HSG con BMP-6 dio como resultado una reducción en la densidad de las células AQP-5 en la membrana celular en comparación con las células no tratadas.

20

Ejemplo 6. Recuperación de la RVD por complementación con AQP.

Para confirmar el papel de la AQP5 en la pérdida de RVD inducida por BMP6 en células de la HSG, se transfectó un plásmido que codifica AQP5 o AQP1 en células de la HSG previamente tratadas con BMP-6. Brevemente, las placas de 6 pocillos que contenían células de la HSG se cultivaron hasta un 70-90 % de confluencia, después se transfectaron usando LIPOFECTAMINE™ 2000 según las instrucciones del fabricante (Invitrogen); antes de la transfección, las células fueron cambiadas con un nuevo medio de crecimiento sin antibióticos. Se combinó un total de 4,0 μ g de ADN de AAV2-AQP5 o AAV2-AQP-1 con un plásmido informador que codifica una proteína verde-fluorescente (GFP) como control de transfección, y puc19 como plásmido portador en 50 μ l de OPTI. El suero reducido MEM™ (Invitrogen) se mezcló con 50 μ l de reactivo diluido de LIPOFECTAMINE™ 2000 (10 μ l por pocillo) después de la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los 100 μ l de la solución de la mezcla final

30

35

después de la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente se agregaron a cada pocillo de células de la HSG y se cambiaron con un medio de crecimiento después de 4-6 horas. Después, se incubaron las células de la HSG transfectadas a 37 °C en una incubadora de CO₂ durante 18 a 48 horas antes de probar la expresión transgénica. Los resultados, que se muestran en la figura 4, demuestran que se observó un aumento dependiente de la dosis en la RVD con cantidades crecientes de plásmido AQP5. De manera similar, la transfección con AQP1 también podría rescatar la pérdida de RVD (figura 4C).

Ejemplo 7. Restauración de la actividad de las glándulas salivales en ratones

10 Para determinar si la acuaporina podría restaurar la actividad de las glándulas salivales en un modelo de ratón del síndrome de Sjögren, se usaron vectores de AAV que expresan la acuaporina-1 (AQP1) para transducir las glándulas salivales del ratón Aec1/Aec2, que se reconoce como un modelo para el síndrome de Sjögren (Nguyen y col., Scand J, Immunol. 2006 sep.; 64 (3): 295-307). Los ratones en este estudio tenían la enfermedad establecida (30 semanas de edad). Los vectores de AAV que expresaban AQP-1 fueron transfectados en las glándulas salivales
15 de ratones, como se describe en el Ejemplo 4, y los ratones fueron monitoreados para detectar cambios en la actividad de las glándulas salivales y lagrimales. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 5.

Los resultados muestran que la actividad de las glándulas salivales aumentó en 4 semanas después de la canulación del vector y persistió hasta el final del estudio (18 semanas después de la canulación) (figura 5A). Los
20 resultados también mostraron un aumento en la actividad de la glándula lagrimal, lo que indica que la terapia localizada en la glándula salival fue capaz de iniciar un efecto sistémico (figura 5B).

Debido a que se cree que la pérdida de la actividad de la glándula en el ratón Aec1/Aec2 es el resultado de la inflamación en el tejido, se analizó el tejido de la glándula salival de los ratones transfectados a fin de detectar
25 citoquinas proinflamatorias, como el interferón gamma. Los resultados mostraron una disminución en las células B y T, así como también en las células T citocinas proinflamatorias productoras de interferón gamma, lo que sugiere que la expresión de AQP1 en las células epiteliales es capaz de reducir la inflamación observada en la glándula, lo que probablemente tenga un efecto en la actividad secretora de tejidos distales.

30 En resumen, los datos proporcionados en esta invención demuestran que la administración de AQP-1 a células de las glándulas salivales puede mejorar la actividad secretora asociada con el síndrome de Sjögren y producir también un efecto sistémico.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Los Estados Unidos de América, representados por la Secretaría del Departamento de Salud y Servicios Humanos Chiorini, John
- <120> TRANSPORTE DE GEN DE ACUAPORINA MEDIADO POR AAV PARA EL TRATAMIENTO DEL
40 SÍNDROME DE SJÖGREN
- <130> 6137NIDCR-14-PCT
- <140> todavía sin asignar
45 <141> 2013-08-30
- <150> 61/695.753
<151> 2012-08-31
- 50 <160> 19
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
55 <211> 810
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- <400> 1
60

ES 2 729 561 T3

```

atggccagcg agttcaagaa gaagctcttc tggagggcag tggtaggcca gttcctggcc      60
acgacctctt ttgtcttcat cagcatcggg tctgccctgg gcttcaaata cccgggtggg      120
aacaaccaga cggcgggtcca ggacaacgtg aagggtgtgc tggccttcgg gctgagcatc      180
gccacgctgg cgcagagtgt gggccacatc agcggcgccc acctcaacct ggctgtcaca      240
ctggggctgc tgctcagctg ccagatcagc atcttccgtg cctcatgta catcatcgcc      300
cagtgcgtgg gggccatcgt cggcaccgcc atcctctcag gcatcacctc ctccctgact      360
gggaactcgc ttggccgcaa tgacctggct gatggtgtga actcgggcca gggcctgggc      420
atcgagatca tcgggacctt ccagctggtg ctatgcgtgc tggctactac cgaccggagg      480
cgccgtgacc ttggtggctc agccccctt gccatcggcc tctctgtagc ccttgacac      540
ctcctggcta ttgactacac tggtgtggg attaaccctg ctcggtcctt tggtcctgg      600
gtgatcacac acaacttcag caaccactgg attttctggg tggggccatt catcggggga      660
gccctggctg tactcatcta cgacttcatc ctggccccac gcagcagtga cctcacagac      720
cgcgtgaagg tgtggaccag cggccaggtg gaggagtatg acctggatgc cgacgacatc      780
aactccaggg tggagatgaa gcccaaatag                                     810

```

<210> 2

5 <211> 269

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

10

Met Ala Ser Glu Phe Lys Lys Lys Leu Phe Trp Arg Ala Val Val Ala

ES 2 729 561 T3

<210> 3
 <211> 810
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

```

ctatttgggc ttcattctcca ccctggagtt gatgtcgtcg gcatccaggt catactcctc      60
cacctggccg ctggtccaca ccttcacgcg gtctgtgagg tcaactgctgc gtggggccag      120
gatgaagtcg tagatgagta cagccagggc tccccgatg aatggcccca cccagaaaat      180
ccagtggttg ctgaagttgt gtgtgatcac cgcggagcca aaggaccgag cagggttaat      240
cccacagcca gtgtagtcaa tagccaggag gtgtccaagg gctacagaga ggccgatggc      300
aaggggggct gagccaccaa ggtcacggcg cctccggtcg gtagtagcca gcacgcatag      360
caccagctgg agggccccga tgatctcgat gcccaggccc tggcccgagt tcacaccatc      420
agccaggctca ttgcgcccaa gcgagttccc agtcaggag gaggtgatgc ctgagaggat      480
ggcgggtggc acgatggccc ccacgcactg ggcgatgatg tacatgaggg cacggaagat      540
gctgatctgg cagctgagca gcagccccag tgtgacagcc gggttgaggt gggcgccgct      600
gatgtggccc acactctgcg ccagcgtggc gatgctcagc ccgaaggcca gcgacacctt      660
cacgttgtcc tggaccgccc tctggttggt ccccaccggg tatttgaagc ccagggcaga      720
accgatgctg atgaagacaa agagggtcgt ggccaggaac tcggccacca ctgccctcca      780
gaagagcttc ttcttgaact cgctggccat      810
    
```

10

<210> 4
 <211> 561
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 4

```

atgcctgggg ctgcccctt gcctctggtc ttggtacccc agaataccct ggccctggatg      60
cagctggatg caaaggcccc agctcacccc aggcctctcc agcttctagg cagagtgggg      120
cctgggtcta ggcagctggc tgatggtgtg aactcgggcc agggcctggg catcgagatc      180
atcgggaccc tccagctggt gctatgcgtg ctggctacta ccgaccggag gcgcccgtgac      240
cttgggtggt cagccccctt tgccatcggc ctctctgtag cccttgaca cctcctggct      300
attgactaca ctggctgtgg gattaaccct gctcggctct ttggctccgc ggtgatcaca      360
cacaacttca gcaaccactg gattttctgg gtggggccat tcatcggggg agccctggct      420
gtactcatct acgacttcat cctggcccca cgcagcagtg acctcacaga ccgctgaag      480
gtgtggacca gcgccaggt ggaggagtat gacctggatg ccgacgacat caactccagg      540
gtggagatga agcccaata g      561
    
```

ES 2 729 561 T3

<210> 5
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 5

```

Met Pro Gly Ala Arg Pro Leu Pro Leu Val Leu Val Pro Gln Asn Thr
1          5          10          15

Leu Ala Trp Met Gln Leu Asp Ala Lys Ala Pro Ala His Pro Arg Pro
20          25          30

Leu Gln Leu Leu Gly Arg Val Gly Pro Gly Ser Arg Gln Leu Ala Asp
35          40          45

Gly Val Asn Ser Gly Gln Gly Leu Gly Ile Glu Ile Ile Gly Thr Leu
50          55          60

Gln Leu Val Leu Cys Val Leu Ala Thr Thr Asp Arg Arg Arg Arg Asp
65          70          75          80

Leu Gly Gly Ser Ala Pro Leu Ala Ile Gly Leu Ser Val Ala Leu Gly
85          90          95

His Leu Leu Ala Ile Asp Tyr Thr Gly Cys Gly Ile Asn Pro Ala Arg
100         105         110

Ser Phe Gly Ser Ala Val Ile Thr His Asn Phe Ser Asn His Trp Ile
115         120         125

Phe Trp Val Gly Pro Phe Ile Gly Gly Ala Leu Ala Val Leu Ile Tyr
130         135         140

Asp Phe Ile Leu Ala Pro Arg Ser Ser Asp Leu Thr Asp Arg Val Lys
145         150         155         160

Val Trp Thr Ser Gly Gln Val Glu Glu Tyr Asp Leu Asp Ala Asp Asp
165         170         175

Ile Asn Ser Arg Val Glu Met Lys Pro Lys
180         185
    
```

<210> 6
 <211> 561
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 6

ES 2 729 561 T3

ctatttgggc ttcattccca ccctggagtt gatgtcgtcg gcatccaggt catactctc 60
cacctggccg ctggtccaca ccttcacgcg gtctgtgagg tcaactgctgc gtggggccag 120
gatgaagtcg tagatgagta cagccagggc tccccgatg aatggcccca cccagaaaat 180
ccagtggttg ctgaagttgt gtgtgatcac cgcggagcca aaggaccgag cagggttaat 240
cccacagcca gtgtagtcaa tagccaggag gtgtccaagg gctacagaga ggccgatggc 300
aaggggggct gagccaccaa ggtcacggcg cctccggtcg gtagtagcca gcacgcatag 360
caccagctgg agggccccga tgatctcgat gcccaggccc tggcccagat tcacaccatc 420
agccagctgc ctagaccag gccccactct gcctagaagc tggagaggcc tggggtgagc 480
tggggccttt gcatccagct gcatccaggc cagggtattc tggggtacca agaccagagg 540
caagggggcg gccccaggca t 561

<210> 7
<211> 657
<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 7
atgttctgga cttttgggta tgaagcgtg tcccctgctg ggccttccca ctttttgca 60
tctcttctcc taggagtgt cctgaccatc accttcatgc ctggggctcg ccccttgctc 120
ctggtcttgg taccacagaa taccctggcc tggatgcagc tggatgcaa ggccccagct 180
caccacagc ctctccagct tctaggcaga gtggggcctg ggtctaggca gctggtgat 240
ggtgtgaact cgggccaggg cctgggcatc gagatcatcg ggaccctcca gctggtgcta 300
tgcgtgctgg ctactaccga cgggagcgc cgtgacctg gtggctcagc cccccttggc 360
atcggcctct ctgtagccct tggacacctc ctggctattg actacactgg ctgtgggatt 420
aacctgctc ggtcctttgg ctccgcggtg atcacacaca acttcagcaa ccaactggatt 480
ttctgggtgg ggccattcat cgggggagcc ctggctgtac tcatctacga ctcatcctg 540
gccccacgca gcagtgacct cacagaccgc gtgaaggtgt ggaccagcgg ccagggtggag 600
gagtatgacc tggatgccga cgacatcaac tccagggtgg agatgaagcc caaatag 657

<210> 8
<211> 218
<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 8
Met Phe Trp Thr Phe Gly Tyr Glu Ala Val Ser Pro Ala Gly Pro Ser
1 5 10 15

His Leu Phe Ala Ser Leu Leu Leu Gly Val Leu Leu Thr Ile Thr Phe

ES 2 729 561 T3

ccagtggttg ctgaagttgt gtgtgatcac cgcggagcca aaggaccgag cagggttaat 240
cccacagcca gtgtagtcaa tagccaggag gtgtccaagg gctacagaga ggccgatggc 300
aaggggggct gagccaccaa ggtcacggcg cctcgggtcg gtagtagcca gcacgcatag 360
caccagctgg aggggtcccga tgatctcgat gcccaggccc tggcccagat tcacaccatc 420
agccagctgc ctagaccag gccccactct gcctagaagc tggagaggcc tggggtgagc 480
tggggccttt gcatccagct gcatccaggc cagggtattc tggggtacca agaccagagg 540
caaggggcca gccccaggca tgaagtgat ggtcaggagc actcctagga gaagagatgc 600
aaaaagggtg gaaggcccag caggggacac ggcttcatac ccaaaagtcc agaacat 657

<210> 10
<211> 465
<212> ADN

5 <213> Homo sapiens
<400> 10

atgcagtcgg gcatgggggtg gaatgttctg gacttttggc tggctgatgg tgtgaactcg 60
ggccagggcc tgggcatcga gatcatcggg accctccagc tgggtctatg cgtgctggct 120
actaccgacc ggaggcgcg tgaccttggg ggctcagccc cccttgccat cggcctctct 180
gtagcccttg gacacctcct ggctattgac tacactggct gtgggattaa ccctgctcgg 240
tcctttggct ccgcggtgat cacacacaac ttcagcaacc actggatfff ctgggtgggg 300
ccattcatcg ggggagccct ggctgtactc atetacgact tcatcctggc cccacgcagc 360
agtgacctca cagaccgct gaaggtgtgg accagcggcc aggtggagga gtatgacctg 420
gatgccgacg acatcaactc cagggtggag atgaagccca aatag 465

<210> 11
<211> 154
10 <212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 11

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

ES 2 729 561 T3

His Leu Leu Ala Ile Asp Tyr Thr Gly Cys Gly Ile Asn Pro Ala Arg
 65 70 75 80

Ser Phe Gly Ser Ala Val Ile Thr His Asn Phe Ser Asn His Trp Ile
 85 90 95

Phe Trp Val Gly Pro Phe Ile Gly Gly Ala Leu Ala Val Leu Ile Tyr
 100 105 110

Asp Phe Ile Leu Ala Pro Arg Ser Ser Asp Leu Thr Asp Arg Val Lys
 115 120 125

Val Trp Thr Ser Gly Gln Val Glu Glu Tyr Asp Leu Asp Ala Asp Asp
 130 135 140

Ile Asn Ser Arg Val Glu Met Lys Pro Lys
 145 150

<210> 12
 <211> 465
 <212> ADN

5 <213> Homo sapiens
 <400> 12

ctatttgggc ttcattctcca ccctggagtt gatgtcgtcg gcatccaggt catactcctc 60
 cacctggccg ctggtccaca ccttcacggc gtctgtgagg tcaactgctgc gtggggccag 120
 gatgaagtcg tagatgagta cagccagggc tccccgatg aatggcccca cccagaaaat 180
 ccagtggttg ctgaagttgt gtgtgatcac cgcggagcca aaggaccgag cagggttaat 240
 cccacagcca gtgtagtcaa tagccaggag gtgtccaagg gctacagaga ggccgatggc 300
 aaggggggct gagccaccaa ggtcacggcg cctccggtcg gtagtagcca gcacgcatag 360
 caccagctgg agggctccga tgatctcgat gcccaggccc tggcccagat tcacaccatc 420
 agccagccaa aagtccagaa cattccacc ccatgccgac tgcat 465

<210> 13
 <211> 810
 10 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 13

atggccagtg aaatcaagaa gaagctcttc tggagggctg tgggtggtga gttcctggcc 60
 atgacctctc tegtcttcat cagcattggt tctgccctag gcttcaatta cccactggag 120
 agaaaccaga cgctggcca ggacaacgtg aaggtgtcgc tggcctttgg tttgagcatc 180
 gctactctgg cccaaagtgt gggtcacatc agcggtgctc acctcaacc tcggtgcaca 240
 ctggggctcc tgctcagctg tcagatcagc atcctccggg ctgtcatgta catcatcgcc 300

ES 2 729 561 T3

```

cagtgtgtgg gagccatcgt cgccacggcc attctctcgg gcatcacctc ctccctagtc      360
gacaattcac ttggccgcaa tgacctggct cacggtgtga actctggcca ggcctgggc      420
attgagatca ttggcactct gcagctgcta ctgtgcgttc tggccaccac tgaccggagg      480
cgccgagact taggtggctc agccccgctt gccattggct tgtctgtggc ccttggacac      540
ctgtggcga ttgactacac tggctgcggt atcaaccctg cccggtcatt tggctctgct      600
gtgctcaccg gcaacttctc aaaccactgg attttctggg tggggccggt cattgggggt      660
gccctggcag tgctcatcta tgacttcac ctagcccccac gcagcagcga cttcacagac      720
cgcatgaagg tgtggaccag tggccagggt gaggagtatg acctggatgc tgacgacatc      780
aactccaggg tggagatgaa gcccaaatag                                          810

```

<210> 14

<211> 269

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 14

```

Met Ala Ser Glu Ile Lys Lys Lys Leu Phe Trp Arg Ala Val Val Ala
 1                               5                               10                    15

Glu Phe Leu Ala Met Thr Leu Phe Val Phe Ile Ser Ile Gly Ser Ala
                20                    25                    30

Leu Gly Phe Asn Tyr Pro Leu Glu Arg Asn Gln Thr Leu Val Gln Asp
    35                                40                                45

Asn Val Lys Val Ser Leu Ala Phe Gly Leu Ser Ile Ala Thr Leu Ala
    50                                55                                60

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

Leu Gly Leu Leu Leu Ser Cys Gln Ile Ser Ile Leu Arg Ala Val Met
    85                                90                                95

Tyr Ile Ile Ala Gln Cys Val Gly Ala Ile Val Ala Thr Ala Ile Leu
    100                               105                               110

Ser Gly Ile Thr Ser Ser Leu Val Asp Asn Ser Leu Gly Arg Asn Asp
    115                               120                               125

Leu Ala His Gly Val Asn Ser Gly Gln Gly Leu Gly Ile Glu Ile Ile
    130                               135                               140

Gly Thr Leu Gln Leu Val Leu Cys Val Leu Ala Thr Thr Asp Arg Arg

```

ES 2 729 561 T3

145		150		155		160
Arg Arg Asp Leu Gly Gly Ser Ala Pro Leu Ala Ile Gly Leu Ser Val						
		165		170		175
Ala Leu Gly His Leu Leu Ala Ile Asp Tyr Thr Gly Cys Gly Ile Asn						
		180		185		190
Pro Ala Arg Ser Phe Gly Ser Ala Val Leu Thr Arg Asn Phe Ser Asn						
		195		200		205
His Trp Ile Phe Trp Val Gly Pro Phe Ile Gly Gly Ala Leu Ala Val						
		210		215		220
Leu Ile Tyr Asp Phe Ile Leu Ala Pro Arg Ser Ser Asp Phe Thr Asp						
		225		230		235
Arg Met Lys Val Trp Thr Ser Gly Gln Val Glu Glu Tyr Asp Leu Asp						
		245		250		255
Ala Asp Asp Ile Asn Ser Arg Val Glu Met Lys Pro Lys						
		260		265		

<210> 15
 <211> 810
 <212> ADN

5 <213> Mus musculus
 <400> 15

```

ctatttgggc ttcatctcca ccctggagtt gatgtogtca gcatccaggt catactoctc      60
cacctggcca ctggtccaca ccttcatgcg gtctgtgaag togctgctgc gtggggccag      120
gatgaagtca tagatgagca ctgccagggc accccaatg aacggcccca cccagaaaat      180
ccagtggttt gagaagttgc gggtgagcac agcagagcca aatgaccggg cagggttgat      240
accgcagcca gtgtagtcaa tcgccagcag gtgtccaagg gccacagaca agccaatggc      300
aagcggggct gagccaccta agtctcggcg cctccgggtca gtggtggcca gaacgcacag      360
taccagctgc agagtgccaa tgatctcaat gcccaggccc tggccagagt tcacaccgtg      420
agccaggtca ttgcggccaa gtgaattgtc gactagggag gaggtgatgc ccgagagaat      480
ggccgtggcg acgatggctc ccacacactg ggcgatgatg tacatgacag cccggaggat      540
gctgatctga cagctgagca ggagccccag tgtgaccgca gggttgaggt gagcaccgct      600
gatgtgaccc aacttttggg ccagagtagc gatgtctaaa ccaaaggcca gcgacacctt      660
cacgttgtcc tggaccagcg tctggtttct ctccagtggg taattgaagc ctagggcaga      720
accaatgctg atgaagacga agagggtcat ggccaggaac tcagccacca cagccctcca      780
gaagagcttc ttcttgattt cactggccat      810
  
```

10 <210> 16
 <211> 4123
 <212> ADN

ES 2 729 561 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (312)..(312)

<223> n e s a , c , g , o t

10

<400> 16

```

gcggcgcgca tctatacatt gaatcaatat tggcaattag ccatattagt cattggttat      60
atagcataaa tcaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatctata tcataaatatg      120
tacatttata ttggctcatg tccaatatga ccgccatggt gacattgatt attgactagt      180
tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcggt      240
acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcccc acgacccccg cccattgacg      300
tcaataatga cntatgttcc catagtaacg ccaatagga ctttccattg acgtcaatgg      360
gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt      420
ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaa tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg      480
accttacggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg      540
gtgatgcggt tttggcagta caccaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt      600
ccaagtctcc acccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaa tcaacgggac      660
tttccaaaat gtcgtaataa ccccgccccg ttgacgcaa tgggcggtag gcgtgtacgg      720
tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatccggtc gcgcgaattc      780
gagctcggta ccagctctca gagggaattg agcaaccggc agcggctctca ggccaagccc      840
cctgccagca tggccagcga gttcaagaag aagctcttct ggagggcagt ggtggccgag      900
ttcctggcca cgaccctctt tgtcttcatc agcatcgggt ctgccctggg cttcaaatac      960
ccggtgggga acaaccagac ggcggtccag gacaacgtga aggtgtcgct ggccttcggg      1020
ctgagcatcg ccacgctggc gcagagtgtg ggccacatca gcggcgcccc cctcaaccgg      1080
gctgtcacac tggggctgct gctcagctgc cagatcagca tcttccgtgc cctcatgtac      1140
atcatcgccc agtgcgtggg ggccatcgtc gccaccgcca tcctctcagg catcacctcc      1200
tcctgactg ggaactcgct tggccgcaat gacctggctg atgggtgtgaa ctcgggccag      1260
ggcctgggca tcgagatcat cgggaccctc cagctggtgc tatgctgct ggctactacc      1320
gaccggaggc gcogtgacct tggtggtctca gcccccttg ccatcggcct ctctgtagcc      1380

```

ES 2 729 561 T3

cttggacacc tcctggctat tgactacact ggctgtggga ttaaccctgc tcggtccttt 1440
 ggctccgcgg tgatcacaca caacttcagc aaccactgga ttttctgggt ggggccattc 1500
 atcgggggag ccctggctgt actcatctac gacttcatcc tggccccacg cagcagtgac 1560
 ctcacagacc gcgtgaaggt gtggaccagc ggccagggtg aggagtatga cctggatgcc 1620
 gacgacatca actccagggt ggagatgaag cccaaataga aggggtctgg cccgggcatc 1680
 cacgtagggg gcaggggcag gggcgggcgg agggagggga ggggtgaaat ccatactgta 1740
 gacactctga caagctggcc aaagtcaact ccccaagatc tgccagacct gcatggtcaa 1800
 gcctcttatg ggggtgtttc tatctctttc tttctctttc tgtttctctg cctcagaget 1860
 tcctggggac caagatttac caattcacc actcccttga agttgtggag gaggtgaaag 1920
 aaagggaccc acctgctagt cgcctcag agcatgatgg gaggtgtgcc agaaagtccc 1980
 ccctcgcccc aaagttgctc accgactcac ctgcgcaagt gcctgggatt ctaccgtaat 2040
 tgctttgtgc ctttgggcac ggccctcctt cttttcctaa catgcacctt gctcccaatg 2100
 gtgcttgag ggggaagaga tcccaggagg tgcaagtggag ggggcaagct ttgctccttc 2160
 agttctgctt gctcccaagc cctgaccog ctgggactta ctgcctgacc ttggaatcgt 2220
 ccctatatca gggcctgagt gacctcctc tgcaaagtgg cagggaccgg cagagctcta 2280
 caggcctgca gcccctaagt gaaaacacag catgggtcca gaagacgtgg tctagaccag 2340
 ggctgctctt tcacttgcc ctgtgttctt tcccagggg catgactgtc gccacacgcc 2400
 tctgtgtaca tgtgtgcaga gcagacaggc taaaagcag agatcgacag acagccaggt 2460
 agttggaact ttctgttccc tatggagagg ctccctaca cagggcctgc tattgcagaa 2520
 tgaagccatt tagaggtga aggagaaata cccatgttac ttctctgagt tttagttggt 2580
 ctttccatct atcactgcat tatcttctc attcttcagt tctctactcc ctcttctcag 2640
 tgtagacaca ggtcaccatt atgctggtgt atgtttatca aagagcactt gagctgtctg 2700
 aagcccaaag cctgaggaca gaaagaccct gatgcaggtc agcccatgga ggcagatgcc 2760
 cttgctgggc ctgggggttt tccaagccct cagctggtcc tgaccaggat ggagcaagct 2820
 cttcccttgc tcatgagctc ctgatcagag gcatttgagc agctgaataa cctgcacag 2880
 cttgctgtat gaccctggc cacagcctc cctctgcatt gacctggagg ggagaggtca 2940
 gccttgacct aatgaggtag ctatagttgc agcccaagga cagttcagag atcaggatca 3000
 gctttgaagg ctggattcta tctacataag tcctttcaat tccaccaggg ccagagcagc 3060
 tccaccactg tgcacttagc catgatggca acagaaacca agagacacaa ttacgcaggt 3120
 atttagaagc agagggacaa ccagaaggcc cttaactatc accagtgeat cacatctgca 3180
 cactctcttc tccattccct agcaggaact tctagctcat ttaacagata aagaaactga 3240

ES 2 729 561 T3

ggcccacggt ttcagctaga caatgatttg gccaggccta gtaaccaagg cctgtctct 3300
 ggctactccc tggaccacga ggctgattcc tctcatttcc agcttctcag tttctgcctg 3360
 ggcaatggcc aggggccagg agtggggaga gttgtgatgg aggggagagg ggtcacaccc 3420
 accccctgcc tggttctagg ctgctgcaca ccaaggccct gcattctgtct gctctgcata 3480
 tatgtctctt tggagttgga atttcattat atgttaagaa aataaaggaa aatgacttgt 3540
 aaggtcaaaa aaaaaaacc ggaattcgat atcaagctta tcgataccgt cgacctcgag 3600
 ggggggcccg cgcttggcgt aatcatggtc atagctgttc cggatcctct agagtcgacc 3660
 tgcaggcatg caagcttggg atccttgtga aggaacctta cttctgtggt gtgacataat 3720
 tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa tataaaattt ttaagtgtat 3780
 aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta gattcacagt cccaaggctc 3840
 atttcaggcc cctcagtcct cacagtctgt tcatgatcat aatcagccat accacatttg 3900
 tagaggtttt acttgcctta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 3960
 tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 4020
 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggttgt 4080
 ccaaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatogcggc cgc 4123

<210> 17
 <211> 4123

5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3812)..(3812)
 <223> n es a, c, g, o t

15 <400>; 17

gcggccgcga tccagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa 60
 tgcagtgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca 120
 ttataagctg caataaaciaa gttacaacia acaattgcat tcattttatg tttcagggtc 180
 agggggagggt gtgggagggt ttttaaagca agtaaacct ctacaaatgt ggtatggctg 240
 attatgatca tgaacagact gtgaggactg aggggcctga aatgagcctt gggactgtga 300
 atctaaaata cacaaacaa tagaatcagt agtttaacac attatacaact taaaaatttt 360
 atatttacct tagagcttta aatctctgta ggtagtttgt ccaattatgt cacaccacag 420
 aagtaagggt ccttcacaaa gatcccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac tctagaggat 480
 ccggaacagc tatgaccatg attacccaa gcgcggggccc cccctcgagg tcgacgggat 540

ES 2 729 561 T3

cgataagctt gatatogaat tccggttttt tttttttgac cttacaagtc attttccttt 600
 attttcttaa catataatga aattccaact ccaagagac atatatgcag agcagacaga 660
 tgcagggcct tgggtgtcag cagcctagaa ccaggcaggg ggtgggtgtg acccctctcc 720
 cctccatcac aactctccc actcctggcc cctggccatt gccaggcag aaactgagaa 780
 gctggaaatg agaggaatca gcctcgtggt ccagggagta gccagagaca gggccttggt 840
 tactaggcct ggccaaatca ttgtctagct gaaaccgtgg gcctcagttt ctttatctgt 900
 taaatgagct agaagttcct gctagggaat ggagaagaga gtgtgcagat gtgatgcact 960
 ggtgatagtt aagggccttc tggttgtccc tctgcttcta aatacctgag taattgtgtc 1020
 tcttggttcc tgttgccatc atggctaagt gcacagtggg ggagctgctc tggccctggt 1080
 ggaattgaaa ggacttatgt agatagaatc cagccttcaa agctgatcct gatctctgaa 1140
 ctgtccttgg gctgcaacta tagctacctc attaggtcaa ggctgacctc tcccctccag 1200
 gtcaatgcag agggaaggct gtggccaggg gtcatacagc aagcctgtgc aggttattca 1260
 gctgctcaaa tgcctctgat caggagctca tgagcaaggg aagagcttgc tccatcctgg 1320
 tcaggaccag ctgagggcctt ggaaaacccc caggcccagc aagggcatct gcctccatgg 1380
 gctgacctgc atcagggctc ttctgtcctc agcctttggg cttcagacag ctcaagtgct 1440
 ctttgataaa catacaccag cataatggtg acctgtgtct acactgacaa gagggagtag 1500
 agaactgaag aatgagcaag ataatgcagt gatagatgga aagaccaact aaaactcaga 1560
 gaagtaacat gggatatttct ccttcaccct ctaaatggct tcattctgca atagcaggcc 1620
 ctgtgtaggg aagcctctcc ataggaaca gaaagttcca actacctggc tgtctgtcga 1680
 tctctgcttt gtagcctgtc tgctctgcac acatgtacac agaggcgtgt ggcgacagtc 1740
 atgcccctgg ggaaagaaca cagggcaagt ggaagagca gccctggtct agaccacgtc 1800
 ttctggacct atgctgtggt tgcacttagg ggctgcaggc ctgtagagct ctgccggtcc 1860
 ctgccacttt gcagaaggag gtcactcagg ccctgatata gggacgattc caaggtcagg 1920
 cagtaagtcc gagcgggtca ggggcttggg agcaagcaga actgaaggag caaagcttgc 1980
 ccctccact gcacctctg ggatctcttc cccctccaag caccattggg agcaaggtgc 2040
 atgttaggaa aagaaggagg gccgtgccc aaggcacaaa gcaattacgg tagaatccca 2100
 ggcacttgag caggtgagtc ggtgagcaac tttggggcga ggggggactt tctggcacac 2160
 ctcccatcat gctctgaggg gcgactagca ggtgggtccc tttctttcac ctctccaca 2220
 acttcaaggg agtgggtgaa ttggtaaate ttggtccca ggaagctctg aggccaggaa 2280
 acagaaagag aaagaaagag atagaaacac ccccataaga ggcttgacca tgcaggtctg 2340
 gcagatcttg gggaagtgac tttggccagc ttgtcagagt gtctacagta tggatttcac 2400

ES 2 729 561 T3

ccctcccctc cctccgcccg cccctgcccc tgccccctac gtggatgccc gggccagacc 2460
 ccttctattt gggcttcata tccaccctgg agttgatgtc gtcggcatcc aggtcatact 2520
 cctccacctg gcogctggtc cacacottca cgcggtctgt gaggtcactg ctgctggtggg 2580
 ccaggatgaa gtcgtagatg agtacagcca gggctcccc gatgaatggc cccaccocaga 2640
 aaatccagtg gttgctgaag ttgtgtgtga tcaccgcgga gccaaaggac cgagcagggg 2700
 taatcccaca gccagtgtag tcaatagcca ggaggtgtcc aagggctaca gagaggccga 2760
 tggcaagggg ggctgagcca ccaaggtcac ggcgcctccg gtcggtagta gccagcacgc 2820
 atagcaccag ctggagggtc ccgatgatct cgatgccag gccctggccc gagtccacac 2880
 catcagccag gtcattgcgg ccaagcgagt tcccagtcag ggaggaggtg atgcctgaga 2940
 ggatggcggg ggcgacgatg gcccccaogc actgggggat gatgtacatg agggcaocga 3000
 agatgctgat ctggcagctg agcagcagcc ccagtgtgac agccgggttg aggtggcgc 3060
 cgctgatgtg gcccacactc tgccgacagc tggcgatgct cagcccgaag gccagcgaca 3120
 ccttcacggt gtccctggacc gccgtctggt tgttcccac cgggtatttg aagcccaggg 3180
 cagaaccgat gctgatgaag acaaagaggg tcgtggccag gaactcggcc accactgccc 3240
 tccagaagag cttcttcttg aactcgctgg ccattgctgg agggggcttg gcctgagacc 3300
 gctgcogggg gctcaattcc ctctgagagc tggtagcgag ctcgaaatcg cgcgaccgga 3360
 tctgacgggt cactaaacga gctctgctta tatagacctc ccaccgtaca cgcctaccgc 3420
 ccatttgcgt caacggggcg gggttattac gacattttgg aaagtcccg tgattttgg 3480
 gccaaaacaa actcccattg acgtcaatgg ggtggagact tggaaatccc cgtgagtcaa 3540
 accgctatcc acgcccattg gtgtactgcc aaaaccgcat caccatggta atagcgatga 3600
 ctaatacgtg gatgtactgc caagtaggaa agtcccgtaa ggtcatgtac tgggcataat 3660
 gccagggcgg ccatttaccg tcattgacgt caataggggg cggacttggc atatgatata 3720
 ctgatgtac tgccaagtgg gcagtttacc gtaaatactc caccattga cgtcaatgga 3780
 aagtccctat tggcgttact atgggaacat angtcattat tgacgtcaat gggcgggggt 3840
 cgttggggcg tcagccaggc gggccattta ccgtaagtta tgtaacgagg aactccatat 3900
 atgggctatg aactaatgac cccgtaattg attactatta ataactagtc aataatcaat 3960
 gtcaacatgg cggctatatt ggacatgagc caatataaat gtacatatta tgatatagat 4020
 acaacgtatg caatggccaa tagccaatat tgatttatgc tatataacca atgactaata 4080
 tggctaattg ccaatattga ttcaatgtat agatcgcggc cgc 4123

<210> 18

<211> 8605

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

ES 2 729 561 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (939)..(939)
 <223> n e s a, c, g, o t

5

<400> 18

```

cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg      60
ccgcaaaaaa ggaataagg ggcacacgga aatggtgaat actcactc ttccttttc      120
aatattattg aagcatttat cagggttatt gtgtcatgag cggatacata tttgaatgta      180
tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg      240
tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct      300
ttcgtcttca agaattcgcg cgaccggatc cgggcaacgt tggtgccatt gctgcaggcg      360
gagaactggt aggtatggaa gatctttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgtcac      420
tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag      480
cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact aggggttcct ggaggggtgg      540
agtcgtgacg tgaattacgt catagggtta gggaggtcct gtattagagg tcacgagctc      600
ggtaccgtcg acgcgccgc acgcgtcacg gccgcgatct atacattgaa tcaatattgg      660
caattagcca tattagtcat tggttatata gcataaatca atattggcta ttggccattg      720
catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc aatagaccg      780
ccatgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg gtcattagtt      840
catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga      900
ccgccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacnt atgttcccat agtaacgcca      960
atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttggca     1020
gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg     1080
cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg gcagtacatc     1140
tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac caatgggctg     1200
ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt caatgggagt     1260
ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgct gtaataacce cgccccgttg     1320
acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata taagcagagc tcgtttagtg     1380
aaccgtcaga tccggtcgcg cgaattcgag ctcggtacca gctctcagag ggaattgagc     1440
accggcgacg ggtctcagc caagccccct gccagcatgg ccagcgagtt caagaagaag     1500
ctcttctgga gggcagtggg ggccgagttc ctggccacga ccctctttgt cttcatcagc     1560
    
```

ES 2 729 561 T3

atcggttctg ccttgggctt caaataccog gtggggaaca accagacggc ggtccaggac 1620
 aacgtgaagg tgtcgctggc ctctgggctg agcatcgcca cgctggcgca gagtgtgggc 1680
 cacatcagcg gcgcccacct caaccggct gtcacactgg ggctgctgct cagctgccag 1740
 atcagcatct tccgtgcctt catgtacatc atcgcccagt gcgtgggggc catcgtcgcc 1800
 accgccatcc tctcaggcat cacctcctcc ctgactggga actcgcttgg ccgcaatgac 1860
 ctggctgatg gtgtgaactc gggccagggc ctgggcatcg agatcatcgg gaccctccag 1920
 ctggtgctat gcgtgctggc tactaccgac cggaggcgcc gtgaccttgg tggctcagcc 1980
 ccccttgcca tcggcctctc tgtagccctt ggacacctcc tggctattga ctacactggc 2040
 tgtgggatta accctgtctg gtcccttggc tcccggtga tcacacacaa cttcagcaac 2100
 cactggattt tctgggtggg gccattcatc gggggagccc tggctgtact catctacgac 2160
 ttcactctgg cccacgcag cagtgcctc acagaccgag tgaaggtgtg gaccagcggc 2220
 caggtggagg agtatgacct ggatgccgac gacatcaact ccagggtgga gatgaagccc 2280
 aatagaagg ggtctggccc gggcatccac gtagggggca ggggcagggg cgggcggagg 2340
 gggggagggt gtgaaatcca tactgtagac actctgacaa gctggccaaa gtcacttccc 2400
 caagatctgc cagacctgca tggccaagcc tcttatgggg gtgtttctat ctctttcttt 2460
 ctctttctgt ttctggcctt cagagcttcc tggggaccaa gatttaccaa ttcaccact 2520
 cccttgaagt tgtggaggag gtgaaagaaa gggaccacc tgctagtcgc ccctcagagc 2580
 atgatggggg gtgtgccaga aagtcccccc tcgccccaaa gttgctcacc gactcacctg 2640
 cgcaagtgcc tgggattcta ccgtaattgc tttgtgcctt tgggcacggc cctccttctt 2700
 ttcttaacat gcaccttgc cccaatggtg cttggagggg gaagagatcc caggagggtg 2760
 agtggagggg gcaagctttg ctcttcagt tctgcttgc cccaagcccc tgaccogctc 2820
 ggacttactg cctgaccttgaatcgctcc tatatcaggg cctgagtgac ctcttctg 2880
 aaagtggcag gaccggcag agctctacag gcctgcagcc cctaagtgca aacacagcat 2940
 gggccagaa gacgtggtct agaccagggc tgctctttcc acttgccctg tgttctttcc 3000
 ccaggggcat gactgtcgcc acacgcctct gtgtacatgt gtgcagagca gacaggctac 3060
 aaagcagaga tcgacagaca gccaggtagt tggaaacttc tgttcctat ggagaggctt 3120
 ccctacacag ggctgctat tgcagaatga agccatttag agggatgaag agaaataccc 3180
 atgttacttc tctgagtttt agttggtctt tccatctatc actgcattat cttgctcatt 3240
 cttcagttct ctactccctc ttgtcagtg agacacaggt caccattatg ctggtgtatg 3300
 tttatcaaag agcacttgag ctgtctgaag cccaaagcct gaggacagaa agaccctgat 3360
 gcaggtcagc ccatggaggc agatgcctt gctgggcctg ggggttttcc aagccctcag 3420
 ctggtcctga ccaggatgga gcaagctctt cccttgctca tgagctcctg atcagaggca 3480

ES 2 729 561 T3

ttgagcagc tgaataacct gcacaggctt gctgtatgac ccctggccac agccttcctt 3540
 ctgcattgac ctggagggga gaggtcagcc ttgacctaat gaggtagcta tagttgcagc 3600
 ccaaggacag ttcagagatc aggatcagct ttgaaggctg gattctatct acataagtcc 3660
 tttcaattcc accagggcca gagcagctcc accactgtgc acttagccat gatggcaaca 3720
 gaaaccaaga gacacaatta cgcaggtatt tagaagcaga gggacaacca gaaggccctt 3780
 aactatcacc agtgcacac atctgcacac tctcttctcc attccctagc aggaacttct 3840
 agctcattta acagataaag aaactgaggc ccacggtttc agctagacaa tgatttggcc 3900
 aggccctagta accaaggccc tgtctctggc tactccctgg accacgaggc tgattcctct 3960
 catttccagc ttctcagttt ctgcctgggc aatggccagc ggccaggagt ggggagagtt 4020
 gtgatggagg ggagaggggt cacaccacc ccctgcctgg ttctaggctg ctgcacacca 4080
 aggccctgca tctgtctgct ctgcatatat gtctctttgg agttggaatt tcattatatg 4140
 ttaagaaaat aaaggaaaat gacttctaag gtcaaaaaa aaaaaccgga attcgatatc 4200
 aagcttatcg ataccgtcga cctcgagggg gggcccgcg ttggcgtaat catggtcata 4260
 gctgttccgg atcctctaga gtcgacctgc aggcattgcaa gcttgggatc tttgtgaagg 4320
 aaccttactt ctgtggtgtg acataattgg acaaactacc tacagagatt taaagctcta 4380
 aggtaaatat aaaattttta agtgtataat gtgttaaact actgattcta attgtttgtg 4440
 tatttttagat tcacagtccc aaggctcatt tcaggccctc cagtcctcac agtctgttca 4500
 tgatcataat cagccatacc acattttag aggttttact tgctttaaaa aacctcccac 4560
 acctcccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgtaac ttgtttattg 4620
 cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 4680
 tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 4740
 tcgcgccgt agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa cccctagtga 4800
 tggagttggc cactccctct ctgcgctctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg 4860
 tcgcccagc cccgggcttt gccgggagg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg 4920
 gagtggccaa agatctctag agctctacgc cggacgcatc gtggccggca tcaccggcgc 4980
 cacaggtgcg gttgctggcg cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg 5040
 ccacttcggg ctcatgagcg cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg 5100
 gggactgttg ggcgccatct ccttgcatgc accattcctt gcggcgggcg tgctcaacgg 5160
 cctcaacct ctactgggct gcttcctaat gcaggagtgc cataaggag agcgtcgacc 5220
 gatgcccttg agagccttca acccagtcag ctcttccgg tgggcgggg gcatgactat 5280
 cgtcgcgca cttatgactg tcttctttat catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc 5340

ES 2 729 561 T3

gctctgggtc attttcggcg aggaccgctt tcgctggagc gcgacgatga tcggcctgtc 5400
gcttgccgga ttoggaatct tgcacgccct cgctcaagcc ttcgtcactg gtcccgccac 5460
caaacgtttc ggcgagaagc aggcattat cgccggcatg gcggccgacg cgctgggcta 5520
cgtcttgctg gcgttcgcga cgcgaggctg gatggccttc cccattatga ttcttctcgc 5580
ttccggcggc atcgggatgc ccgcttgca ggccatgctg tccaggcagg tagatgacga 5640
ccatcagggg cagcttcaag gatcgctcgc ggctcttacc agcctaactt cgatcactgg 5700
accgctgacg gtcacggcga tttatgccgc ctccggcagc acatggaacg ggttggcatg 5760
gattgtaggc gcggccctat accttgctg cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcattggag 5820
ccgggccacc tcgacctgaa tggaaagccg cggcacctcg ctaacggatt caccactcca 5880
agaattggag ccaatcaatt ctgctggaga actgtgaatg cgcaaaccaa cccttggcag 5940
aacatatcca tcgctcgcgc catctccagc agccgcacgc ggccatctc gggcagcgtt 6000
gggtcctggc caccgggtgcg catgatcgtg ctctgtcgt tgaggaccog gctaggctgg 6060
cgggggtgcc ttactggta gcagaatgaa tcaccgatac gcgagcgaac gtgaagcgcac 6120
tgctgctgca aaacgtctgc gacctgagca acaacatgaa tggctctcgg tttccgtggt 6180
tcgtaaagtc tggaaacgcg gaagtcagcg cctgcacca ttatgttccg gatctgcatc 6240
gcaggatgct gctggctacc ctgtggaaca cctacatctg tattaacgaa gcgctggcat 6300
tgaccctgag tgatTTTTct ctggtcccgc cgcattccata ccgccagttg tttaccctca 6360
caacgttoca gtaaccgggc atgttcatca tcagtaaccg gtatcgtgag catcctctct 6420
cgtttcatcg gtatcattac ccccatgaa agaaattccc ccttacacgg aggcattcaag 6480
tgaccaaaca gaaaaaac gccttaaca tggcccgtt tatcagaagc cagacattaa 6540
cgcttctgga gaaactcaac gagctggacg cggatgaaca ggacagatc tgtgaatcgc 6600
ttcacgacca cgctgatgag ctttaccgca gctgcctcgc gcgtttcggg gatgacgggtg 6660
aaaacctctg acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg 6720
ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttg cgggtgtcgg ggcgcagcca 6780
tgaccagtc acgtagcgat agcggagtgt atactggctt aactatgcgg catcagagca 6840
gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa 6900
ataccgcatc aggcgctctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgctcg 6960
gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggccgtaata cggttatcca cagaatcagg 7020
ggataacgca gaaagaaca tgtgagcaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 7080
ggccgcgctg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg 7140
acgctcaagt cagagggtgc gaaacccgac aggaactataa agataccagg cgtttcccc 7200
tggaaagctc ctcgtgcgct ctctgttcc gacctgccg cttaccggat acctgtccg 7260

ES 2 729 561 T3

```

ctttctccct tgggaagcg tggcgcttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc 7320
ggtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agcccagccg 7380
ctgcgctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc 7440
actgggagga gccactggtg acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 7500
gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgctc 7560
tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac 7620
caccgctggt agcgggtggt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 7680
atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 7740
acgttaaggg attttggca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa 7800
ttaaaaatga agttttaaat caatctaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta 7860
ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt 7920
tgctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 7980
tgctgcaatg ataccgcgag acccagcggc ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc 8040
ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat 8100
tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc 8160
attgctgcag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttgga tggcttcatt cagctccggt 8220
tcccaacgat caagggcagt tacatgatcc cccatggtgt gcaaaaaagc ggttagctcc 8280
ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg 8340
gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccacocgtaa gatgcttttc tgtgactggt 8400
gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg 8460
gcgtcaacac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga 8520
aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg 8580
taaccactc gtgcacccaa ctgat 8605

```

<210> 19

<211> 8605

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (7667)..(7667)

<223> n e s a , c , g , o t

15 <400> 19

ES 2 729 561 T3

atcagttggg tgcaccgagt ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg 60
 agagttttcg cccccaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg 120
 gcgcggtatt atccccgttt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt 180
 ctccagaatga cttgggtgag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga 240
 cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac 300
 ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc 360
 atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc 420
 gtgacaccac gatgcctgca gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac 480
 tacttactct agcttcccg gcaacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag 540
 gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg 600
 tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt 660
 tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggtgaacga aatagacaga tcgctgagat 720
 aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta 780
 gattgattta aaacttcatt ttaatttaa aagatctag gtgaagatcc ttttgataa 840
 tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgtccac tgagcgtcag accccgtaga 900
 aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt tttctcgcg gtaatctgct gcttgcaaac 960
 aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt 1020
 tccgaaggta actggcttca gcagagcgc gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc 1080
 gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata 1140
 cctgttaacca gtggctctc ccagtggcga taagtctgt cttaccgggt tggactcaag 1200
 acgatagtta ccgataaagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc 1260
 cagcttgagc cgaacgcct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc attgagaaag 1320
 cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggc caggtatccg gtaagcggca gggcgggaac 1380
 aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg 1440
 gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct 1500
 atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc 1560
 tcacatgttc tttcctcgtt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga 1620
 gtgagctgat accgctcggc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcagga 1680
 agcggaaagc cgctgatgc ggtatcttct ccttacgcat ctgtcgggta tttcacaccg 1740
 catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agtatacact 1800
 ccgctatcgc taogtgactg ggtcatggct gcgccccgac acccgccaac acccgctgac 1860
 gcgccctgac gggcttctct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc 1920

ES 2 729 561 T3

gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagctgcgg 1980
 taaagctcat cagcgtggtc gtgaagcgat tcacagatgt ctgcctgttc atccgcgtcc 2040
 agctcgttga gtttctccag aagcgtaaat gtctggcttc tgataaagcg ggccatgta 2100
 agggcggttt tttcctgttt ggtcacttga tgcctccgtg taaggggaa tttctgttca 2160
 tgggggtaat gataccgatg aaacgagaga ggatgctcac gatacgggtt actgatgatg 2220
 aacatgcccg gttactggaa cgttgtgagg gtaacaact ggcggtatgg atgcccgggg 2280
 accagagaaa aatcactcag ggtcaatgcc agcgcctcgt taatacagat gtaggtgttc 2340
 cacaggtag ccagcagcat cctgcgatgc agatccggaa cataatggtg cagggcgctg 2400
 acttccgcgt ttccagactt tacgaaacac ggaaccgaa gaccattcat gttgttctc 2460
 aggtcgcaga cgttttgcag cagcagtcgc ttcaagttcg ctccgctatc ggtgattcat 2520
 tctgctaacc agtaaggcaa ccccgcagc ctagccgggt cctcaacgac aggagcacga 2580
 tcatgcgcac ccgtggccag gacccaacgc tgcccagat gcgcgcgctg cgctgtctgg 2640
 agatggcgga cgcgatgat atgttctgcc aagggttggg ttgcgcattc acagttctcc 2700
 gcaagaattg attggctcca attcttgag tggtaatcc gttagcgagg tgccgccggc 2760
 ttccattcag gtcgaggtgg cccggctcca tgcaaccgca cgcaacgagg ggaggcagac 2820
 aaggtatag gcggcgccta caatccatgc caaccgctc catgtgctcg ccgagggcgc 2880
 ataaatcgcc gtgacgatca gcggtccagt gatcgaagt aggctggtaa gagccgcgag 2940
 cgatccttga agctgtccct gatggtcgtc atctacctgc ctggacagca tggcctgcaa 3000
 cgcgggcatc ccgatgccgc cggaagcgag aagaatcata atggggaagg ccatccagcc 3060
 tcgctgcgag aacgccagca agacgtagcc cagcgcgctc gccgccatgc cggcgataat 3120
 ggcctgcttc tcgccgaaac gtttgggtggc gggaccagt acgaaggett gagcgagggc 3180
 gtgcaagatt ccgaataccg caagcgacag gccgatcatc gtcgcgctcc agcgaagcg 3240
 gtccctgcgc aaaatgacct agagcgtgc cggcacctgt cctacgagtt gcatgataaa 3300
 gaagacagtc ataagtgcgg cgacgatagt catgccccgc gccaccgga aggagctgac 3360
 tgggttgaag gctctcaagg gcatcggtcg acgctctccc ttatgcgact cctgcattag 3420
 gaagcagccc agtagtaggt tgaggccggt gagcaccgcc gccgcaagga atggtgcatg 3480
 caaggagatg gcgcccaca gtccccggc cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa 3540
 acaagcgtc atgagcccga agtggcgagc ccgatcttcc ccatcgggta tgtcggcgat 3600
 ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc ggtgatgcc gccacgatgc gtcggcgta 3660
 gagctctaga gatctttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc 3720
 cgggcaaagc ccgggcgctg ggcgacctt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg 3780

ES 2 729 561 T3

cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact aggggttcct tgtagttaat gattaacccg 3840
 ccatgctact tatctacggc cgcgatccag acatgataag atacattgat gagtttggac 3900
 aaaccacaac tagaatgcag tgaaaaaaaa gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg 3960
 ctttatttgt aaccattata agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt 4020
 ttatgtttca gggtcagggg gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca 4080
 aatgtggtat ggctgattat gatcatgaac agactgtgag gactgagggg cctgaaatga 4140
 gccttgggac tgtgaatcta aaatacaca acaattagaa tcagtagttt aacacattat 4200
 acacttaaaa attttatatt taccttagag ctttaaatct ctgtaggtag tttgtccaat 4260
 tatgtcacac cacagaagta aggttccttc acaagatcc caagcttgca tgcctgcagg 4320
 tcgactctag aggatccgga acagctatga ccatgattac gccaaagcgcg ggccccccct 4380
 cgaggtcgac ggtatcgata agcttgatat cgaattccg tttttttttt ttgaccttac 4440
 aagtcatttt cttttatttt cttaacatat aatgaaattc caactccaaa gagacatata 4500
 tgcagagcag acagatgcag ggcttggtg tgcagcagcc tagaaccagg caggggggtg 4560
 gtgtgacccc tctcccctcc atcacaactc tccccactcc tggcccctgg ccattgcccc 4620
 ggcagaaact gagaagctgg aaatgagagg aatcagcctc gtggtccagg gagtagccag 4680
 agacagggcc ttggttacta ggctggcca aatcattgtc tagctgaaac cgtgggcctc 4740
 agtttcttta tctgttaaat gagctagaag ttctctgctag ggaatggaga agagagtgtg 4800
 cagatgtgat gcaactgtga tagttaaggg ccttctggtt gtccctctgc ttctaataac 4860
 ctgcgtaatt gtgtctcttg gtttctgttg ccatcatggc taagtgcaca gtggtggagc 4920
 tgctctggcc ctggtggaat tgaaggact tatgtagata gaatccagcc ttcaaagctg 4980
 atcctgatct ctgaaactgtc cttgggctgc aactatagct acctcattag gtcaaggctg 5040
 acctctcccc tccaggcaaa tgcagaggga aggctgtggc caggggtcat acagcaagcc 5100
 tgtgcagggt attcagctgc tcaaatgcct ctgatcagga gctcatgagc aaggaagag 5160
 cttgctccat cctggtcagg accagctgag ggcttgaaa acccccaggc ccagcaaggg 5220
 catctgcctc catgggctga cctgcatcag ggtctttctg tcctcaggct ttgggcttca 5280
 gacagctcaa gtgctctttg ataaacatac accagcataa tgggtacctg tgtctacact 5340
 gacaagaggg agtagagaac tgaagaatga gcaagataat gcagtgatag atggaagac 5400
 caactaaaa cagagaagt aacatgggta tttctccttc acctctaaa tggcttcatt 5460
 ctgcaatagc aggccctgtg tagggaagcc tctccatag gaacagaaaag ttccaactac 5520
 ctggctgtct gtogatctct gctttgtagc ctgtctgctc tgcacacatg tacacagagg 5580
 cgtgtggcga cagtcatgcc cctggggaaa gaacacaggg caagtggaaa gagcagccct 5640
 ggtctagacc acgtcttctg gaccatgct gtgtttgcac ttaggggctg caggcctgta 5700

ES 2 729 561 T3

gagctctgcc ggtccctgcc actttgcaga aggaggtcac tcaggccctg atataggac 5760
 gattccaagg tcaggcagta agtccgagcg ggtcaggggc ttgggagcaa gcagaactga 5820
 aggagcaaag cttgccccct ccaactgcacc tcctgggatc tcttccccct ccaagcacca 5880
 ttgggagcaa ggtgcatgtt aggaaaagaa ggagggccgt gcccaaaggc acaaagcaat 5940
 tacggtagaa tcccaggcac ttgctgaggt gagtcggtga gcaactttgg ggcgaggggg 6000
 gactttctgg cacacctccc atcatgctct gagggggcac tagcaggtgg gtccctttct 6060
 ttcacctcct ccacaacttc aaggagtggt gtgaattggt aaatcttgg cccaggaag 6120
 ctctgaggcc aggaaacaga aagagaaaga aagagataga aacacccccca taagaggctt 6180
 gaccatgcag gtctggcaga tcttggggaa gtgactttgg ccagcttgtc agagtgtcta 6240
 cagtatggat ttcacccctc ccctccctcc gcccgccct gccctgccc cctacgtgga 6300
 tgcccgggcc agacccttc tatttgggct tcactccac cctggagttg atgtcgtcgg 6360
 catccaggtc aactcctcc acctggcgc tggccacac cttcacggcg tctgtgaggt 6420
 cactgctcgc tggggccagg atgaagtct agatgagtac agccagggt cccccgatga 6480
 atggcccccac ccagaaaatc cagtgttgc tgaagttgtg tgtgatcacc ggggagccaa 6540
 aggaccgagc aggttaatc ccacagccag tgtagtcaat agccaggagg tgtccaaggg 6600
 ctacagagag gccgatggca aggggggctg agccaccaag gtcacgggc ctccggtcgg 6660
 tagtagccag cacgcatagc accagctgga ggtcccgat gatctcgatg cccaggccct 6720
 ggcccaggtt cacaccatca gccaggtcat tgcggccaag cgagttcca gtcagggagg 6780
 aggtgatgcc tgagaggatg gcggtggcga cgatggccc cacgcaactgg gcgatgatgt 6840
 acatgagggc acggaagatg ctgatctggc agctgagcag cagccccagt gtgacagccg 6900
 ggttgaggtg ggcgccctg atgtggccca cactctgcgc cagcgtggcg atgctcagcc 6960
 cgaaggccag cgacacctc acgttgcct ggaccgccgt ctggttgttc cccaccgggt 7020
 atttgaagcc cagggcagaa ccgatgctga tgaagacaaa gaggtcgtg gccaggaact 7080
 cgccaccac tgcctccag aagagcttct tcttgaactc gctggccatg ctggcagggg 7140
 gcttggcctg agaccgctgc cgggtgctca attcctctg agagctggtg ccgagctcga 7200
 attcgcgcga ccgatctga cggttcacta aacgagctct gcttatatag acctcccacc 7260
 gtacacgcct accgccatt tgcgtcaacg gggcggggtt attacgacat tttggaaagt 7320
 cccggtgatt ttggtgcaa acaaaactcc cattgacgtc aatggggtgg agacttgaa 7380
 atccccgtga gtcaaacgc tatccacgcc cattggtgta ctgcaaaaac cgcacacca 7440
 tggtaatagc gatgactaat acgtagatgt actgccaagt aggaaagtcc cgtaaggtca 7500
 tgtactgggc ataatgccag gcgggccatt taccgctatt gacgtcaata gggggcggac 7560

ES 2 729 561 T3

ttggcatatg atacacttga tgtactgcca agtgggcagt ttaccgtaaa tactccaccc	7620
attgacgtca atggaaagtc cctattggcg ttactatggg aacatangtc attattgacg	7680
tcaatgggcg ggggtcgttg ggcggtcagc caggcgggcc atttaccgta agttatgtaa	7740
cgcggaactc catatatggg ctatgaacta atgaccccggt aattgattac tattaataac	7800
tagtcaataa tcaatgtcaa catggcggtc atattggaca tgagccaata taaatgtaca	7860
tattatgata tagatacaac gtatgcaatg gccaatagcc aatattgatt tatgctatat	7920
aaccaatgac taatatggct aattgccaat attgattcaa tgtatagatc gcggccgtga	7980
cgcgtgcggc cgcgtcgacg gtaccgagct cgtgacctct aatacaggac ctccctaacc	8040
ctatgacgta attcacgtca cgactccacc cctccaggaa cccctagtga tggagttggc	8100
cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc	8160
ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa	8220
agatcttcca tacctaccag ttctccgctt gcagcaatgg caacaacgtt gcccgatcc	8280
ggtcgcgcga attcttgaag acgaaagggc ctcgtgatac gcctattttt ataggttaat	8340
gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga	8400
accctatfff gtttattfff ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gacacaataa	8460
ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt	8520
gtcgccctta ttcccttttt tgccgcattt tgccttctctg tttttgctca cccagaaacg	8580
ctggtgaaag taaaagatgc tgaag	8605

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso (i) en el tratamiento del síndrome de Sjögren o (ii) en la prevención de la xerostomía o la xeroftalmía asociadas con el síndrome de Sjögren, siendo que la composición comprende un vector de expresión de AAV que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína acuaporina (AQP) o un virión de AAV que comprende el vector AAV, donde la administración de la composición a un sujeto (i) alivia al menos un síntoma de la xerostomía o la xeroftalmía asociadas al síndrome de Sjögren o (ii) protege al sujeto de la xerostomía o la xeroftalmía asociadas al síndrome de Sjögren.
- 10 2. Un vector de expresión de AAV que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína de acuaporina (AQP), un virión de AAV que comprende el vector AAV o la composición para su uso según la reivindicación 1 destinada al uso en el tratamiento de la xerostomía o la xeroftalmía asociadas al síndrome de Sjögren.
- 15 3. El vector, virión de AAV, o composición para su uso según la reivindicación 2, donde el vector, el virión de AAV, o la composición se diseña para su administración a una glándula salival o lagrimal del sujeto.
4. El vector, el virión de AAV, o la composición para su uso según la reivindicación 2, donde la administración del medicamento mantiene o mejora el nivel de la función de la glándula salival o lagrimal con respecto al nivel de dicha función antes de la administración del fármaco.
- 20 5. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el vector o virión para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde la proteína AQP es una proteína AQP-1 o AQP-5.
- 25 6. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el vector o virión para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde la proteína AQP se selecciona del grupo que consiste en:
- 30 a) una proteína AQP que comprende al menos una porción de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:14, y en donde la proteína AQP es capaz de formar un canal que permite el paso del agua; y,
- b) una proteína AQP que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 80 % a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:8, la SEQ ID NO:11 y la SEQ ID NO:14, y donde la proteína AQP es capaz de formar un canal que permite el paso del agua.
- 35 7. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el vector o virión para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO:2, SEC. ID NO:5, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:14.
- 40 8. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el vector o virión para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el vector se selecciona del grupo que consiste en un vector de AAV2, un vector de AAV5, un vector de AAV6 y un vector de BAAV.
- 45 9. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el virión para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el virión de AAV se selecciona del grupo que consiste en un virión de AAV2, un virión de AAV5, un virión de AAV6 y un virión de BAAV.

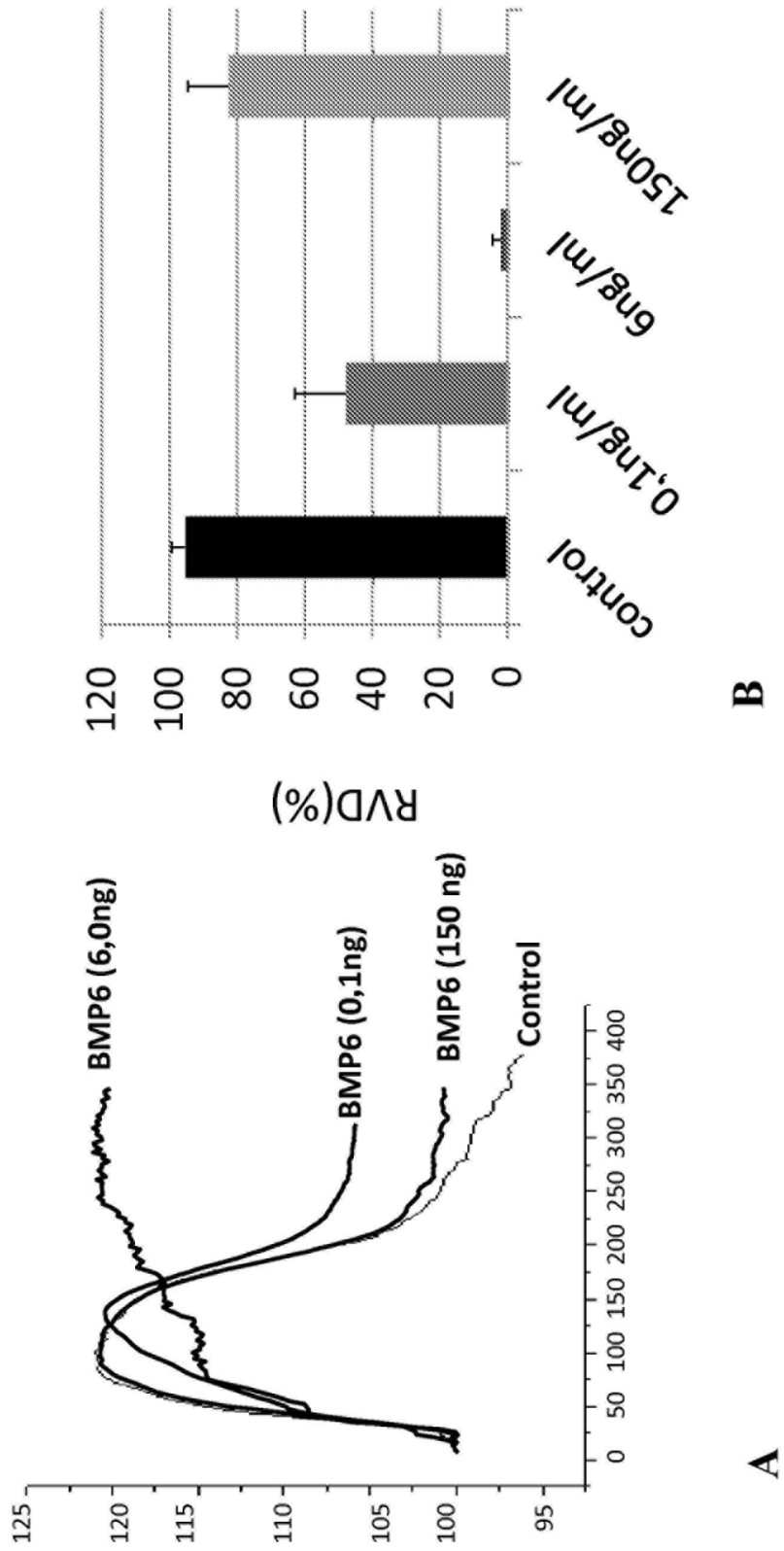


Figura 1

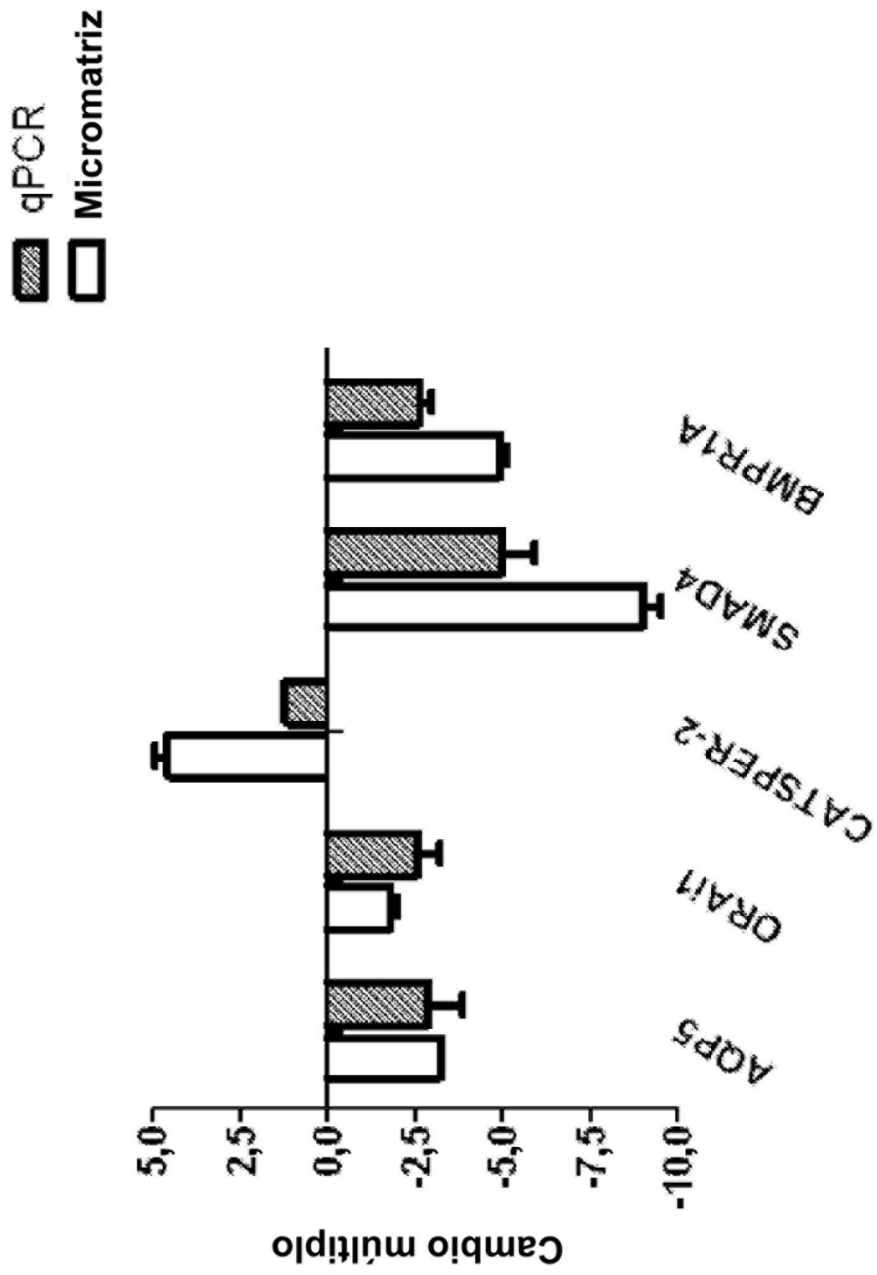


Figura 2

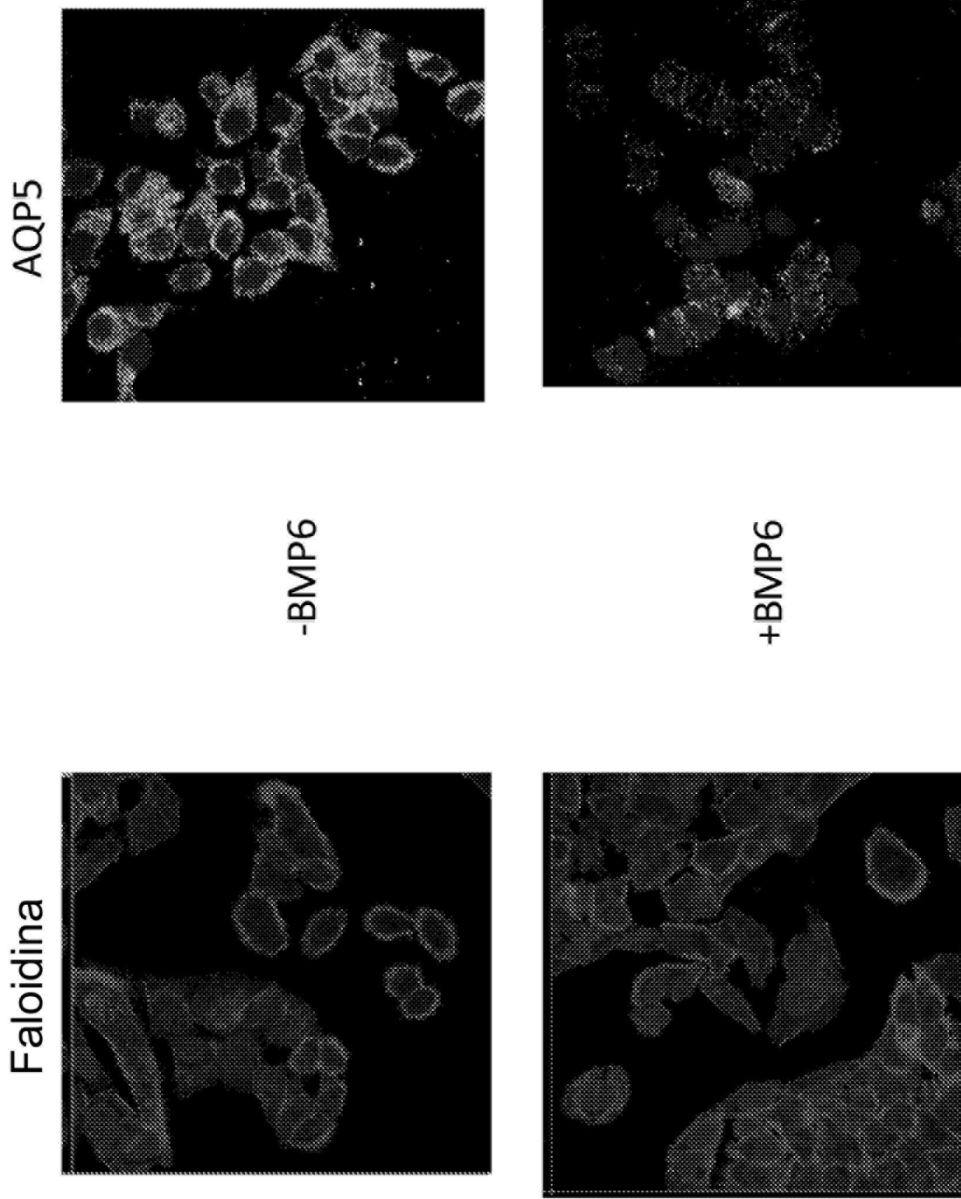


Figura 3B

Figura 3A

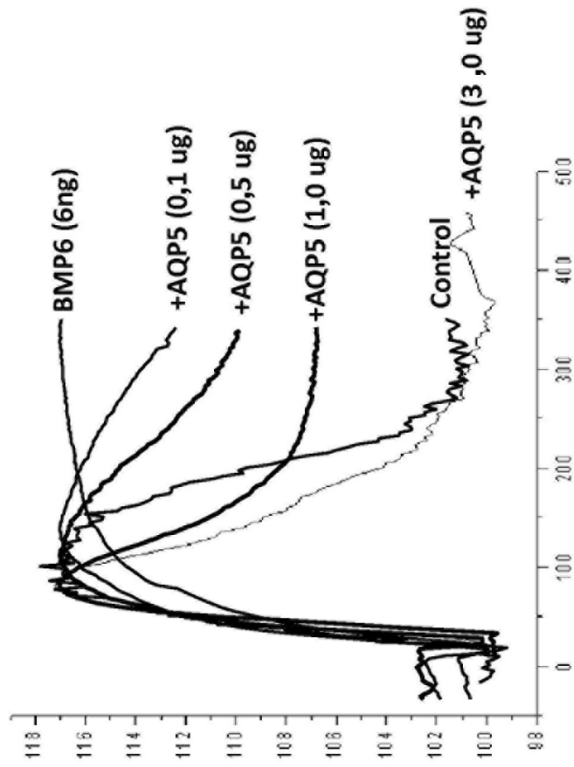


Figure 4A

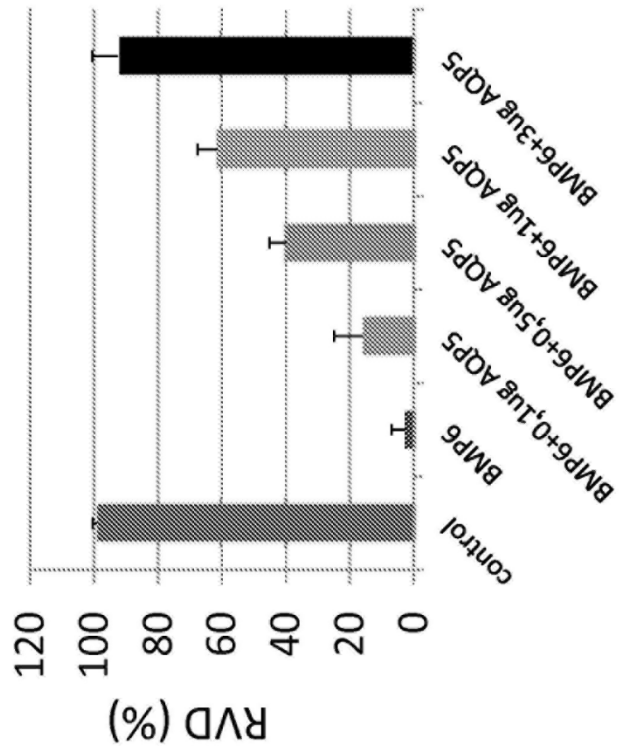


Figure 4B

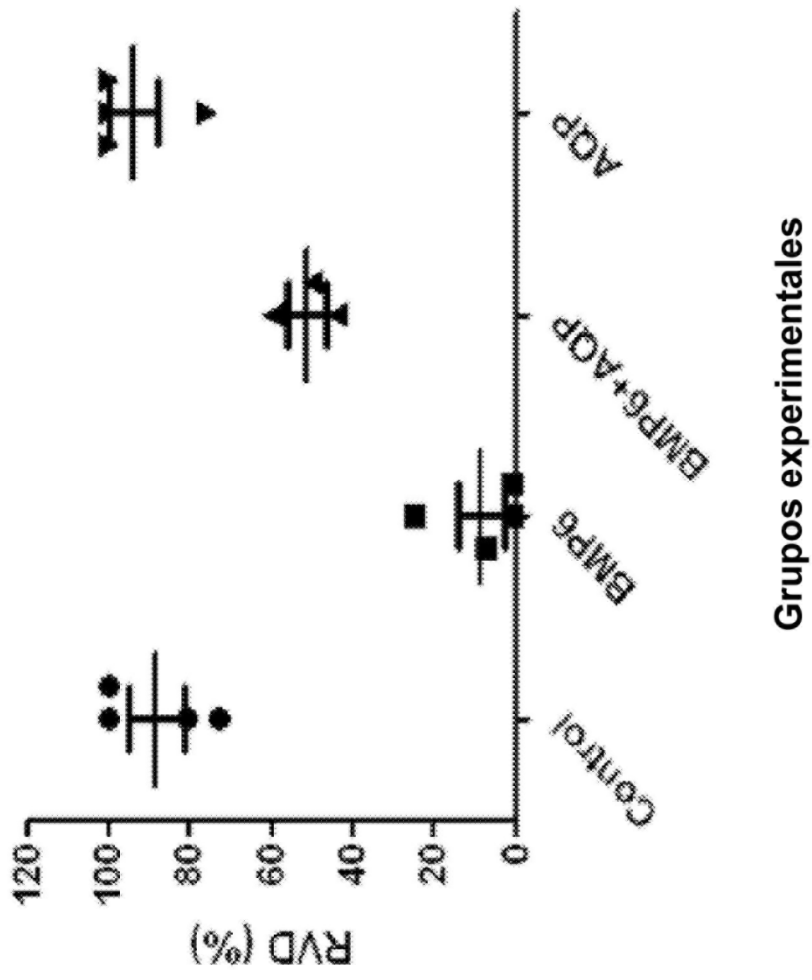


Figura 4C

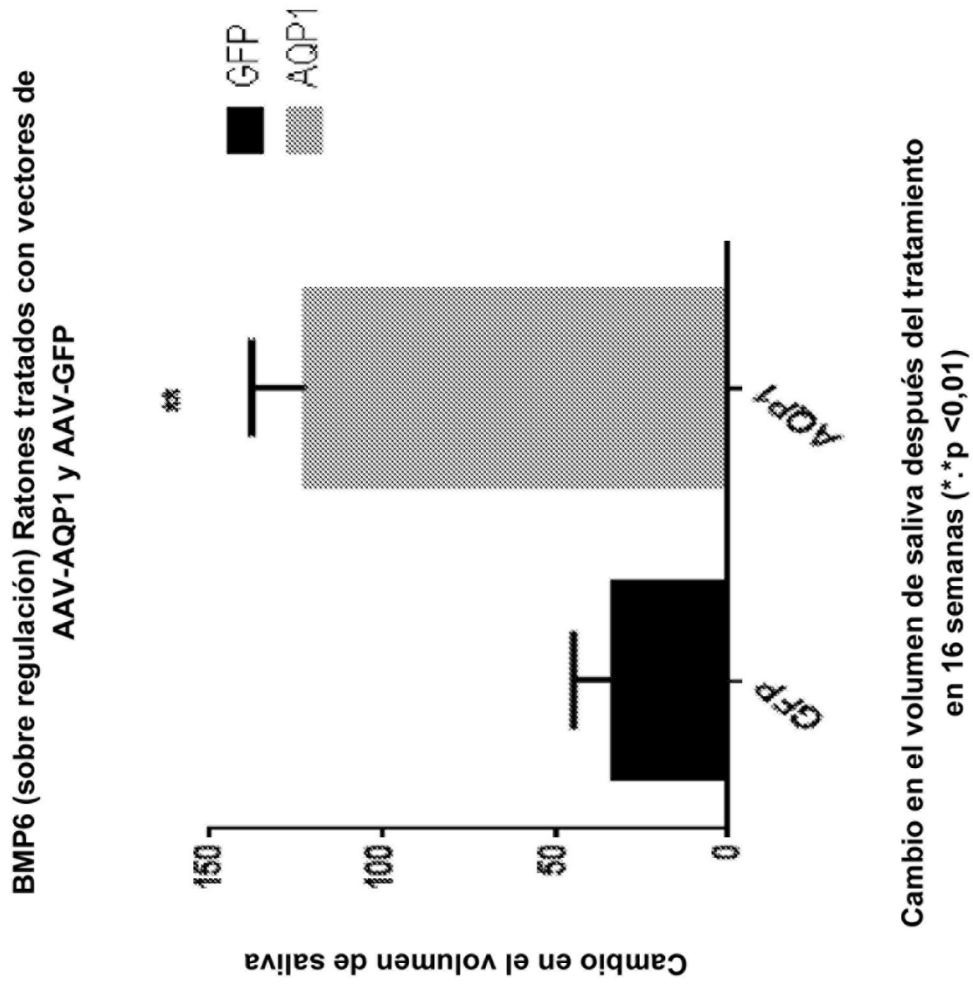
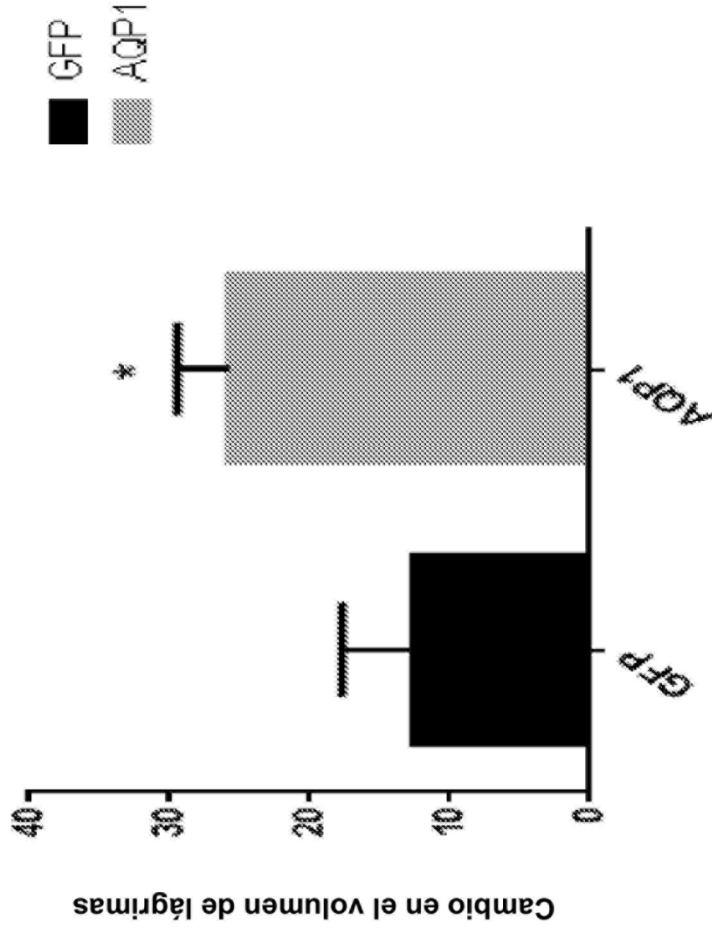


Figura 5A

BMP6 (sobre regulación) Ratones tratados con vectores de AAV-AQP1 y AAV-GFP



Cambio en el volumen de lágrimas después del tratamiento en 18 semanas (*: *p < 0,05)

Figura 5B