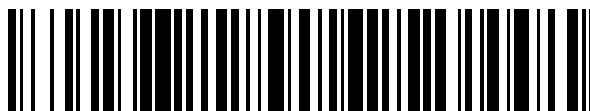


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 264**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2015 PCT/EP2015/080356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097218**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2015 E 15817239 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3233129**

54 Título: **Construcciones de ácido nucleico y vectores de terapia génica para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Wilson y otras afecciones**

30 Prioridad:

17.12.2014 EP 14382530

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2020

73 Titular/es:

**FUNDACION PARA LA INVESTIGACION MEDICA
APLICADA (100.0%)
Avda Pio XII, 55
31008 Pamplona, ES**

72 Inventor/es:

**MURILLO SAUCA, OIHANA;
GONZÁLEZ ASEGUINOLAZA, GLORIA y
HERNÁNDEZ ALCOCEBA, RUBÉN**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 784 264 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

Construcciones de ácido nucleico y vectores de terapia génica para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Wilson y otras afecciones

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a construcciones de ácido nucleico y a vectores de terapia génica para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Wilson y de otras afecciones.

Estado de la técnica

Merle *et al.* revisaron el estado de la técnica relativo a la terapia génica de la enfermedad de Wilson (*Current Gene Therapy* 2007; 7: 217-220), y este se resume y se completa en el presente documento con las referencias divulgadas más adelante.

La enfermedad de Wilson (EW) es un trastorno autosómico recesivo heredado del metabolismo del cobre con una frecuencia media de 1:30.000. La EW está causada por mutaciones del gen ATP7B, codificante de una ATPasa transportadora del cobre de tipo P, que se encuentra en el cromosoma 13. ATP7B se expresa principalmente en los hepatocitos y funciona en el transporte transmembrana del cobre. La ausencia o la reducción de la función de la proteína ATP7B conduce a una reducción de la excreción hepatocelular del cobre en la bilis, y produce una acumulación del cobre principalmente en el hígado y, posteriormente, en el sistema neurológico y en otros tejidos. La incapacidad de incorporar el cobre en la ceruloplasmina es una consecuencia adicional de la pérdida de la proteína ATP7B funcional.

EW puede presentarse clínicamente como una enfermedad hepática, como un trastorno neurológico progresivo o como una enfermedad psiquiátrica. En general, los pacientes con EW hepática la presentan al final de la infancia o adolescencia, y presentan características de hepatitis aguda, insuficiencia hepática fulminante o enfermedad hepática crónica progresiva. Las manifestaciones neurológicas de la EW normalmente se presentan más tarde que la enfermedad hepática, con mayor frecuencia en la segunda o tercera década, e incluyen síntomas cerebelosos y cerebrales extrapiramidales.

El objetivo del tratamiento médico de la EW es eliminar el depósito tóxico del cobre del organismo y evitar su reacumulación. En la actualidad, hay tres fármacos contra el cobre aprobados para la EW: la D-penicilamina, la trientina y las sales de cinc. La terapia médica es eficaz en la mayoría, pero no en todos los pacientes con EW. El trasplante de hígado es una opción terapéutica en pacientes con EW que presentan insuficiencia hepática fulminante o insuficiencia hepática progresiva. Se ha demostrado que corrige el fenotipo de la EW y proporciona una excelente supervivencia a largo plazo.

Sin embargo, una interrupción de la terapia o un tratamiento inadecuado pueden provocar la muerte en pocos meses. Debido a que la medicación para la EW debe tomarse regularmente, la adherencia al tratamiento, en algunos pacientes, especialmente, en pacientes adolescentes con EW, es baja.

Bajo terapia, los síntomas neurológicos residuales son relativamente comunes e incluso pueden aparecer síntomas progresivos. Debido a que las opciones actuales de tratamiento médico no son eficaces en todos los pacientes con EW y la adherencia a la terapia es un problema, una solución más amplia podría implicar la terapia génica.

Teóricamente, la expresión de ATP7B de tipo silvestre en los hepatocitos revertiría todas las anomalías relacionadas con la enfermedad, y salvaría el hígado y evitaría los síntomas neurológicos. El objetivo final de una terapia génica ideal para la EW sería administrar ATP7B, en cantidad suficiente, específicamente a los hepatocitos durante toda la vida.

Todos los estudios publicados sobre la transferencia de genes adenovíricos para la EW han usado vectores adenovíricos de primera generación que solo producen la expresión transgénica transitoria. Terada *et al.* [Terada *et al. J. Biol. Chem.* 1998; 273:1815-1820; Terada *et al. FEBS Lett.* 1999; 448: 53-56] demostraron la transferencia exitosa de genes mediante la administración de genes mediada por adenovirus en el modelo de ratas LEC. Se observó el restablecimiento de la síntesis de holoceruloplasmina, de la actividad de la ceruloplasmina oxidasa en suero y de la excreción del cobre en la bilis, indicando un efecto terapéutico de la transferencia génica. Estos efectos fueron de una duración muy limitada, con un nivel máximo en el día tres y una disminución a partir de entonces. Ha-Hao *et al. [Z. Gastroenterol.* 2002; 40: 209-216] también demostraron un mayor contenido del cobre en las heces de ratas LEC tras la transferencia del gen ATP7B mediado por adenovirus, indicando una mayor excreción del cobre en la bilis. Además, se demostró el efecto terapéutico mediante el restablecimiento de la holoceruloplasmina y de su actividad ferroxidasa. Sin embargo, una vez más, la duración del efecto terapéutico en estos experimentos fue solo transitoria, con una duración limitada de unos cuantos días.

Hasta la fecha, todavía no se han probado los vectores adenovíricos "cobardes" para esta aplicación.

Otros sistemas de vectores víricos no integrantes comúnmente usados, el virus adenoasociado (AAV, *Adeno-Associated Virus*), no se ha probado para la EW hasta la fecha, principalmente, porque el gen ATP7B (de aproximadamente 4,4 kb de longitud) deja un espacio mínimo para asignar el resto de secuencias requeridas (por ejemplo, promotor, secuencia de señal de poli A, etc.) dentro del vector AAV, cuya capacidad de empaquetamiento es de 4,4-4,7 kb. La solicitud de patente alemana DE 100156121A1 (publicada en 2003) propuso un vector vírico recombinante adenoasociado para la terapia génica de la EW que posee un promotor acortado sensible al metal (promotor de la metalotioneína I) para producir expresión inducible por cobre o cinc del transgén ATP7B. No obstante, este documento no proporciona, ni se ha desvelado con posterioridad, información alguna sobre la eficacia terapéutica y el rendimiento del vector.

Por otro lado, se han probado varios vectores lentivíricos portadores de ATP7B de tipo silvestre en modelos animales de EW. Merle *et al.* [*Scan. J. Gastroenterol.* 2006; 41: 974-982] informaron de la terapia génica sistémica en ratas LEC con vectores lentivíricos con expresión de ATP7B bajo el control de un promotor de fosfogliceroquinasa. Veinticuatro semanas después de la transferencia génica, se redujo el contenido del cobre en el hígado significativamente, y la histología hepática mejoró en las ratas tratadas en comparación con los controles no tratados, pero el efecto fue solo parcial. La actividad de la ceruloplasmina oxidasa en suero aumentó dos semanas después de la transferencia de genes en comparación con los controles, sin embargo, disminuyó a niveles más bajos 24 semanas después del tratamiento. Más recientemente, Roybal *et al.* [*Gene Therapy* 2012; 19: 1085-1094] han informado sobre la transferencia temprana de genes gestacionales en ratones ATP7^{-/-} con un lentivirus portador de ATP7B humano bajo el control de la transcripción de un promotor específico del hígado que contenía elementos de apolipoproteína E y alfa-1 antitripsina. La administración en el útero del vector proporcionó una reducción en los niveles del cobre en el hígado, la preservación de la histología hepática normal, el restablecimiento de la incorporación del cobre a la ceruloplasmina y la mejora de la biosíntesis del colesterol. Sin embargo, la eficacia del tratamiento fue muy variable de un ratón a otro, y disminuyó con el tiempo.

Objeto de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

Los inventores han diseñado por primera vez un vector vírico adenoasociado que administrado a ratones con desactivación de ATP7B (un modelo animal reconocido de la enfermedad de Wilson) corrigió las principales características patológicas de la enfermedad de Wilson durante al menos 24 semanas después del tratamiento. Este vector de AAV, denominado en el presente documento AAV2/8-AAT-wtATP7B, porta un gen codificante del ATP7B humano bajo el control de la transcripción de un promotor específico del hígado que simplemente contiene la secuencia promotora mínima del gen de α 1-antitripsina (AAT). La excreción de Cu (contenido de Cu en la orina) y el contenido de Cu en el hígado se redujeron significativamente en los ratones con la enfermedad de Wilson tratados con el vector, mientras que la actividad ceruloplasmina se restableció significativamente. Además, dicho vector de AAV restableció la excreción fisiológica del cobre biliar. Por otro lado, la administración del vector produjo la normalización de los niveles de transaminasas en suero y de la histología hepática, junto con una notable reducción del infiltrado inflamatorio, de la proliferación de los conductos biliares y de la fibrosis. Estas observaciones indicaron que tanto la construcción de ácido nucleico (promotor de AAT unido a la secuencia codificante de ATP7B) como el vector de AAV de 5,1 kb de longitud que la porta permiten superar los efectos patológicos más relevantes de una acumulación del cobre vinculada a una deficiencia o disfunción de ATP7B y, por tanto, pueden ser muy adecuados para la terapia génica en el tratamiento de una afección causada por una deficiencia o disfunción de la ATPasa 2 transportadora del cobre, tales como la enfermedad de Wilson o una enfermedad y/o afección asociada con una disminución de la exocitosis lisosómica dependiente de ATP7B y la acumulación del cobre.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la divulgación se refiere a una construcción de ácido nucleico (en adelante también denominada "construcción de ácido nucleico de la divulgación"), que comprende: a) una secuencia de nucleótidos del promotor del gen de α 1-antitripsina (AAT); b) una secuencia de nucleótidos codificante de la ATPasa 2 transportadora del cobre (ATP7B); y c) una secuencia de señal de poliadenilación.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un vector de expresión (en adelante, también denominado "vector de expresión de la divulgación"), que comprende una construcción de ácido nucleico de la divulgación.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una célula hospedadora que comprende una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión de la divulgación.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una partícula vírica (en adelante, también denominada "partícula vírica de la divulgación"), que comprende una construcción nucleica o un vector de expresión de la divulgación. Preferentemente, la construcción de ácido nucleico constituye la secuencia genómica del vector vírico.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un producto de la divulgación, es decir, un producto que comprende una construcción de ácido nucleico de la divulgación, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "producto de la divulgación", como se usa en el presente

documento, se refiere a y cubre indistintamente cualquiera de entre: a) la construcción de ácido nucleico de la divulgación; b) el vector de expresión de la divulgación; c) la célula hospedadora de la divulgación; y d) la partícula vírica de la divulgación.

- 5 En otro aspecto, la divulgación se refiere además a un kit que comprende una construcción de ácido nucleico, un vector, una célula hospedadora, una partícula vírica o una composición farmacéutica de la divulgación en uno o más recipientes.

- 10 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un producto de la divulgación para su uso en medicina (como medicamento o composición medicinal). Este uso en medicina incluye el tratamiento de una afección causada por una deficiencia o disfunción de la ATPasa 2 transportadora del cobre. Dicho de otra manera, la divulgación se refiere: al uso de un producto de la divulgación en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una afección causada por una deficiencia o disfunción de la ATPasa 2 transportadora del cobre; y a un método de tratamiento de una afección causada por una deficiencia o disfunción de la ATPasa 2 transportadora del cobre en un sujeto o paciente, que comprende administrar al sujeto o paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto de la divulgación. En un aspecto más particular, el producto de la divulgación se usa para el tratamiento de la enfermedad de Wilson.

- 20 En otro aspecto, la divulgación se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un producto de la divulgación como se ha descrito anteriormente, para los usos propuestos en medicina y métodos terapéuticos descritos en el presente documento.

- 25 En un aspecto adicional más, la divulgación se refiere a un proceso de producción de partículas víricas de la divulgación que comprende las etapas de:

- a) cultivar una célula hospedadora que contenga una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión de la divulgación en un medio de cultivo; y
- b) recoger las partículas víricas del sobrenadante del cultivo celular y/o del interior de las células.

- 30 En un aspecto relacionado, la presente divulgación se refiere al uso de la construcción de ácido nucleico de la divulgación o del vector de expresión de la divulgación para la producción de partículas víricas.

Descripción de las figuras

- 35 Figura 1: Representación esquemática de la construcción de ácido nucleico del vector AAV2-AAT-wtATP7B que expresa ATP7B humano. Los elementos de la construcción son: a) el promotor del gen alfa-1-antitripsina (AAT); b) la secuencia de nucleótidos codificante de ATP7B humano; c) la secuencia de señal de poliadenilación (pA) y que flanquea el genoma del vector; y d) las secuencias de repetición terminales invertidas de AAV2 (ITR, *Inverted Terminal Repeat*).

- 40 Figura 2: Niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en suero en ratones de tipo silvestre (WT, *Wild Type*), Ratones deficientes en ATP7B (ratones con la enfermedad de Wilson, EW) y ratones con EW tratados con 1×10^{10} gv/ratón (1×10^{10} de AAV de EW) y con 3×10^{10} gv/ratón (3×10^{10} de AAV de EW) del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B. El vector se administró cuando los animales tenían 6 semanas de vida. Los niveles de ALT se midieron 4, 9, 14 y 24 semanas después del tratamiento (semanas) y se expresan como UI/I (UI: Unidades Internacionales), ns: no significativo; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ [prueba no emparejada de Mann-Whitney].

- 45 Figura 3: Contenido total del cobre en orina en ratones de tipo silvestre (WT), Ratones deficientes en ATP7B (ratones con la enfermedad de Wilson, EW) y ratones con EW tratados con 1×10^{10} gv/ratón (1×10^{10} de AAV de EW) y con 3×10^{10} gv/ratón (3×10^{10} de AAV de EW) del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B ($n = 5$ en cada grupo). El contenido del cobre se midió 4, 9, 14 y 24 semanas después del tratamiento (semanas) y se expresa como nanogramos de Cu (ng). ns: no significativo; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ [prueba no emparejada de Mann-Whitney].

- 50 Figura 4: Actividad ceruloplasmina en suero en ratones de tipo silvestre (WT), Ratones deficientes en ATP7B (ratones con la enfermedad de Wilson, EW) y ratones con EW tratados con 1×10^{10} gv/ratón (1×10^{10} de AAV de EW) y con 3×10^{10} gv/ratón (3×10^{10} de AAV de EW) del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B ($n = 5$ en cada grupo). La actividad ceruloplasmina se midió 4 semanas después del tratamiento, y se expresa como la absorbancia medida a 570 nm de longitud de onda [Abs (570 nm)]. ns: no significativo; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ [prueba no emparejada de Mann-Whitney].

- 55 Figura 5A: Contenido de cobre en el hígado en ratones de tipo silvestre (WT), Ratones deficientes en ATP7B (ratones con la enfermedad de Wilson, EW) y ratones con EW tratados con 1×10^{10} gv/ratón (1×10^{10} de AAV de EW) y con 3×10^{10} gv/ratón (3×10^{10} de AAV de EW) del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B ($n = 5$ en cada grupo). El contenido de cobre se determinó tras sacrificar a los animales 24 semanas después del tratamiento (30 semanas de vida) mediante espectroscopia de absorción atómica; y se expresa como $\mu\text{g/g}$ (μg de Cu/g de tejido hepático seco). ns: no significativo; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ [prueba no emparejada de Mann-Whitney].

- 60 Figura 5B. Contenido de Cu en el hígado en ratones WT ($n = 15$), Ratones con EW ($n = 25$) y ratones con EW tratados con 1×10^{10} gv/ratón ($n = 5$) y con 3×10^{10} gv/ratón ($n = 5$) del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B como se

describe para la Figura 5A, en donde el contenido de Cu en el hígado se presenta de forma individualizada y con la inclusión de más animales en los grupos de DW y WT.

Figura 6: Imágenes histológicas de hígados de animales de tipo silvestre (WT), Ratones deficientes en ATP7B (ratones con la enfermedad de Wilson, EW) y ratones con EW tratados con 1×10^{10} gv/ratón (1×10^{10} de AAV de EW) y con 3×10^{10} gv/ratón (3×10^{10} de AAV de EW) del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B ($n = 5$ en cada grupo). Las imágenes se tomaron después de sacrificar a los animales (30 semanas de vida). **A**: Imágenes de cortes hepáticos teñidos con hematoxilina y eosina. **B**: Imágenes de muestras histológicas teñidas mediante la técnica de sulfuro de plata de Timm para la detección de depósitos del cobre.

Figura 7: Análisis de la inflamación del hígado, de la proliferación de los conductos biliares y de la fibrosis. Imágenes de hígados de animales de tipo silvestre (WT), Ratones deficientes en ATP7B (ratones con la enfermedad de Wilson, EW) y ratones con EW tratados con 1×10^{10} gv/ratón (1×10^{10} de AAV de EW) y con 3×10^{10} gv/ratón (3×10^{10} de AAV de EW) del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B ($n = 5$ en cada grupo). El análisis se realizó tras sacrificar a los animales (30 semanas de vida). **CD45**: Imágenes de cortes hepáticos inmunoteñidos con anti-CD45 para detectar infiltrados inflamatorios del hígado. **PANCK**: Imágenes de cortes hepáticos inmunoteñidos con anti-**PANCK** para detectar la proliferación de los conductos biliares. **RS**: Imágenes de cortes hepáticos teñidos con Rojo Sirio para detectar la fibrosis.

Figura 8: Representación gráfica del análisis cuantitativo de la inflamación del hígado, de la proliferación de los conductos biliares y de la fibrosis realizada en imágenes digitales de cortes hepáticos inmunoteñidos con anti-CD45 (CD45; como marcador inflamatorio) o con anti-PanCk (PANCK; como marcador de la proliferación de los conductos biliares); o teñidos con Rojo Sirio (RS; como marcador de la fibrosis). Las mediciones se expresan como la proporción del área teñida inmunohistoquímicamente, área teñida de Rojo Sirio en el caso de la fibrosis, con respecto al área total (% de área teñida IHQ). ns: no significativo; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ [prueba no emparejada de Mann-Whitney].

Figura 9: Concentración del cobre en heces (A) y concentración del cobre en orina (B) en ratones con EW (EW) ($n = 5$), Ratones con EW tratados con 3×10^{10} gv/ratón (AAV de EW) ($n = 5$) del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B, y en un grupo de miembros de la misma camada heterocigotos (Control). 2 semanas después del tratamiento, la mitad de los ratones de cada grupo recibió una sobrecarga del cobre por vía intraperitoneal de $100 \mu\text{g}$ (+CuSO₄); y la otra mitad se dejó sin tratar (-CuSO₄). Se analizó la concentración del cobre en las heces (A) y en la orina (B) extraídas durante las siguientes 24 horas.

Figura 10. Contenido de Cu en el hígado en ratones de tipo silvestre (WT) ($n = 15$), ratones con EW ($n = 25$), ratones con EW tratados con 1×10^{10} gv/ratón ($n = 8$) (dosis subóptima) del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B (ATP7B) y ratones con EW tratados con 1×10^{10} gv/ratón ($n = 8$) del vector AAV2/8-AAT-coATP7B (coATP7B). El contenido de cobre se determinó tras sacrificar a los animales 24 semanas después del tratamiento mediante espectroscopia de absorción atómica; y se expresa como $\mu\text{g/g}$ (μg de Cu/g de tejido hepático seco), ns: no significativo; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ [prueba no emparejada de Mann-Whitney].

Descripción detallada de la invención

Todos los términos y expresiones usados en la presente solicitud, a menos que se indique lo contrario, se entenderán en su significado habitual, como se conoce en la técnica. Otras definiciones más específicas para determinados términos y expresiones usados en la presente solicitud son las que se establecen a continuación, y tienen por objeto aplicarse de manera uniforme a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, a menos que una definición expresamente establecida proporcione una definición más amplia.

Las expresiones "secuencia de ácido nucleico" y "secuencia de nucleótidos" se pueden usar indistintamente para referirse a cualquier molécula compuesta de o que comprenda nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico puede ser un oligonucleótido o un polinucleótido. Una secuencia de nucleótidos puede ser un ADN o ARN. Una secuencia de nucleótidos puede ser modificada químicamente o artificial. Las secuencias de nucleótidos incluyen ácidos nucleicos peptídicos (ANP), morfolidos y ácidos nucleicos bloqueados (ANB), así como ácidos nucleicos de glicol (ANG) y ácido nucleico de treosa (ANT). Cada una de estas secuencias se distingue del ADN o ARN natural por los cambios en la cadena principal de la molécula. Asimismo, se pueden usar nucleótidos de fosforotioato. Otros análogos de desoxinucleótidos incluyen metilfosfonatos, fosforoamidatos, fosforoditioatos, N3'P5'-fosforamidatos, y fosforotioatos de oligorribonucleótidos y sus análogos de 2'-O-alilo y metilfosfonatos de 2'-O-metil-ribonucleótido, que pueden usarse en un nucleótido de la divulgación.

La expresión "construcción de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico artificial producida a partir del uso de tecnología de ADN recombinante. Una construcción de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico, tanto monocatenaria como bicatenaria, que se ha modificado para contener segmentos de secuencias de ácido nucleico, que se combinan y se yuxtaponen de una manera, que, de otro modo, no existiría en la naturaleza. Normalmente, una construcción de ácido nucleico es un "vector", es decir, una molécula de ácido nucleico que se usa para administrar ADN creado de manera exógena a una célula hospedadora.

La expresión "vector de expresión" o el término "vector", como se usan en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos recombinante que es capaz de efectuar la expresión de un gen (transgén) en células hospedadoras u organismos hospedadores compatibles con dichas secuencias. Junto con el transgén, los vectores

de expresión normalmente incluyen al menos secuencias reguladoras de la transcripción adecuadas, y opcionalmente, señales de terminación de la transcripción 3'. También puede haber factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, tales como elementos potenciadores de la expresión capaces de responder a una señal inductiva precisa (factores de transcripción endógenos o quiméricos) o específicos de determinadas células, órganos o tejidos.

El término "sujeto" o "paciente", como se usa en el presente documento, se refiere a los mamíferos. Las especies de mamíferos que pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento desvelados incluyen, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos tales como simios; chimpancés; monos y orangutanes, animales domésticos, incluyendo perros y gatos, así como ganado, tal como caballos, ganado bovino, cerdos, ovejas y cabras, u otras especies de mamíferos que incluyen, sin limitación, ratones, ratas, cobayas, conejos, hámsters y similares.

La expresión "células de empaquetamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula o estirpe celular que puede transfectarse con un vector auxiliar o un virus o una construcción de ADN, y que proporciona en *trans* todas las funciones carentes que se requieren para la replicación completa y el empaquetamiento de un vector vírico. Por lo general, las células de empaquetamiento expresan de manera constitutiva o inducible una o más de dichas funciones víricas que faltan.

UNA CONSTRUCCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO DE LA DIVULGACIÓN

Secuencia de nucleótidos del promotor del gen α 1-antitripsina (AAT)

Como se usa en el presente documento, la expresión "promotor eucariota" se refiere a una región de secuencia de ADN que inicia la transcripción de un determinado gen, o una o más secuencias de codificación, en células eucariotas. Un promotor puede funcionar en concierto con otras regiones o elementos reguladores para dirigir el nivel de transcripción del gen o la/s secuencia/s de codificación. Estos elementos reguladores incluyen, sin limitación, sitios de unión de factor de transcripción, sitios de unión de proteínas represoras y activadoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida por un experto en la materia para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Incluyendo, por ejemplo, atenuadores, potenciadores y silenciadores. El promotor está ubicado cerca del sitio de inicio de la transcripción del gen o de la secuencia codificante a la que está unido operativamente, sobre la misma cadena y en dirección 5' de la secuencia de ADN (hacia la región 5' de la cadena codificante). Un promotor puede tener aproximadamente 100-1000 pares de bases de longitud. Las posiciones en un promotor se designan en relación con el sitio de inicio de la transcripción para un determinado gen (es decir, las posiciones en dirección 5' son números negativos que se cuentan desde -1, por ejemplo, -100 es una posición a 100 pares de bases en dirección 5').

La expresión "promotor central" o "promotor mínimo" se refiere a la parte mínima de una secuencia promotora requerida para iniciar adecuadamente la transcripción. Incluye el sitio de inicio de la transcripción (SIT) y elementos directamente en dirección 5'; un sitio de unión para la ARN polimerasa (ARN polimerasa II); y sitios de unión de factores de transcripción generales. Comúnmente, un promotor también comprende una secuencia de promotor proximal (en dirección 5' del promotor central), que contiene otros elementos reguladores primarios (tales como potenciadores, silenciadores, elementos límite/aislantes); y una secuencia promotora distal (en dirección 3' del promotor central), que puede contener elementos reguladores adicionales, normalmente, con una influencia más débil en el nivel de transcripción del gen.

La construcción de ácido nucleico de la divulgación comprende la secuencia de nucleótidos del promotor del gen de la α 1-antitripsina (AAT), es decir, comprende la secuencia promotora mínima del gen. En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, el ácido nucleico de la divulgación comprende la secuencia promotora mínima del gen AAT como la única secuencia de elementos reguladores eucariota.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la secuencia promotora de AAT es la secuencia parcial delimitada por las bases 156-460 de SEQ. ID. NO.1.

De acuerdo con la divulgación, la secuencia promotora de AAT está unida operativamente a la secuencia de nucleótidos codificante de la ATPasa 2 transportadora del cobre. Como se usa en el presente documento, la expresión "unido/a operativamente" se refiere a un enlace de elementos polinucleotídicos (o polipéptidos) en una relación funcional. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se ubica en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una secuencia promotora o una secuencia reguladora de la transcripción está unida operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Unido/a operativamente significa que las secuencias de ADN que están unidas normalmente son contiguas; cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, son contiguas y en marco de lectura.

ATPasa 2 transportadora del cobre (ATP7B)

La ATPasa 2 transportadora del cobre (ATP7B) es una ATPasa transportadora de cationes de tipo P que funciona exportando cobre de las células.

El gen que codifica la enzima humana se encuentra en el cromosoma 13 (ubicación del cromosoma 13q14.3; nombre del gen ATP7B). Hay información sobre el polipéptido ATP7B humano (secuencias de aminoácidos, estructura, dominios y otras características) disponible, por ejemplo, en Uniprot con número de registro: P35670 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P35670>; Versión de entrada 168 (3 de septiembre de 2014), Versión de secuencia 4 (16 de junio de 2009)). La información sobre el gen ATP7B codificante de esta enzima está disponible en Entrez con el número de registro ID del gen: 540 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/540>; actualizado el 19 de septiembre de 2014). Se han descrito 4 isoformas producidas por cortes y empalmes alternativos para ATP7B; se escoge la isoforma 1 (identificador P35670-1, 1.465 aminoácidos de longitud) como secuencia canónica.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la construcción de ácido nucleotídico de la divulgación comprende una secuencia de nucleótidos codificante de un ATP7B humano, preferentemente, un ATP7B humano cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia canónica (SEQ. ID. NO. 3), también denominada en el presente documento wtATP7B.

Debido a la redundancia de los codones, existen numerosas secuencias de nucleótidos que pueden generarse codificando polipéptidos ATP7B con la misma secuencia de aminoácidos.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la secuencia de nucleótidos codificante de la ATPasa 2 transportadora del cobre es la secuencia codificante CDS de la SEQ. ID. NO. 1, bases 473-4.870.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la secuencia de nucleótidos codificante de la ATPasa 2 transportadora del cobre es la secuencia codificante CDS de la SEQ. ID. NO. 2, bases 473-4.870, una secuencia con un sesgo de uso de codones optimizado para las células humanas que codifica el mismo wtATP7B.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la secuencia de nucleótidos que codifica la ATPasa 2 transportadora de cobre es una secuencia en donde al menos 1.170, al menos 1.245, al menos 1.315 o al menos 1.390 de los codones codificantes de la ATPasa 2 transportadora del cobre son idénticos a la secuencia codificante CDS 473-4.870 de la SEQ. ID. NO. 2.

Secuencia de señal de poliadenilación

Como se usa en el presente documento, la expresión "señal de poliadenilación" o "señal de poli(A)" se refiere a una secuencia de reconocimiento específica dentro de la región 3' no traducida (UTR (*UnTranslated Region*) 3') del gen, que se transcribe en la molécula precursora de ARNm y guía la terminación de la transcripción del gen. La señal de poli(A) actúa como una señal para la escisión endonucleolítica del ARNm precursor recién formado en su extremo 3', y para la adición a este extremo 3' de un tramo de ARN que solo consiste en bases de adenina (proceso de poliadenilación; cola poli(A)). La cola poli(A) es importante para la exportación nuclear, la traducción y la estabilidad del ARNm. En el contexto de la divulgación, la señal de poliadenilación es una secuencia de reconocimiento que puede dirigir la poliadenilación de genes de mamíferos y/o genes víricos, en células de mamífero.

Las señales de poli(A) normalmente consisten en a) una secuencia de consenso AAUAAA, que se ha demostrado que es necesaria tanto para la escisión en el extremo 3' como para la poliadenilación del ARN pre-mensajero (pre-ARNm), así como para potenciar la terminación de la transcripción en dirección 3'; y b) elementos adicionales en dirección 5' y dirección 3' de AAUAAA que controlan la eficiencia de la utilización de AAUAAA como una señal de poli(A). Hay una considerable variabilidad en estos motivos en genes de mamíferos.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la secuencia de señal de poliadenilación de la construcción de ácido nucleico de la divulgación es una secuencia de señal de poliadenilación de un gen de mamífero o un gen vírico. Las señales de poliadenilación adecuadas incluyen, entre otras, una señal de poliadenilación temprana de SV40, una señal de poliadenilación tardía de SV40, una señal de poliadenilación de timidina quinasa de HSV, una señal de poliadenilación del gen de protamina, una señal de poliadenilación del adenovirus 5 Elb, una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento, una señal de poliadenilación de PBGD y similares.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la secuencia de señal de poliadenilación de la construcción de ácido nucleico es una secuencia de señal de poli(A) sintética que también es capaz de dirigir y efectuar la escisión endonucleolítica y la poliadenilación del ARNm precursor procedente de la transcripción de la secuencia de nucleótidos codificante de ATP7B.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la secuencia de señal de poliadenilación de la construcción de ácido nucleico es la secuencia de señal de poli(A) sintética delimitada por las bases 4.877-4.932 de la SEQ. ID. NO. 1.

Otros elementos nucleotídicos

En un aspecto, la construcción de ácido nucleico de la divulgación constituye el genoma recombinante de un vector de expresión para terapia génica, el vector de expresión de la divulgación; y, más concretamente, de un vector vírico para terapia génica.

Por tanto, en un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la construcción de ácido nucleico de la divulgación comprende además una ITR 5' y una ITR 3' de un virus.

Como se usa en el presente documento, la expresión "repetición terminal invertida (ITR)" se refiere a una secuencia de nucleótidos ubicada en el extremo 5' (ITR 5') y una secuencia de nucleótidos ubicada en el extremo 3' (ITR 3') de un virus, que contienen secuencias palindrómicas y que pueden plegarse para formar estructuras de horquilla en forma de T que funcionan como cebadores durante el inicio de la replicación del ADN. También son necesarias para la integración del genoma vírico en el genoma del hospedador; para el rescate del genoma del hospedador; y para la encapsidación de ácido nucleico vírico en viriones maduros. Las ITR se requieren en *cis* para la replicación del genoma del vector y su empaquetamiento en las partículas víricas.

En un aspecto, la construcción de ácido nucleico comprende una ITR 5', una señal de empaquetamiento ψ y una ITR 3' de un virus. "La señal de empaquetamiento ψ " es una secuencia de nucleótidos de acción en *cis* del genoma del virus, que, en algunos virus (por ejemplo, adenovirus, lentivirus, etc.) es esencial para el proceso de empaquetamiento del genoma del virus en la cápside vírica durante la replicación.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la construcción de ácido nucleico comprende una ITR 5' y una ITR 3' de un virus seleccionado del grupo que consiste en parvovirus (en particular, virus adenoasociados), adenovirus, alfavirus, retrovirus (en particular, retrovirus gamma y lentivirus), virus del herpes y SV40; en un aspecto preferido, el virus es un virus adenoasociado (AAV), un adenovirus (Ad) o un lentivirus.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la construcción de ácido nucleico comprende una ITR 5' y una ITR 3' de un AAV.

El genoma de AAV se compone de una molécula de ADN monocatenaria, lineal, que contiene 4.681 bases (Berns y Bohenzky, (1987) "Advances in Virus Research (Academic Press, Inc.) 32:243-307). El genoma incluye repeticiones terminales invertidas (ITR) en cada extremo que funcionan en *cis* como orígenes de la replicación del ADN y como señales de empaquetamiento para el virus. Las ITR tienen aproximadamente 145 pb de longitud. La parte interna no repetida del genoma incluye dos grandes marcos abiertos de lectura, conocidos como los genes rep y cap de AAV, respectivamente. Estos genes codifican las proteínas víricas que participan en la replicación y en el empaquetamiento del virión. En particular, se sintetizan al menos cuatro proteínas víricas a partir del gen rep de AAV, Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40, nombradas de acuerdo con su peso molecular evidente. El gen cap de AAV codifica al menos tres proteínas, VP1, VP2 y VP3. Para una descripción detallada del genoma de AAV, véase, por ejemplo, Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129.

La construcción de viriones de AAV recombinantes se conoce en general en la técnica, y se ha descrito, por ejemplo, en los documentos US 5.173.414 y US 5.139.941; WO 92/01070, WO 93/03769, (Lebkowski *et al.* (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent *et al.* (1990) "Vaccines 90" (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) "Current Opinion in Biotechnology" 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129; y Kotin, R. M. (1994) "Human Gene Therapy" 5:793-801.

En un aspecto preferido, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la construcción de ácido nucleico o el vector de expresión de la divulgación comprende o consiste en:

- a) una secuencia de nucleótidos del promotor del gen de $\alpha 1$ -antitripsina (AAT);
- b) una secuencia de nucleótidos codificante de una ATPasa 2 transportadora del cobre;
- c) una secuencia de señal de poliadenilación; y
- d) secuencias de ITR 5' e ITR 3' de un virus adenoasociado (AAV).

La divulgación puede llevarse a cabo usando ITR de cualquier serotipo de AAV, incluyendo AAV1, AAV2, AAV3

(incluyendo los tipos 3A y 3B), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino y cualquier otro serotipo de AAV conocido en la actualidad o que se descubra más adelante.

5 En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la construcción de ácido nucleico comprende una ITR 5' y una ITR 3' de un AAV de un serotipo seleccionado del grupo que consiste en un AAV1, un AAV2 y un AAV4. En un aspecto preferido, la construcción de ácido nucleico comprende las secuencias de ITR delimitadas por las bases 1-141 y las bases 4.968-5.107 de SEQ. ID. NO. 1, que son las secuencias de ITR de un AAV2.

10 Las ITR son los únicos elementos víricos del AAV que se requieren en *cis* para la replicación del genoma de AAV y su empaquetamiento en las partículas víricas.

15 En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la construcción de ácido nucleico comprende una ITR 5', una señal de empaquetamiento ψ y una ITR 3' de un adenovirus de cualquiera de los serotipos dentro de cualquiera de los subgrupos de clasificación (A-F). En un aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, estas secuencias de ITR 5', de la señal ψ e ITR 3' proceden de un adenovirus del subgrupo C, más preferentemente, de un adenovirus de serotipo 2 (Ad2) o serotipo 5 (Ad5).

Por otro lado, en otros aspectos, la divulgación puede llevarse a cabo usando ITR 5' y/o ITR 3' sintéticas; y también mediante el uso de una ITR 5' y un ITR 3' procedente de virus de diferentes serotipos.

25 Todos los demás genes víricos necesarios para la replicación del vector vírico pueden proporcionarse en *trans* dentro de las células productoras de virus (células de empaquetamiento) como se describe a continuación. Por lo tanto, su inclusión en la construcción de ácido nucleico de un genoma de vector vírico de acuerdo con la divulgación es opcional. En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, el vector de expresión es un vector de AAV.

30 En un aspecto particular, la construcción de ácido nucleico de la divulgación constituye un vector de AAV cuya secuencia de nucleótidos es la SEQ. ID. NO. 1 o la SEQ. ID. NO. 2.

35 En otro aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, el vector de expresión es un vector adenovírico. Este vector adenovírico de acuerdo con la divulgación puede ser, en particular, un adenovirus de primera, segunda o tercera generación [véase "Adenovirus. Methods and Protocols". Chillon M. y Bosch A. (Eds); Tercera Edición; 2014 Springer] o cualquier otro sistema de vectores adenovíricos ya conocido o descrito más adelante.

40 En un aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, el vector vírico de la divulgación es un "adenovirus de tercera generación", que también puede denominarse "adenovirus cobardes", "adenovirus dependiente de auxiliar (HD-Ad)" o "adenovirus de alta capacidad (HC-Ad)". Un adenovirus de tercera generación tiene todas las regiones codificantes víricas eliminadas ("cobarde"); depende de un adenovirus auxiliar para replicarse (dependiente del auxiliar); y puede transportar y administrar a la célula hospedadora inserciones de hasta 36 Kpb de material genético foráneo (alta capacidad). Un adenovirus "cobarde" mantiene las repeticiones terminales invertidas ITR (5' y 3') y la señal de empaquetamiento(ψ).

45 La construcción de ácido nucleico y el vector de expresión de la divulgación que se describen en el presente documento se pueden preparar y obtener mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia: Sambrook y Russell ("Molecular Cloning: a Laboratory Manual"; Tercera Edición; 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press); y Green y Sambrook ("Molecular Cloning: a Laboratory Manual"; Cuarta Edición; 2012 Cold Spring Harbor Laboratory Press).

55 UNA PARTICULA VÍRICA DE LA DIVULGACIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA

La expresión "partícula vírica" y el término "virión" se usan en el presente documento indistintamente, y se refieren a una partícula de virus infecciosa y normalmente defectuosa en la replicación que comprende el genoma vírico (es decir, la construcción de ácido nucleico del vector vírico de expresión) empaquetado dentro de una cápside y, según sea el caso, una envoltura lipídica que rodea la cápside.

60 En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, el virión de la divulgación es un "virión de AAV recombinante" o "virión de rAAV" obtenido mediante el empaquetamiento de una construcción de ácido nucleico de un vector de AAV de acuerdo con la divulgación en una cubierta de proteína.

Las proteínas de la cápside vírica de un virus adenoasociado (proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3) se generan a partir de un solo gen vírico (gen *cap*). Las diferencias entre las secuencias de proteínas de la cápside de los diferentes serotipos de AAV dan lugar al uso de diferentes receptores de la superficie celular para la entrada celular. En combinación con vías alternativas de procesamiento intracelular, esto da lugar a distintos tropismos tisulares para cada serotipo del AAV.

En un aspecto particular, se puede preparar un virión de AAV recombinante de acuerdo con la divulgación mediante la encapsulación de la construcción de ácido nucleico de un genoma de AAV derivado de un determinado serotipo de AAV en una partícula vírica formada por proteínas Cap naturales que corresponden a un AAV de ese mismo serotipo en particular. No obstante, se han desarrollado varias técnicas para modificar y mejorar las propiedades estructurales y funcionales de las partículas víricas de AAV naturales (Bunning H. *et al. J Gene Med* 2008; 10: 717-733). Por tanto, en otra partícula vírica de AAV de acuerdo con la divulgación, se puede empaquetar la construcción de nucleótidos del vector vírico flanqueado por ITR/s de un serotipo de AAV dado, por ejemplo, en: a) una partícula vírica constituida por proteínas de la cápside derivadas de un mismo o diferente serotipo de AAV [por ejemplo, ITR de AAV2 y proteínas de la cápside de AAV5; ITR de AAV2 y proteínas de la cápside de AAV8; etc.]; b) una partícula vírica de mosaico constituida por una mezcla de proteínas de la cápside de diferentes serotipos o mutantes de AAV [por ejemplo, ITR de AAV2 con proteínas de la cápside de AAV1 y AAV5]; c) una partícula vírica quimérica constituida por proteínas de la cápside que se han truncado mediante el intercambio de dominios entre diferentes serotipos o variantes de AAV [por ejemplo, ITR de AAV2 con proteínas de la cápside de AAV5 con dominios de AAV3]; o d) una partícula vírica dirigida diseñada para mostrar dominios de unión selectiva, permitiendo una interacción restrictiva con receptores específicos de células diana [por ejemplo, ITR de AAV4 con proteínas de la cápside de AAV2 truncadas genéticamente mediante la inserción de un ligando peptídico; o proteínas de la cápside de AAV2 no modificadas genéticamente mediante el acoplamiento de un ligando peptídico a la superficie de la cápside].

El experto apreciará que el virión de AAV de acuerdo con la divulgación puede comprender proteínas de la cápside de cualquier serotipo de AAV. En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la partícula vírica comprende proteínas de la cápside de un AAV. En un aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la partícula vírica de AAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo seleccionado del grupo que consiste en un AAV1, un AAV5, un AAV7, un AAV8 y un AAV9, que son más adecuados para la administración a las células hepáticas (Nathwani *et al. Blood* 2007; 109: 1414-1421; Kitajima *et al. Atherosclerosis* 2006; 186:65-73). En un aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la partícula vírica comprende una construcción de ácido nucleico de la divulgación en donde las secuencias de ITR 5' y ITR 3' de la construcción de ácido nucleico son de un serotipo de AAV2 y las proteínas de la cápside son de un serotipo de AAV8. En un aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la partícula vírica de AAV comprende al menos una proteína de la cápside de Anc80, un ancestro predicho de los serotipos víricos de AAV 1, 2, 8 y 9, que se comporta como un vector de terapia génica altamente potente para atacar el hígado, el músculo y la retina (Zinn *et al. Cell Reports* 2015; 12:1-13). En un aspecto más particular, la partícula vírica comprende la proteína de la cápside VP3 Anc80L65 (número de registro del Genbank: KT235804).

Las interacciones entre el virus y el glicano son determinantes críticos de la invasión de la célula hospedadora. En un aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la partícula vírica de AAV comprende proteínas de la cápside que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos, en donde las sustituciones introducen un nuevo sitio de unión a glicano o un nuevo sitio de unión a sulfato de heparán (HS) en la proteína de la cápside de AAV. En un aspecto más particular, las sustituciones de aminoácidos están en el aminoácido 266, aminoácidos 463-475 y aminoácidos 499-502 de AAV2 o las posiciones de aminoácidos correspondientes de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 o cualquier otro serotipo de AAV, Anc80 y Anc80L65 también incluidos.

El nuevo sitio de unión a glicano introducido puede ser un sitio de unión de hexosa [por ejemplo, un sitio de unión de galactosa (Gal), manosa (Man), glucosa (Glu) o fucosa (fuc)]; un sitio de unión de ácido siálico (Sia) [por ejemplo, un resto Sia tal como ácido *N*-acetil-neuramínico (NeuSAc) o ácido *N*-glicolilneuramínico (NeuSGc)]; o un sitio de unión de disacárido, en donde el disacárido es un ácido siálico unido a galactosa, por ejemplo, en forma de Sia(alfa2,3)Gal o Sia(alfa2,6)Gal. En la publicación de patente internacional WO2014144229 y en Shen *et al. (J. Biol Chem.* 2013; 288(40):28814-28823), se proporciona una guía detallada para introducir un nuevo sitio de unión de un serotipo de AAV en una proteína de la cápside de un AAV de otro serotipo. En un aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, el sitio de unión de Gal de AAV9 se introduce en la cadena principal de VP3 de AAV2, produciendo una cepa de AAV de unión a glicano doble que puede usar receptores de HS y Gal para la entrada celular. Preferentemente, dicha cepa de AAV de unión a glicano doble es AAV2G9. Shen *et al.* generaron AAV2G9 mediante la sustitución de restos de aminoácidos directamente implicados en y que flanquean inmediatamente el sitio de reconocimiento de Gal sobre la subunidad de la proteína de la cápside VP3 de AAV9 en los restos correspondientes

de la región de codificación de la subunidad VP3 de AAV2 (numeración Q464V de VP3 de AAV2, A467P, D469N, I470M, R471A, D472V, S474G, Y500F y S501A).

En otro aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, el virión de la divulgación es un virión adenovírico, tal como un virión de Ad5. Como es el caso de los viriones de AAV, las proteínas de la cápside de los viriones Ad también pueden diseñarse para modificar su tropismo y sus propiedades de dirección celular.

Producción de partículas víricas

La producción de partículas víricas portadoras de la construcción de ácido nucleico del vector vírico de expresión de la divulgación puede realizarse mediante métodos y protocolos convencionales, que se seleccionan teniendo en cuenta las características estructurales escogidas para la construcción de ácido nucleico real y la partícula vírica del vector que se vaya a producir. En resumen, se pueden producir partículas víricas en una célula específica productora de virus (célula de empaquetamiento) que se transfecta con la construcción de ácido nucleico del vector que se vaya a empaquetar, en presencia de un vector auxiliar o virus u otra/s construcción/es de ADN.

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación se refiere al uso de la construcción de ácido nucleico o vector de expresión de la divulgación para la producción de partículas víricas.

En un aspecto relacionado, la divulgación se refiere a un proceso de producción de partículas víricas de la divulgación que comprende las etapas de:

- a) cultivar una célula hospedadora que comprenda una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión de la divulgación en un medio de cultivo; y
- b) recoger las partículas víricas del sobrenadante del cultivo celular y/o del interior de las células.

Preferentemente, dicha célula hospedadora es una célula empaquetadora como se describe a continuación. Los medios de cultivo adecuados serán conocidos por un experto en la materia. Los ingredientes que componen dichos medios pueden variar según el tipo de célula que se vaya a cultivar. Además de la composición de nutrientes, la osmolaridad y el pH se consideran parámetros importantes de los medios de cultivo. El medio de crecimiento celular comprende diversos ingredientes bien conocidos por el experto en la materia, incluyendo aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, fuentes de carbohidratos, lípidos, oligoelementos (CuSO₄, FeSO₄, Fe(NO₃)₃, ZnSO₄, etc.), estando cada ingrediente presente en una cantidad que mantiene el cultivo de una célula *in vitro* (es decir, la supervivencia y el crecimiento de las células). Los ingredientes también pueden incluir diferentes sustancias auxiliares, tales como sustancias tampón (como bicarbonato de sodio, Hepes, Tris, etc.), estabilizadores de la oxidación, estabilizadores para contrarrestar el estrés mecánico, inhibidores de proteasas, factores de crecimiento animales, hidrolizados vegetales, agentes anti-vertido, agentes antiespumantes. Las características y composiciones de los medios de crecimiento celular varían dependiendo de las necesidades celulares en particular. Son ejemplos de medios de crecimiento celular disponibles en el mercado: MEM (*Minimum Essential Medium*, Medio Esencial Mínimo), BME (*Basal Medium Eagle*, medio de Eagle basal), DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*, Medio de Eagle modificado por Dulbecco), DMEM de Iscove (modificación de Iscove del medio de Dulbecco), GMEM, RPMI 1640, Leibovitz L-15, CHO, medio de McCoy, Medio 199, HEK293, Ham (medio de Ham), F10 y derivados, Ham F12, DMEM/F12, etc.

UNA CÉLULA HOSPEDADORA DE LA DIVULGACIÓN

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una célula hospedadora que comprende una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión de la divulgación.

La expresión "célula hospedadora", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier estirpe celular que es susceptible a la infección por un virus de interés y que se puede cultivar *in vitro*.

La célula hospedadora de la divulgación puede usarse para fines de terapia génica *ex vivo*. En dichos aspectos, las células se transfectan con la construcción de ácido nucleico o el vector vírico de la divulgación y, posteriormente, se trasplantan al paciente o sujeto. Las células trasplantadas pueden tener un origen autólogo, alogénico o heterólogo. Para uso clínico, el aislamiento celular generalmente se llevará a cabo según las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF). Antes del trasplante, normalmente se verifica la calidad celular y la ausencia de contaminantes microbianos u otros contaminantes, y se puede llevar a cabo el acondicionamiento previo del hígado, tal como con radiación y/o un tratamiento inmunosupresor. Además, las células hospedadoras pueden ser trasplantadas junto con factores de crecimiento para estimular la proliferación y/o diferenciación celular, tal como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*).

En un aspecto particular, la célula hospedadora se usa para terapia génica *ex vivo* en el hígado. Preferentemente, dichas células son células eucariotas tales como células de mamíferos, y éstos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, primates no humanos tales como simios; chimpancés; monos y orangutanes, animales domésticos,

incluyendo perros y gatos, así como ganado, tal como caballos, ganado bovino, cerdos, ovejas y cabras, u otras especies de mamíferos que incluyen, sin limitación, ratones, ratas, cobayas, conejos, hámsters y similares. Un experto en la materia escogerá las células más apropiadas según el paciente o sujeto en el que se vaya a realizar el trasplante.

Dicha célula hospedadora puede ser una célula con propiedades de autorrenovación y pluripotencia, tales como células madre o células madre pluripotentes inducidas, en donde las células no son células embrionarias humanas. Las células madre son preferentemente células madre mesenquimales. Las células madre mesenquimales (MSC, *Mesenchymal Stem Cell*) son capaces de diferenciarse en al menos uno de entre un osteoblasto, un condrocito, un adipocito o un miocito, y pueden aislarse de cualquier tipo de tejido. En general, las MSC se aislarán de la médula ósea, del tejido adiposo, del cordón umbilical o de la sangre periférica. Los métodos de obtención de las mismas son bien conocidos por un experto en la materia. Las células madre pluripotentes inducidas (también conocidas como células iPS o iPSC, *induced Pluripotent Stem Cell*) son un tipo de célula madre pluripotente que puede generarse directamente a partir de células adultas. Yamanaka *et al.* indujeron células iPS mediante la transferencia de los genes Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc a fibroblastos humanos y de ratón, y obligando a las células a expresar los genes (documento WO 2007/069666). Thomson *et al.* produjeron posteriormente células iPS humanas usando Nanog y Lin28 en lugar de Klf4 y c-Myc (documento WO 2008/118820).

Dichas células hospedadoras también pueden ser hepatocitos. Por ejemplo, en Filippi y Dhawan, *Ann NY Acad Sci.* 2014, 1315 50-55; Yoshida *et al.*, *Gastroenterology* 1996, 111: 1654-1660; Irani *et al. Molecular Therapy* 2001,3:3, 302-309; y Vogel *et al. J Inherit Metab Dis* 2014, 37:165-176, se describen procedimientos de trasplante de hepatocitos, incluyendo el aislamiento celular y el posterior trasplante, en un receptor humano o murino. Por ejemplo, en Merle *et al.*, *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2006, 41:8, 974-982, se describe un método de transducción *ex vivo* de un vector vírico en hepatocitos.

En otro aspecto particular, la célula hospedadora es una célula de empaquetamiento. Dichas células pueden ser células adherentes o en suspensión. La célula de empaquetamiento y la/s construcción/es de vector auxiliar, de virus o de ADN proporcionan juntas en *trans* todas las funciones que faltan que son necesarias para la replicación completa y el empaquetamiento del vector vírico.

Preferentemente, dichas células de empaquetamiento son células eucariotas tales como células de mamífero, incluyendo células de simio, humanas, de perro y de roedor. Son ejemplos de células humanas las células PER.C6 (documento WO01/38362), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células HEK-293 (ATCC CRL-1573), células HeLa (ATCC CCL2) y células pulmonares fetales de macaco (ATCC CL-160). Son ejemplos de células de primate no humano las células Vero (ATCC CCL81), células COS-1 (ATCC CRL-1650) o células COS-7 (ATCC CRL-1651). Son ejemplos de células de perro las células MDCK (ATCC CCL-34). Son ejemplos de células de roedor las células de hámster, tales como BHK21-F, células HKCC o células CHO.

Como alternativa a las fuentes de mamífero, las estirpes celulares para su uso en la divulgación pueden derivarse de fuentes aviares tales como el pollo, pato, ganso, codorniz o faisán. Los ejemplos de estirpes celulares aviares incluyen células madre embrionarias aviares (documentos WO01/85938 y WO03/076601), células de retina de pato inmortalizadas (documento WO2005/042728) y células derivadas de células madre embrionarias aviares, incluyendo células de pollo (documento WO2006/108846) o células de pato, tales como la estirpe celular EB66 (documentos WO2008/129058 y WO2008/142124).

En otro aspecto, dicha célula hospedadora son células de insecto, tales como las células SF9 (ATCC CRL-1711), células Sf21 (IBL-Sf21), células MG1 (BTI-TN-MG1) o células High Five™ (BTI-TN-5B1-4).

Por consiguiente, en un aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la célula hospedadora comprende:

- a) una construcción de ácido nucleico o vector de expresión de la divulgación (es decir, el genoma de AAV recombinante), en general, como un plásmido;
- b) una construcción de ácido nucleico, en general, un plásmido, codificante de los genes rep y/o cap de AAV, no portador de las secuencias de ITR; y/o
- c) un ácido nucleico, en general, un plásmido o un virus, una construcción que comprende genes auxiliares víricos.

Los genes víricos necesarios para la replicación de AAV se denominan en el presente documento genes auxiliares víricos. Por lo general, dichos genes necesarios para la replicación de AAV son genes auxiliares adenovíricos, tales como ARN de E1A, E1B, E2a, E4 o VA. Preferentemente, los genes auxiliares adenovíricos son del serotipo Ad5 o Ad2.

Se pueden usar métodos convencionales para producir partículas víricas del vector de AAV, que consisten en la transfección conjunta de células transitorias con una construcción de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) portador del vector/genoma de AAV recombinante de la divulgación; una construcción de ácido nucleico (por

ejemplo, un plásmido auxiliar de AAV) codificante de genes rep y cap, pero no portadora de secuencias de ITR; y con una tercera construcción de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) que proporciona las funciones adenovíricas necesarias para la replicación de AAV. Por tanto, en un aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más de las características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, dicha célula hospedadora se caracteriza por comprender:

- i) una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión de la divulgación (es decir, el genoma de AAV recombinante);
- ii) una construcción de ácido nucleico codificante de los genes rep y cap de AAV, no portadora de las secuencias de ITR; e
- iii) una construcción de ácido nucleico que comprende genes auxiliares adenovíricos.

Como alternativa, los genes rep, cap y auxiliares adenovíricos se pueden combinar en un solo plásmido (Blouin V. *et al. J Gene Med.* 2004; 6 (supl): S223-S228; Grimm D. *et al. Hum. Gene Ther.* 2003; 7: 839-850). Por tanto, en otro aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más de las características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, dicha célula hospedadora se caracteriza por comprender:

- i) una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión de la divulgación (es decir, el genoma de AAV recombinante); e
- ii) un plásmido codificante de los genes rep y cap de AAV no portador de las secuencias de ITR y que además comprende genes auxiliares adenovíricos.

En un aspecto particular adicional, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la célula hospedadora comprende:

- a) una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión de la divulgación (es decir, el genoma de AAV recombinante);
- b) un plásmido codificante de los genes rep y cap de AAV no portador de las secuencias de ITR; y
- c) un plásmido que comprende genes auxiliares adenovíricos E2a, E4 y ARN de VA;

en donde la transfección conjunta se realiza en células, preferentemente, células de mamífero, que expresan constitutivamente y transcomplementan el gen adenovírico E1, como las células HEK-293 (ATCC CRL-1573).

La producción a gran escala de vectores de AAV de acuerdo con la divulgación también se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la infección de células de insecto con una combinación de baculovirus recombinantes (Urabe *et al. Hum. Gene Ther.* 2002; 13: 1935-1943). Las células SF9 se infectan conjuntamente con tres vectores de baculovirus que expresan respectivamente rep de AAV, cap de AAV y el vector de AAV que se va a empaquetar. Los vectores de baculovirus recombinantes proporcionarán las funciones del gen auxiliar vírico necesarias para la replicación y/o el empaquetamiento del virus.

Mediante el uso de plásmidos auxiliares que codifican el ORF de rep (*Open Reading Frame*, marco de lectura abierto) de un serotipo de AAV y el ORF de cap de un serotipo de AAV diferente, es factible empaquetar un vector flanqueado por ITR de un serotipo de AAV dado en viriones ensamblados a partir de proteínas estructurales de la cápside de un serotipo diferente. También es posible, mediante este mismo procedimiento, empaquetar vectores de mosaico, quiméricos o dirigidos.

Por otro lado, la producción de vectores de HC-Ad de acuerdo con la divulgación puede llevarse a cabo por medio de células de mamífero que expresan constitutivamente y transcomplementan el gen adenovírico E1, y también la Cre recombinasa (por ejemplo, células 293Cre). Estas células se transfectan con el genoma del vector de HC-Ad y se infectan con un virus auxiliar adenovírico de primera generación (con E1 eliminado) en el que la señal de empaquetamiento está flanqueada por secuencias de loxP. [Parks R. J. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1996; 13565-13570; para células 293Cre, véase Palmer y Engel. *Mol. Ther.* 2003; 8:846-852]. Se han descrito varios sistemas de virus auxiliares basados en Cre/loxP que se pueden usar para empaquetar vectores de HC-Ad, tales como AdAdLC8cluc o el virus auxiliar AdTetCre auto-inactivador optimizado (documento EP2295591; Gonzalez-Aparicio *et al. Gene Therapy* 2011; 18: 1025-1033).

Se puede encontrar orientación adicional para la construcción y producción de vectores víricos para terapia génica de acuerdo con la divulgación en:

"Viral Vectors for Gene Therapy, Methods and Protocols". *Series: Methods in Molecular Biology*, Vol. 737. Merten y Al-Rubeai (Eds.); 2011 Humana Press (Springer).

Gene Therapy. M. Giacca. 2010 Springer-Verlag.

Heilbronn R. y Weger S. "Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene Therapeutics". En: "Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology", 197; M. Schäfer-Korting (Ed.). 2010 Springer-Verlag; pág. 143-170.

"Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols". R. O. Snyder y P. Moullier (Eds). 2011 Humana Press (Springer).

Bunning H. *et al.* "Recent developments in adeno-associated virus technology". *J. Gene Med.* 2008; 10:717-733.

- 5 "Adenovirus: Methods and Protocols". M. Chillon y A. Bosch (Eds.); Tercera edición. 2014 Humana Press (Springer).

USOS TERAPÉUTICOS

10 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere al producto de la divulgación como se define en el Resumen para su uso como un medicamento.

15 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere al producto de la divulgación como se define en el Resumen para su uso en el tratamiento de una afección causada por una deficiencia o una disfunción de la ATPasa 2 transportadora del cobre, y de cualquier otra afección y enfermedad en la que una regulación positiva de la expresión y de la actividad de la ATPasa 2 transportadora del cobre pueda producir un beneficio terapéutico o una mejora terapéutica, en particular, una enfermedad o afección asociadas con una disminución de la exocitosis lisosómica dependiente de ATP7B y la acumulación del cobre en los lisosomas, tales como trastornos coleostáticos, enfermedad de Alzheimer y/o cáncer (Polishchuck *et al.* *Dev Cell.* 2014, 29(6), 686-700; Gupta y Lutsenko, *Future Med. Chem.* 2009, 1, 1125-1142).

20 El sujeto que se va a tratar puede ser un mamífero, y en particular, un paciente humano.

25 En un aspecto particular, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la afección causada por una deficiencia o disfunción de la ATPasa transportadora del cobre es la enfermedad de Wilson (EW, número de registro del catálogo en línea "Mendelian Inheritance in Man catalog" OMIN 277900; <http://www.omim.org/entry/277900>).

30 En un aspecto relacionado, la divulgación se refiere al uso del producto de la divulgación, como se define en el Resumen, en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una afección causada por una deficiencia o disfunción de la ATPasa 2 transportadora del cobre, y de cualquier otra afección y enfermedad en la que una regulación positiva de la expresión y actividad de la ATPasa 2 transportadora del cobre pueda producir un beneficio terapéutico o mejora, preferentemente, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Wilson.

35 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere al tratamiento de una afección causada por una deficiencia o disfunción de la ATPasa 2 transportadora del cobre, y de cualquier otra afección y enfermedad en la que una regulación positiva de la expresión y actividad de la ATPasa 2 transportadora del cobre pueda producir un beneficio terapéutico o una mejora terapéutica, preferentemente, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Wilson, en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de ácido nucleico, un vector de expresión, una célula hospedadora, una partícula vírica o una composición farmacéutica de la divulgación. El tratamiento con un producto de la divulgación puede aliviar, mejorar o reducir la gravedad de uno o más síntomas de la EW. Por ejemplo, el tratamiento puede aumentar y/o restablecer la síntesis de holoceruplasmina, la actividad de ceruloplasmina oxidasa y/o la excreción del cobre en la bilis (reduciendo así la acumulación del cobre en suero, hígado, cerebro y orina); y, por consiguiente, puede aliviar, mejorar o reducir la gravedad del dolor abdominal, fatiga, ictericia, frecuencia de movimientos incontrolados, rigidez muscular, problemas con el habla, deglución o coordinación física.

50 El producto de la divulgación normalmente se incluirá en una composición farmacéutica o un medicamento, opcionalmente, en combinación con un vehículo, diluyente y/o adyuvante farmacéutico. Dicha composición o dicho producto medicinal comprende el producto de la divulgación en una cantidad eficaz, suficiente para proporcionar un efecto terapéutico deseado, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende una construcción de ácido nucleico, un vector de expresión, una célula hospedadora o una partícula vírica de la divulgación, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 Se puede usar cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado en la preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación (véase, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, abril de 1997). Las composiciones farmacéuticas normalmente son estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de soluciones (por ejemplo, solución salina, solución de dextrosa o solución tamponada, u otros fluidos estériles farmacéuticamente aceptables), microemulsiones, liposomas u otra estructura ordenada adecuada para aceptar una alta concentración de producto (por ejemplo, micropartículas o nanopartículas). El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una

dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. El producto de la divulgación puede administrarse en una formulación de liberación controlada, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta u otros vehículos que protejan al producto contra la liberación rápida, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar, por ejemplo, polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros polilácticos/poliglicólicos (PLG). Preferentemente, dicha composición farmacéutica se formula como una solución, más preferentemente, como una solución salina opcionalmente tamponada.

Los compuestos activos complementarios también se pueden incorporar a las composiciones farmacéuticas de la divulgación. En el Compendio de Productos Farmacéuticos y Especialidades (CPS) de la Asociación Canadiense de Farmacéuticos, por ejemplo, se puede encontrar orientación sobre la administración conjunta de terapias adicionales.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la composición farmacéutica de la divulgación es una composición farmacéutica parenteral, incluyendo una composición adecuada para la administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Estas composiciones farmacéuticas son solo ilustrativas, y no limitan las composiciones farmacéuticas adecuadas para otras vías de administración parenteral y no parenteral.

En el contexto de la divulgación, una "cantidad eficaz" significa una cantidad terapéuticamente eficaz.

Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado, dicha elevación de la actividad de translocación del cobre, aumentando, por tanto, el cobre en la bilis, y reduciendo el cobre en el suero, el hígado, el cerebro y la orina. La cantidad terapéuticamente eficaz del producto de la divulgación, o la composición farmacéutica que lo comprende, puede variar según factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del producto o de la composición farmacéutica para generar una respuesta deseada en el individuo. Las pautas posológicas se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es normalmente aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del producto o de la composición farmacéutica se vea compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la composición farmacéutica que lleva el producto de la divulgación se administra al sujeto o paciente por vía parenteral.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular.

En un aspecto, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, la composición farmacéutica que comprende un producto de la divulgación se administra por vía intersticial, es decir, por inyección a o en los intersticios de un tejido. La diana tisular puede ser específica, por ejemplo, tejido del hígado, o puede ser una combinación de varios tejidos, por ejemplo, los tejidos musculares y hepáticos. Las dianas tisulares ilustrativas pueden incluir hígado, músculo esquelético, músculo del corazón, depósitos adiposos, riñón, pulmón, endotelio vascular, células epiteliales y/o hematopoyéticas. En un aspecto preferido, opcionalmente, en combinación con una o más características de los diferentes aspectos descritos anteriormente o que se describen a continuación, se administra por inyección intrahepática, es decir, inyección en el espacio intersticial del tejido hepático.

La cantidad de producto de la divulgación que se administra al sujeto o paciente puede variar dependiendo de las circunstancias particulares de cada sujeto/paciente, incluyendo, la edad, el sexo y el peso del individuo; la naturaleza y el estadio de la enfermedad, la agresividad de la enfermedad; la vía de administración; y/o la medicación concomitante que se haya recetado al sujeto o paciente. Las pautas posológicas se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

Para cualquier sujeto en particular, las pautas posológicas específicas pueden ajustarse con el tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Los intervalos de dosificación establecidos en el presente documento son solo ilustrativos, y no limitan los intervalos de dosificación que pueden seleccionar los médicos.

En un aspecto, se puede administrar un vector de AAV de acuerdo con la divulgación al paciente para el tratamiento de la enfermedad de Wilson en una cantidad o dosis comprendida dentro de un intervalo de 5×10^{11} a 1×10^{14} gv/kg (gv: genomas víricos; kg: peso corporal del sujeto o del paciente). En un aspecto más particular, el vector de AAV se

administra en una cantidad comprendida dentro de un intervalo de 1×10^{12} a 1×10^{13} gv/kg.

En otro aspecto, se puede administrar un vector de HC-Ad de acuerdo con la divulgación al paciente para el tratamiento de la enfermedad de Wilson en una cantidad o dosis comprendida dentro de un intervalo de 1×10^9 a 1×10^{11} UI/kg (UI: unidades infecciosas del vector).

En otro aspecto, la divulgación se refiere además a un kit que comprende una construcción de ácido nucleico, un vector, una célula hospedadora, una partícula vírica o una composición farmacéutica de la divulgación en uno o más recipientes. Un kit de la divulgación puede incluir instrucciones o materiales de empaquetamiento que describen cómo administrar una construcción de ácido nucleico, un vector, una célula hospedadora o una partícula vírica de la divulgación contenida dentro del kit a un paciente. Los recipientes del kit pueden ser de cualquier material adecuado, por ejemplo, vidrio, plástico, metal, etc., y de cualquier tamaño, forma o configuración adecuados. En determinados aspectos, los kits pueden incluir una o más ampollas o jeringas que contengan una construcción de ácido nucleico, un vector, una célula hospedadora, una partícula vírica o una composición farmacéutica de la divulgación en una forma líquida o en solución adecuada.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, el término "comprende" y sus variaciones, no tienen por objeto excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra "comprende" engloba el caso de "que consiste en". Otros objetos, ventajas y características adicionales de la divulgación serán evidentes para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse mediante la puesta en práctica de la divulgación. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo, y no tienen por objeto ser limitantes de la presente divulgación. Además, la presente divulgación cubre todas las combinaciones posibles de aspectos particulares y preferidos descritos en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de vectores de expresión recombinantes

Se diseñaron y produjeron dos vectores de AAV diferentes que portaban y expresaban ATP7B humano para la terapia génica de la enfermedad de Wilson (EW): AAV2/8-AAT-wtATP7B y AAV2/8-AAT-coATP7B.

1.1 Vector AAV2/8-AAT-wtATP7B

En primer lugar, se ensambló el plásmido pUC-ATP7B a petición (GenScript) mediante la clonación de la construcción de ácido nucleico en un plásmido pUC57. La construcción de ácido nucleico contenía una secuencia de ADNc codificante de ATP7B humano (transgén) junto con una secuencia de señal de poliadenilación sintética (Levitt N. *et al. Genes & Development* 1989; 3 (7): 1019-1025) en dirección 3' del transgén.

A continuación, se introdujo el promotor mínimo del gen alfa1 anti-tripsina (AAT) en el plásmido pUC-ATP7B, en dirección 5' del gen ATP7B. El promotor mínimo consiste en la secuencia del nucleótido -261 al nucleótido +44 en relación con el sitio de cap del promotor de AAT (Kramer M. G. *et al. Mol. Therapy* 2003; 7(3): 375-385) y contiene el elemento específico del tejido (EET), necesario para la función hepática, y la región distal (RD) necesaria para toda la actividad del promotor. El promotor de AAT se obtuvo mediante amplificación por PCR usando como plantilla el plásmido pEnhAlbAAT-luciferasa (proporcionado por M. G. Kramer) y los siguientes cebadores:

Cebador de AAT directo

5' CTGGTCTAGAACGCGTCGCCACCCCCTCCACCTTGG 3' (SEQ. ID. NO. 5); y

Cebador de AAT inverso

5' ATCATGATGCGGCCGCTTCACTGTCCCAGGTCAAGT 3' (SEQ. ID. NO. 6).

El cebador de AAT directo tiene un sitio de restricción para XbaI y MluI, y el cebador de AAT inverso tiene un sitio de restricción para NotI.

Por lo tanto, para obtenerse el plásmido pUC-AAT-ATP7B, se digirió el plásmido pUC-ATP7B con XbaI y NotI, y se ligó al promotor de AAT previamente digerido con las mismas enzimas.

Seguidamente, se subclonó el casete de expresión en el plásmido de transferencia de AAV pAAV-MCS (Agilent technologies) mediante digestión con las enzimas de restricción PmlI y MluI, produciendo así el plásmido pAAV2-AAT-wtATP7B (Figura 1; SEQ. ID. NO. 1).

Una vez construido el plásmido, se creó el vector de AAV mediante doble transfección en 293 células de, el plásmido pAAV2-AAT-ATP7B y el plásmido pDP8 (obtenido de PlasmidFactory, Bielefeld, Alemania; el plásmido pDP8 expresa la proteína de la cápside de AAV8, la proteína rep de AAV2 y las moléculas adenovíricas necesarias para la producción y el empaquetamiento de AAV).

El vector finalmente se purificó mediante gradiente de yodixanol y se tituló mediante PCR cuantitativa.

1.2 Vector AAV2/8-AAT-coATP7B

Para obtener el vector de AAV que expresa una versión con optimización de codones del gen ATP7B (coATP7B), primero, se ensambló el plásmido pUC-coATP7B a petición (GenScript) mediante la clonación de la construcción de ácido nucleico en un plásmido pUC57. A continuación, se escindió el coATP7B del pUC-coATP7B mediante la digestión con las enzimas de restricción NotI y KpnI y se subclonó en el plásmido pAAV2-AAT-wtATP7B previamente digerido con las mismas enzimas, NotI y KpnI, obteniéndose el plásmido pAAV2-AAT-coATP7B (SEQ. ID. NO. 2).

Una vez construido el plásmido, se realizaron su producción y el empaquetamiento de partículas víricas como se ha descrito anteriormente para el vector AAV2/8-AAT-wtATP7B: transfección doble del plásmido pAAV2-AAT-coATP7B obtenido previamente con el plásmido pDP8, purificación (gradiente de yodixanol) y titulación.

Ejemplo 2. Modelo de la enfermedad de Wilson en animales: Desactivación de ATP7B

Se probó el rendimiento terapéutico del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B en ratones con desactivación de ATP7B (ratones ATP7B KO, ATP7B^{-/-} o EW), que son un modelo animal representativo de la EW. Este modelo animal fue desarrollado por Buiakova *et al.*, mediante la introducción de un codón de terminación temprana en el ARNm de ATP7B de ratón diseñando la sustitución de una parte del exón 2 de ATP7B con un casete de neomicina orientado en el marco de transcripción opuesto (Buiakova O. I. *et al.* "Human Molecular Genetics" 1999; 8(9): 1665-1671). Los ratones con desactivación de ATP7B no muestran expresión de ATP7B en el hígado y una alta excreción de Cu en la orina, bajos niveles de holoceruloplasmina en suero, altos niveles de transaminasas, alta concentración de Cu en el hígado y una histología hepática patológica. Estos ratones presentan las características bioquímicas típicas de la enfermedad de Wilson humana, excepto por la afectación neurológica (Lutsenko S. "Biochemical Society Transactions" 2008; 36(Pt 6): 1233-1238).

Ejemplo 3. Efecto terapéutico del vector vírico AAV2/8-AAT-wtATP7B en ratones con enfermedad de Wilson

Se dividieron ratones macho ATP7B^{-/-} de seis semanas (6 s) en 3 grupos de 5 ratones cada uno: 2 de los grupos fueron tratados por vía intravenosa con el vector AAV2/8-AAT-wtATP7B a dos dosis diferentes, 1×10^{10} gv/ratón (gv: genomas víricos) y 3×10^{10} gv/ratón diluidos respectivamente en solución salina; el tercer grupo se dejó sin tratamiento. Un grupo adicional de ratones de tipo silvestre se mantuvo sin tratamiento como grupo de control. Los animales fueron sacrificados veinticuatro semanas después de la administración del vector (semana 30).

Cuatro semanas después de la administración del vector (semana 10) y cada cinco semanas hasta la semana 30 (semana 15, semana 20, semana 25 y semana 30), niveles de transaminasas en suero (ALT), Se determinaron la actividad de ceruloplasmina en suero y el contenido de Cu en orina en todos los grupos.

Se determinaron los niveles de transaminasas en suero (ALT) mediante el método DGKC (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) usando un analizador clínico Hitachi 747 (Hitachi, Tokio, Japón).

Se determinó la actividad de ceruloplasmina en suero con diclorhidrato de O-dianisidina (4,4'-diamino-3,3'-dimetoxi-bifenilo) como sustrato (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, Estados Unidos) según lo descrito por Schosinsky *et al.* (*Clinical Chemistry* 1974; 20(12): 1556-1563). Se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

Se determinó el contenido del cobre en orina mediante espectroscopía de absorción atómica (SIMAA 6000, de Perkin-Elmer GmbH, Bodenseewerk).

Después del sacrificio, se extirpó el hígado para la determinación histológica y el análisis del contenido de Cu, de la inflamación, de la proliferación de los conductos biliares y de la fibrosis.

Se determinó el contenido del cobre hepático en tejido de hígado seco mediante espectroscopía de absorción atómica (SIMAA 6000, de Perkin-Elmer GmbH, Bodenseewerk), y mediante tinción con sulfuro de plata de Timm (Danscher G. y Zimmer J. *Histochemistry* 1978; 55(1): 27-40).

Se evaluó la estructura del hígado en cortes teñidos con hematoxilina y eosina.

Se realizó la inmunohistoquímica con anticuerpo anti-CD45 de ratón (BioLegend, San Diego, EE.UU.; Número de catálogo 103102) para detectar la infiltración inflamatoria en el hígado.

También se realizó la inmunohistoquímica con anticuerpo anti-PanCk de ratón (Invitrogen/Life Technologies, 18-0132, clon AE1/AE3) para detectar las células de los conductos biliares.

Para determinar la fibrosis, se usó la tinción con Rojo Sirio convencional como método para la determinación del colágeno.

Para analizar cuantitativamente la inflamación del hígado, la proliferación de los conductos biliares y la fibrosis, se obtuvieron imágenes digitales con un microscopio Axiomager.MI (Zeiss, Alemania) usando una macro Metamorph interna (Molecular Devices, EE. UU.). Este equipo permitió capturar imágenes ubicadas al azar a 20 aumentos (objetivo Plan-Neofluar con 0,50 NA), con enfoque automático, balance de blancos y corrección de sombras, en cada imagen obtenida. Todas las imágenes se almacenaron en formato TIFF a color de 24 bits sin comprimir. Las imágenes se analizaron automáticamente usando un complemento desarrollado para Fiji, ImageJ.41.

Como se muestra en la Figura 2, los niveles de transaminasas se normalizaron en los ratones que recibieron AAV2/8-AAT-wtATP7B, independientemente de la dosis. Tan pronto como 4 semanas después del tratamiento, los niveles de transaminasas en suero disminuyeron significativamente (Figura 2). Además, la concentración de Cu en orina fue significativamente inferior en los animales que recibieron el vector de terapia génica (Figura 3). La actividad de ceruloplasmina se restableció cuatro semanas después del tratamiento en los animales que recibieron la dosis más alta del vector (3×10^{10} gv/ratón), pero no en los animales que recibieron la dosis más baja (Figura 4).

Por otro lado, la administración del vector redujo significativamente el contenido de Cu en el hígado (Figura 5A); el resultado se confirmó en las imágenes obtenidas tras la tinción de Timm (Figura 6A). Cabe señalar que el contenido de cobre hepático se normalizó por completo en todos los animales que recibieron la dosis más alta del vector AAV2/8-AAT-wtATP7B (Figura 5B). En cuanto a la histología hepática, los animales no tratados mostraron una arquitectura hepática anormal con enormes hepatocitos que contenían enormes núcleos. La administración del vector produjo la normalización de la histología hepática (Figura 6B). Además, los animales con enfermedad de Wilson presentaron un fuerte infiltrado hepático compuesto principalmente por células positivas en CD45; la infiltración desapareció tras el tratamiento con el vector vírico recombinante (Figura 7A). La proliferación de los conductos biliares (Figura 7B) y la fibrosis hepática (Figura 7C) también se redujeron significativamente. El análisis de datos cuantitativo indicó que la dosis alta y baja del virus terapéutico redujo significativamente la proliferación y la fibrosis de los conductos biliares, sin embargo, solo la alta dosis del virus normalizó la inflamación del hígado (Figura 8).

Ejemplo 4. Efecto del tratamiento con el vector vírico AAV2/8-AAT-wtATP7B sobre el metabolismo del cobre en ratones con la enfermedad de Wilson

Para investigar si el vector de la divulgación era capaz de restablecer la excreción fisiológica del cobre biliar, se trataron ratones con EW de 6 semanas de vida ($n = 5$ por grupo) con AAV2/8-AAT-wtATP7B (3×10^{10} gv/ratón por vía intravenosa) o se dejaron sin tratamiento, y se usó un grupo de camadas heterocigóticas como control. Dos semanas después del tratamiento, la mitad de los animales recibió una sobrecarga de cobre mediante la administración por vía intraperitoneal de $100 \mu\text{g}$ de CuSO_4 , (+ CuSO_4); y la otra mitad, solución salina como control (- CuSO_4); y se colocaron en una jaula metabólica para la recogida de orina y heces durante 24 horas.

Después, se determinó el contenido de cobre en orina y heces mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama (Perkin Elmer AAnalyst 800, Norwalk, CT, EE.UU.).

Los presentes inventores descubrieron que los animales de control WT y los ratones con EW tratados con AAV2/8-AAT-wtATP7B fueron capaces de excretar de manera similar el exceso del cobre en las heces (Figura 9A). Por el contrario, la sobrecarga de cobre no cambió la excreción fecal del cobre en ratones con EW no tratados, y como resultado de ello, el cobre urinario fue significativamente mayor en este grupo en comparación con los ratones con EW tratados con AAV2/8-AAT-wtATP7B (Figura 9B).

Estos datos demuestran claramente que AAV2/8-AAT-wtATP7B restablece el metabolismo normal del cobre en ratones con EW.

Ejemplo 5. Efecto terapéutico del vector vírico AAV2/8-AAT-coATP7B en ratones con enfermedad de Wilson

Se dividieron ratones macho ATP7B^{-/-} de seis semanas (6 s) en 3 grupos de ratones: el primer grupo se trató por vía intravenosa con el vector AAV2/8-AAT-wtATP7B a una dosis subóptima de 1×10^{10} gv/ratón diluido en solución salina; el segundo grupo se trató de la misma manera con AAV2/8-AAT-coATP7B; y el tercer grupo se dejó sin tratamiento. Un grupo adicional de ratones de tipo silvestre se mantuvo sin tratamiento como grupo de control. Los animales fueron sacrificados veinticuatro semanas después de la administración del vector (semana 30).

Cuatro semanas después de la administración del vector y cada cinco semanas hasta la semana 30, se determinaron los niveles de transaminasas en suero (ALT), la actividad de ceruloplasmina en suero y el contenido de Cu en orina en todos los grupos. Tras el sacrificio de los animales, se extirpó el hígado para la determinación histológica y el análisis del contenido de Cu.

Como se muestra en la Figura 10, tanto AAV2/8-AAT-wtATP7B como AAV2/8-AAT-coATP7B administrados a una dosis subóptima redujeron la acumulación del cobre en el hígado de ratones con EW.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN MÉDICA APLICADA

5 <120> CONSTRUCCIONES DE ÁCIDO NUCLEICO Y VECTORES DE TERAPIA GÉNICA PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE WILSON Y OTRAS AFECCIONES

<130> 2014026EP00

10 <160> 6

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

15 <211> 5107

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción de ácido nucleico del vector de expresión AAV2-AAT-wtATP7B

<220>

<221> región de repetición

<222> 1..141

25 <223>/nota = "ITR 5' del serotipo 2 del virus adenoasociado"

<220>

<221> promotor

<222> 156..460

30 <223>/nota = "alfa 1 antitripsina"

<220>

<221> CDS

<222> 473..4870

35 <223>/nota = "Secuencia codificante de ATP7B (ATPasa 2 transportadora del cobre)"/tabla_trad = 1

<220>

<221> señal de poli(A)

<222> 4877..4932

40 <220>

<221> región de repetición

<222> 4968..5107

<223>/nombre_convencional= "ITR 3' del serotipo 2 del virus adenoasociado"

45 <400> 1

```
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc      60
gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca      120
actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgctcgcca cccctccac cttggacaca      180
ggacgctgtg gtttctgagc caggtacaat gactcctttc ggtaagtgca gtggaagctg      240
tacactgccc aggcaaagcg tccgggcgagc gtaggcgggc gactcagatc ccagccagtg      300
gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca      360
gcctcccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc      420
tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagtga gcggccgcca cc atg cct      478
                                     Met Pro
```

1

gag	cag	gag	aga	cag	atc	aca	gcc	aga	gaa	ggg	gcc	agt	cgg	aaa	atc	526
Glu	Gln	Glu	Arg	Gln	Ile	Thr	Ala	Arg	Glu	Gly	Ala	Ser	Arg	Lys	Ile	
		5					10					15				
tta	tct	aag	ctt	tct	ttg	cct	acc	cgt	gcc	tgg	gaa	cca	gca	atg	aag	574
Leu	Ser	Lys	Leu	Ser	Leu	Pro	Thr	Arg	Ala	Trp	Glu	Pro	Ala	Met	Lys	
	20					25					30					
aag	agt	ttt	gct	ttt	gac	aat	gtt	ggc	tat	gaa	ggg	ggg	ctg	gat	ggc	622
Lys	Ser	Phe	Ala	Phe	Asp	Asn	Val	Gly	Tyr	Glu	Gly	Gly	Leu	Asp	Gly	
35					40					45					50	
ctg	ggc	cct	tct	tct	cag	gtg	gcc	acc	agc	aca	gtc	agg	atc	ttg	ggc	670
Leu	Gly	Pro	Ser	Ser	Gln	Val	Ala	Thr	Ser	Thr	Val	Arg	Ile	Leu	Gly	
				55					60					65		
atg	act	tgc	cag	tca	tgt	gtg	aag	tcc	att	gag	gac	agg	att	tcc	aat	718
Met	Thr	Cys	Gln	Ser	Cys	Val	Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Arg	Ile	Ser	Asn	
			70					75					80			
ttg	aaa	ggc	atc	atc	agc	atg	aag	gtt	tcc	ctg	gaa	caa	ggc	agt	gcc	766
Leu	Lys	Gly	Ile	Ile	Ser	Met	Lys	Val	Ser	Leu	Glu	Gln	Gly	Ser	Ala	
		85					90					95				
act	gtg	aaa	tat	gtg	cca	tgc	gtt	gtg	tgc	ctg	caa	cag	gtt	tgc	cat	814
Thr	Val	Lys	Tyr	Val	Pro	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Gln	Gln	Val	Cys	His	
	100					105					110					
caa	att	ggg	gac	atg	ggc	ttc	gag	gcc	agc	att	gca	gaa	gga	aag	gca	862
Gln	Ile	Gly	Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala	Ser	Ile	Ala	Glu	Gly	Lys	Ala	
115					120					125					130	
gcc	tcc	tgg	ccc	tca	agg	tcc	ttg	cct	gcc	cag	gag	gct	gtg	gtc	aag	910
Ala	Ser	Trp	Pro	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Ala	Gln	Glu	Ala	Val	Val	Lys	
				135					140					145		
ctc	cgg	gtg	gag	ggc	atg	acc	tgc	cag	tcc	tgt	gtc	agc	tcc	att	gaa	958
Leu	Arg	Val	Glu	Gly	Met	Thr	Cys	Gln	Ser	Cys	Val	Ser	Ser	Ile	Glu	
			150					155					160			
ggc	aag	gtc	cgg	aaa	ctg	caa	gga	gta	gtg	aga	gtc	aaa	gtc	tca	ctc	1006
Gly	Lys	Val	Arg	Lys	Leu	Gln	Gly	Val	Val	Arg	Val	Lys	Val	Ser	Leu	
		165					170					175				
agc	aac	caa	gag	gcc	gtc	atc	act	tat	cag	cct	tat	ctc	att	cag	ccc	1054
Ser	Asn	Gln	Glu	Ala	Val	Ile	Thr	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Leu	Ile	Gln	Pro	
	180					185					190					
gaa	gac	ctc	agg	gac	cat	gta	aat	gac	atg	gga	ttt	gaa	gct	gcc	atc	1102
Glu	Asp	Leu	Arg	Asp	His	Val	Asn	Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala	Ala	Ile	
195					200					205					210	
aag	agc	aaa	gtg	gct	ccc	tta	agc	ctg	gga	cca	att	gat	att	gag	cgg	1150
Lys	Ser	Lys	Val	Ala	Pro	Leu	Ser	Leu	Gly	Pro	Ile	Asp	Ile	Glu	Arg	
				215				220						225		
tta	caa	agc	act	aac	cca	aag	aga	cct	tta	tct	tct	gct	aac	cag	aat	1198
Leu	Gln	Ser	Thr	Asn	Pro	Lys	Arg	Pro	Leu	Ser	Ser	Ala	Asn	Gln	Asn	
			230					235					240			
ttt	aat	aat	tct	gag	acc	ttg	ggg	cac	caa	gga	agc	cat	gtg	gtc	acc	1246

ES 2 784 264 T3

Phe	Asn	Asn	Ser	Glu	Thr	Leu	Gly	His	Gln	Gly	Ser	His	Val	Val	Thr		
	245						250					255					
ctc	caa	ctg	aga	ata	gat	gga	atg	cat	tgt	aag	tct	tgc	gtc	ttg	aat	1294	
Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Asp	Gly	Met	His	Cys	Lys	Ser	Cys	Val	Leu	Asn		
	260					265					270						
att	gaa	gaa	aat	att	ggc	cag	ctc	cta	ggg	gtt	caa	agt	att	caa	gtg	1342	
Ile	Glu	Glu	Asn	Ile	Gly	Gln	Leu	Leu	Gly	Val	Gln	Ser	Ile	Gln	Val		
	275				280					285					290		
tcc	ttg	gag	aac	aaa	act	gcc	caa	gta	aag	tat	gac	cct	tct	tgt	acc	1390	
Ser	Leu	Glu	Asn	Lys	Thr	Ala	Gln	Val	Lys	Tyr	Asp	Pro	Ser	Cys	Thr		
				295					300					305			
agc	cca	gtg	gct	ctg	cag	agg	gct	atc	gag	gca	ctt	cca	cct	ggg	aat	1438	
Ser	Pro	Val	Ala	Leu	Gln	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Gly	Asn		
			310					315					320				
ttt	aaa	gtt	tct	ctt	cct	gat	gga	gcc	gaa	ggg	agt	ggg	aca	gat	cac	1486	
Phe	Lys	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Gly	Ala	Glu	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	His		
	325						330					335					
agg	tct	tcc	agt	tct	cat	tcc	cct	ggc	tcc	cca	ccg	aga	aac	cag	gtc	1534	
Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Asn	Gln	Val		
	340					345					350						
cag	ggc	aca	tgc	agt	acc	act	ctg	att	gcc	att	gcc	ggc	atg	acc	tgt	1582	
Gln	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Thr	Leu	Ile	Ala	Ile	Ala	Gly	Met	Thr	Cys		
	355				360					365					370		
gca	tcc	tgt	gtc	cat	tcc	att	gaa	ggc	atg	atc	tcc	caa	ctg	gaa	ggg	1630	
Ala	Ser	Cys	Val	His	Ser	Ile	Glu	Gly	Met	Ile	Ser	Gln	Leu	Glu	Gly		
				375					380					385			
gtg	cag	caa	ata	tcg	gtg	tct	ttg	gcc	gaa	ggg	act	gca	aca	gtt	ctt	1678	
Val	Gln	Gln	Ile	Ser	Val	Ser	Leu	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Thr	Val	Leu		
			390					395					400				
tat	aat	ccc	tct	gta	att	agc	cca	gaa	gaa	ctc	aga	gct	gct	ata	gaa	1726	
Tyr	Asn	Pro	Ser	Val	Ile	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Glu		
	405						410					415					
gac	atg	gga	ttt	gag	gct	tca	gtc	gtt	tct	gaa	agc	tgt	tct	act	aac	1774	
Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala	Ser	Val	Val	Ser	Glu	Ser	Cys	Ser	Thr	Asn		
	420				425						430						
cct	ctt	gga	aac	cac	agt	gct	ggg	aat	tcc	atg	gtg	caa	act	aca	gat	1822	
Pro	Leu	Gly	Asn	His	Ser	Ala	Gly	Asn	Ser	Met	Val	Gln	Thr	Thr	Asp		
	435				440					445					450		
ggg	aca	cct	aca	tct	gtg	cag	gaa	gtg	gct	ccc	cac	act	ggg	agg	ctc	1870	
Gly	Thr	Pro	Thr		Val	Gln	Glu	Val	Ala	Pro	His	Thr	Gly	Arg	Leu		
				455					460					465			
cct	gca	aac	cat	gcc	ccg	gac	atc	ttg	gca	aag	tcc	cca	caa	tca	acc	1918	
Pro	Ala	Asn	His	Ala	Pro	Asp	Ile	Leu	Ala	Lys	Ser	Pro	Gln	Ser	Thr		
			470					475					480				
aga	gca	gtg	gca	ccg	cag	aag	tgc	ttc	tta	cag	atc	aaa	ggc	atg	acc	1966	
Arg	Ala	Val	Ala	Pro	Gln	Lys	Cys	Phe	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly	Met	Thr		
	485					490						495					

ES 2 784 264 T3

tgt gca tcc tgt gtg tct aac ata gaa agg aat ctg cag aaa gaa gct	2014
Cys Ala Ser Cys Val Ser Asn Ile Glu Arg Asn Leu Gln Lys Glu Ala	
500 505 510	
ggt gtt ctc tcc gtg ttg gtt gcc ttg atg gca gga aag gca gag atc	2062
Gly Val Leu Ser Val Leu Val Ala Leu Met Ala Gly Lys Ala Glu Ile	
515 520 525 530	
aag tat gac cca gag gtc atc cag ccc ctc gag ata gct cag ttc atc	2110
Lys Tyr Asp Pro Glu Val Ile Gln Pro Leu Glu Ile Ala Gln Phe Ile	
535 540 545	
cag gac ctg ggt ttt gag gca gca gtc atg gag gac tac gca ggc tcc	2158
Gln Asp Leu Gly Phe Glu Ala Ala Val Met Glu Asp Tyr Ala Gly Ser	
550 555 560	
gat ggc aac att gag ctg aca atc aca ggg atg acc tgc gcg tcc tgt	2206
Asp Gly Asn Ile Glu Leu Thr Ile Thr Gly Met Thr Cys Ala Ser Cys	
565 570 575	
gtc cac aac ata gag tcc aaa ctc acg agg aca aat ggc atc act tat	2254
Val His Asn Ile Glu Ser Lys Leu Thr Arg Thr Asn Gly Ile Thr Tyr	
580 585 590	
gcc tcc gtt gcc ctt gcc acc agc aaa gcc ctt gtt aag ttt gac ccg	2302
Ala Ser Val Ala Leu Ala Thr Ser Lys Ala Leu Val Lys Phe Asp Pro	
595 600 605 610	
gaa att atc ggt cca cgg gat att atc aaa att att gag gaa att ggc	2350
Glu Ile Ile Gly Pro Arg Asp Ile Ile Lys Ile Ile Glu Glu Ile Gly	
615 620 625	
ttt cat gct tcc ctg gcc cag aga aac ccc aac gct cat cac ttg gac	2398
Phe His Ala Ser Leu Ala Gln Arg Asn Pro Asn Ala His His Leu Asp	
630 635 640	
cac aag atg gaa ata aag cag tgg aag aag tct ttc ctg tgc agc ctg	2446
His Lys Met Glu Ile Lys Gln Trp Lys Lys Ser Phe Leu Cys Ser Leu	
645 650 655	
gtg ttt ggc atc cct gtc atg gcc tta atg atc tat atg ctg ata ccc	2494
Val Phe Gly Ile Pro Val Met Ala Leu Met Ile Tyr Met Leu Ile Pro	
660 665 670	
agc aac gag ccc cac cag tcc atg gtc ctg gac cac aac atc att cca	2542
Ser Asn Glu Pro His Gln Ser Met Val Leu Asp His Asn Ile Ile Pro	
675 680 685 690	
gga ctg tcc att cta aat ctc atc ttc ttt atc ttg tgt acc ttt gtc	2590
Gly Leu Ser Ile Leu Asn Leu Ile Phe Phe Ile Leu Cys Thr Phe Val	
695 700 705	
cag ctc ctc ggt ggg tgg tac ttc tac gtt cag gcc tac aaa tct ctg	2638
Gln Leu Leu Gly Trp Tyr Phe Tyr Val Gln Ala Tyr Lys Ser Leu	
710 715 720	
aga cac agg tca gcc aac atg gac gtg ctc atc gtc ctg gcc aca agc	2686
Arg His Arg Ser Ala Asn Met Asp Val Leu Ile Val Leu Ala Thr Ser	
725 730 735	
att gct tat gtt tat tct ctg gtc atc ctg gtg gtt gct gtg gct gag	2734
Ile Ala Tyr Val Tyr Ser Leu Val Ile Leu Val Val Ala Val Ala Glu	
740 745 750	

ES 2 784 264 T3

aag gcg gag agg agc cct gtg aca ttc ttc gac acg ccc ccc atg ctc Lys Ala Glu Arg Ser Pro Val Thr Phe Phe Asp Thr Pro Pro Met Leu 755 760 765 770	2782
ttt gtg ttc att gcc ctg ggc cgg tgg ctg gaa cac ttg gca aag agc Phe Val Phe Ile Ala Leu Gly Arg Trp Leu Glu His Leu Ala Lys Ser 775 780 785	2830
aaa acc tca gaa gcc ctg gct aaa ctc atg tct ctc caa gcc aca gaa Lys Thr Ser Glu Ala Leu Ala Lys Leu Met Ser Leu Gln Ala Thr Glu 790 795 800	2878
gcc acc gtt gtg acc ctt ggt gag gac aat tta atc atc agg gag gag Ala Thr Val Val Thr Leu Gly Glu Asp Asn Leu Ile Ile Arg Glu Glu 805 810 815	2926
caa gtc ccc atg gag ctg gtg cag cgg ggc gat atc gtc aag gtg gtc Gln Val Pro Met Glu Leu Val Gln Arg Gly Asp Ile Val Lys Val Val 820 825 830	2974
cct ggg gga aag ttt cca gtg gat ggg aaa gtc ctg gaa ggc aat acc Pro Gly Gly Lys Phe Pro Val Asp Gly Lys Val Leu Glu Gly Asn Thr 835 840 845 850	3022
atg gct gat gag tcc ctc atc aca gga gaa gcc atg cca gtc act aag Met Ala Asp Glu Ser Leu Ile Thr Gly Glu Ala Met Pro Val Thr Lys 855 860 865	3070
aaa ccc gga agc act gta att gcg ggg tct ata aat gca cat ggc tct Lys Pro Gly Ser Thr Val Ile Ala Gly Ser Ile Asn Ala His Gly Ser 870 875 880	3118
gtg ctc att aaa gct acc cac gtg ggc aat gac acc act ttg gct cag Val Leu Ile Lys Ala Thr His Val Gly Asn Asp Thr Thr Leu Ala Gln 885 890 895	3166
att gtg aaa ctg gtg gaa gag gct cag atg tca aag gca ccc att cag Ile Val Lys Leu Val Glu Glu Ala Gln Met Ser Lys Ala Pro Ile Gln 900 905 910	3214
cag ctg gct gac cgg ttt agt gga tat ttt gtc cca ttt atc atc atc Gln Leu Ala Asp Arg Phe Ser Gly Tyr Phe Val Pro Phe Ile Ile Ile 915 920 925 930	3262
atg tca act ttg acg ttg gtg gta tgg att gta atc ggt ttt atc gat Met Ser Thr Leu Thr Leu Val Val Trp Ile Val Ile Gly Phe Ile Asp 935 940 945	3310
ttt ggt gtt gtt cag aga tac ttt cct aac ccc aac aag cac atc tcc Phe Gly Val Val Gln Arg Tyr Phe Pro Asn Pro Asn Lys His Ile Ser 950 955 960	3358
cag aca gag gtg atc atc cgg ttt gct ttc cag acg tcc atc acg gtg Gln Thr Glu Val Ile Ile Arg Phe Ala Phe Gln Thr Ser Ile Thr Val 965 970 975	3406
ctg tgc att gcc tgc ccc tgc tcc ctg ggg ctg gcc acg ccc acg gct Leu Cys Ile Ala Cys Pro Cys Ser Leu Gly Leu Ala Thr Pro Thr Ala 980 985 990	3454
gtc atg gtg ggc acc ggg gtg gcc gcg cag aac ggc atc ctc atc aag Val Met Val Gly Thr Gly Val Ala Ala Gln Asn Gly Ile Leu Ile Lys	3502

ES 2 784 264 T3

995					1000					1005				1010	
gga ggc aag ccc ctg gag atg gcg cac aag ata aag act gtg atg ttt															3550
Gly Gly Lys Pro Leu Glu Met Ala His Lys Ile Lys Thr Val Met Phe															
				1015					1020				1025		
gac aag act ggc acc att acc cat ggc gtc ccc agg gtc atg cgg gtg															3598
Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr His Gly Val Pro Arg Val Met Arg Val															
			1030					1035					1040		
ctc ctg ctg ggg gat gtg gcc aca ctg ccc ctc agg aag gtt ctg gct															3646
Leu Leu Leu Gly Asp Val Ala Thr Leu Pro Leu Arg Lys Val Leu Ala															
			1045					1050					1055		
gtg gtg ggg act gcg gag gcc agc agt gaa cac ccc ttg ggc gtg gca															3694
Val Val Gly Thr Ala Glu Ala Ser Ser Glu His Pro Leu Gly Val Ala															
			1060					1065					1070		
gtc acc aaa tac tgt aaa gag gaa ctt gga aca gag acc ttg gga tac															3742
Val Thr Lys Tyr Cys Lys Glu Glu Leu Gly Thr Glu Thr Leu Gly Tyr															
								1080					1085		1090
tgc acg gac ttc cag gca gtg cca ggc tgt gga att ggg tgc aaa gtc															3790
Cys Thr Asp Phe Gln Ala Val Pro Gly Cys Gly Ile Gly Cys Lys Val															
								1095					1100		1105
agc aac gtg gaa ggc atc ctg gcc cac agt gag cgc cct ttg agt gca															3838
Ser Asn Val Glu Gly Ile Leu Ala His Ser Glu Arg Pro Leu Ser Ala															
			1110										1115		1120
ccg gcc agt cac ctg aat gag gct ggc agc ctt ccc gca gaa aaa gat															3886
Pro Ala Ser His Leu Asn Glu Ala Gly Ser Leu Pro Ala Glu Lys Asp															
			1125					1130					1135		
gca gtc ccc cag acc ttc tct gtg ctg att gga aac cgt gag tgg ctg															3934
Ala Val Pro Gln Thr Phe Ser Val Leu Ile Gly Asn Arg Glu Trp Leu															
			1140					1145					1150		
agg cgc aac ggt tta acc att tct agc gat gtc agt gac gct atg aca															3982
Arg Arg Asn Gly Leu Thr Ile Ser Ser Asp Val Ser Asp Ala Met Thr															
								1155					1160		1165
gac cac gag atg aaa gga cag aca gcc atc ctg gtg gct att gac ggt															4030
Asp His Glu Met Lys Gly Gln Thr Ala Ile Leu Val Ala Ile Asp Gly															
								1175					1180		1185
gtg ctc tgt ggg atg atc gca atc gca gac gct gtc aag cag gag gct															4078
Val Leu Cys Gly Met Ile Ala Ile Ala Asp Ala Val Lys Gln Glu Ala															
			1190										1195		1200
gcc ctg gct gtg cac acg ctg cag agc atg ggt gtg gac gtg gtt ctg															4126
Ala Leu Ala Val His Thr Leu Gln Ser Met Gly Val Asp Val Val Leu															
			1205					1210					1215		
atc acg ggg gac aac cgg aag aca gcc aga gct att gcc acc cag gtt															4174
Ile Thr Gly Asp Asn Arg Lys Thr Ala Arg Ala Ile Ala Thr Gln Val															
			1220					1225					1230		
ggc atc aac aaa gtc ttt gca gag gtg ctg cct tcg cac aag gtg gcc															4222
Gly Ile Asn Lys Val Phe Ala Glu Val Leu Pro Ser His Lys Val Ala															
			1235					1240					1245		1250
aag gtc cag gag ctc cag aat aaa ggg aag aaa gtc gcc atg gtg ggg															4270

ES 2 784 264 T3

Lys Val Gln Glu Leu Gln Asn Lys Gly Lys Lys Val Ala Met Val Gly	
1255 1260 1265	
gat ggg gtc aat gac tcc ccg gcc ttg gcc cag gca gac atg ggt gtg	4318
Asp Gly Val Asn Asp Ser Pro Ala Leu Ala Gln Ala Asp Met Gly Val	
1270 1275 1280	
gcc att ggc acc ggc acg gat gtg gcc atc gag gca gcc gac gtc gtc	4366
Ala Ile Gly Thr Gly Thr Asp Val Ala Ile Glu Ala Ala Asp Val Val	
1285 1290 1295	
ctt atc aga aat gat ttg ctg gat gtg gtg gct agc att cac ctt tcc	4414
Leu Ile Arg Asn Asp Leu Leu Asp Val Val Ala Ser Ile His Leu Ser	
1300 1305 1310	
aag agg act gtc cga agg ata cgc atc aac ctg gtc ctg gca ctg att	4462
Lys Arg Thr Val Arg Arg Ile Arg Ile Asn Leu Val Leu Ala Leu Ile	
1315 1320 1325 1330	
tat aac ctg gtt ggg ata ccc att gca gca ggt gtc ttc atg ccc atc	4510
Tyr Asn Leu Val Gly Ile Pro Ile Ala Ala Gly Val Phe Met Pro Ile	
1335 1340 1345	
ggc att gtg ctg cag ccc tgg atg ggc tca gcg gcc atg gca gcc tcc	4558
Gly Ile Val Leu Gln Pro Trp Met Gly Ser Ala Ala Met Ala Ala Ser	
1350 1355 1360	
tct gtg tct gtg gtg ctc tca tcc ctg cag ctc aag tgc tat aag aag	4606
Ser Val Ser Val Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Lys Cys Tyr Lys Lys	
1365 1370 1375	
cct gac ctg gag agg tat gag gca cag gcg cat ggc cac atg aag ccc	4654
Pro Asp Leu Glu Arg Tyr Glu Ala Gln Ala His Gly His Met Lys Pro	
1380 1385 1390	
ctg acg gca tcc cag gtc agt gtg cac ata ggc atg gat gac agg tgg	4702
Leu Thr Ala Ser Gln Val Ser Val His Ile Gly Met Asp Asp Arg Trp	
1395 1400 1405 1410	
cgg gac tcc ccc agg gcc aca cca tgg gac cag gtc agc tat gtc agc	4750
Arg Asp Ser Pro Arg Ala Thr Pro Trp Asp Gln Val Ser Tyr Val Ser	
1415 1420 1425	
cag gtg tcg ctg tcc tcc ctg acg tcc gac aag cca tct cgg cac agc	4798
Gln Val Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Lys Pro Ser Arg His Ser	
1430 1435 1440	
gct gca gca gac gat gat ggg gac aag tgg tct ctg ctc ctg aat ggc	4846
Ala Ala Ala Asp Asp Asp Gly Asp Lys Trp Ser Leu Leu Leu Asn Gly	
1445 1450 1455	
agg gat gag gag cag tac atc tga ggtaccaata aagacctctt attttcattc	4900
Arg Asp Glu Glu Gln Tyr Ile	
1460 1465	
atcaggtgtg gttggttttt ttgtgtgggg gcggatccat cggatcccgt gcggaccgag	4960
cggccgcagg aaccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc	5020
actgaggccg ggcgaccaa ggtagcccg cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg	5080
agcgagcgag cgcgagctg cctgcag	5107

<210> 2
 <211> 5107
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de ácido nucleico del vector de expresión AAV2-AAT-coATP7B

5

<220>

<221> región de repetición

<222> 1..141

<223>/nota = "ITR 5' del serotipo 2 del virus adenoasociado"

10

<220>

<221> promotor

<222> 156..460

<223>/nota = "alfa 1 antitripsina"

15

<220>

<221> CDS

<222> 473..4870

<223>/nota = "Secuencia con optimización de codones codificante de ATP7B"/tabla_trad = 1

20

<220>

<221> señal de poli(A)

<222> 4877..4932

25

<220>

<221> región de repetición

<222> 4968..5107

<223>/nota = "ITR 3' del serotipo 2 del virus adenoasociado"

30

<400> 2

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccgc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgtcgcca cccctccac cttggacaca 180

ggacgctgtg gtttctgagc caggtacaat gactcctttc ggtaagtga gtggaagctg 240

tacactgcc aggcagagcg tccgggcgagc gtaggcgggc gactcagatc ccagccagtg 300

gacttagccc ctgtttgctc ctccgataac tggggtgacc ttggttaata ttcaccagca 360

gcctccccgc ttgccctctt ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca gggccctgtc 420

tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagtga gcgcccgcca cc atg cca 478

Met Pro
1

gaa cag gaa cgc cag atc aca gca aga gag gga gca agt cgg aaa atc 526

Glu Gln Glu Arg Gln Ile Thr Ala Arg Glu Gly Ala Ser Arg Lys Ile
5 10 15

ctg agc aaa ctg agc ctg cca acc aga gca tgg gaa ccc gca atg aag 574

Leu Ser Lys Leu Ser Leu Pro Thr Arg Ala Trp Glu Pro Ala Met Lys
20 25 30

aaa agc ttc gcc ttt gac aac gtg gga tac gag gga ggg ctg gat gga 622

Lys Ser Phe Ala Phe Asp Asn Val Gly Tyr Glu Gly Gly Leu Asp Gly
35 40 45 50

ES 2 784 264 T3

ctg gga cct agc tcc cag gtg gcc acc tct aca gtc cga atc ctg ggc	670
Leu Gly Pro Ser Ser Gln Val Ala Thr Ser Thr Val Arg Ile Leu Gly	
55 60 65	
atg act tgc cag agt tgc gtg aaa tca att gaa gac cgg atc agt aat	718
Met Thr Cys Gln Ser Cys Val Lys Ser Ile Glu Asp Arg Ile Ser Asn	
70 75 80	
ctg aag gga atc att agc atg aaa gtg tcc ctg gag cag ggc tca gcc	766
Leu Lys Gly Ile Ile Ser Met Lys Val Ser Leu Glu Gln Gly Ser Ala	
85 90 95	
acc gtg aag tat gtc cct agc gtg gtc tgc ctg cag cag gtg tgc cac	814
Thr Val Lys Tyr Val Pro Ser Val Val Cys Leu Gln Gln Val Cys His	
100 105 110	
cag atc ggc gat atg ggg ttc gag gcc tcc att gct gaa ggg aaa gcc	862
Gln Ile Gly Asp Met Gly Phe Glu Ala Ser Ile Ala Glu Gly Lys Ala	
115 120 125 130	
gct tct tgg cct agc cgg tcc ctg cca gca cag gaa gca gtg gtc aag	910
Ala Ser Trp Pro Ser Arg Ser Leu Pro Ala Gln Glu Ala Val Val Lys	
135 140 145	
ctg aga gtg gag gga atg aca tgc cag agc tgc gtg agc agt atc gaa	958
Leu Arg Val Glu Gly Met Thr Cys Gln Ser Cys Val Ser Ser Ile Glu	
150 155 160	
gga aag gtc cga aaa ctg cag ggc gtg gtc cgg gtg aag gtc tct ctg	1006
Gly Lys Val Arg Lys Leu Gln Gly Val Val Arg Val Lys Val Ser Leu	
165 170 175	
agt aac cag gag gcc gtg att acc tac cag ccc tat ctg atc cag cct	1054
Ser Asn Gln Glu Ala Val Ile Thr Tyr Gln Pro Tyr Leu Ile Gln Pro	
180 185 190	
gaa gac ctg agg gat cac gtg aat gac atg ggc ttc gag gca gcc atc	1102
Glu Asp Leu Arg Asp His Val Asn Asp Met Gly Phe Glu Ala Ala Ile	
195 200 205 210	
aag tcc aaa gtg gcc cca ctg tct ctg ggg ccc att gat atc gaa aga	1150
Lys Ser Lys Val Ala Pro Leu Ser Leu Gly Pro Ile Asp Ile Glu Arg	
215 220 225	
ctg cag tcc acc aac cca aag agg ccc ctg tca agc gcc aac cag aac	1198
Leu Gln Ser Thr Asn Pro Lys Arg Pro Leu Ser Ser Ala Asn Gln Asn	
230 235 240	
ttc aac aat agt gag acc ctg gga cac cag ggc tca cat gtg gtc aca	1246
Phe Asn Asn Ser Glu Thr Leu Gly His Gln Gly Ser His Val Val Thr	
245 250 255	
ctg cag ctg agg att gac ggc atg cac tgc aag tct tgc gtg ctg aac	1294
Leu Gln Leu Arg Ile Asp Gly Met His Cys Lys Ser Cys Val Leu Asn	
260 265 270	
att gag gaa aat atc ggc cag ctg ctg ggg gtg cag tct atc cag gtc	1342
Ile Glu Glu Asn Ile Gly Gln Leu Leu Gly Val Gln Ser Ile Gln Val	
275 280 285 290	
agt ctg gag aac aag act gct cag gtg aaa tac gat cct tca tgc acc	1390
Ser Leu Glu Asn Lys Thr Ala Gln Val Lys Tyr Asp Pro Ser Cys Thr	

ES 2 784 264 T3

295										300										305										
agc	cca	gtg	gca	ctg	cag	cgc	gct	atc	gaa	gca	ctg	ccc	cct	gga	aat					1438										
Ser	Pro	Val	Ala	Leu	Gln	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	Gly	Asn															
			310					315					320																	
ttc	aag	gtg	agc	ctg	cct	gac	gga	gca	gag	gga	tcc	gga	acc	gat	cac					1486										
Phe	Lys	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Gly	Ala	Glu	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	His															
		325					330					335																		
agg	tcc	tct	agt	tca	cat	tcc	cca	ggg	tct	cca	cca	cga	aac	cag	gtg					1534										
Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Asn	Gln	Val															
	340					345					350																			
cag	gga	aca	tgt	tcc	acc	aca	ctg	att	gca	atc	gcc	ggc	atg	act	tgc					1582										
Gln	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Thr	Leu	Ile	Ala	Ile	Ala	Gly	Met	Thr	Cys															
	355				360					365					370															
gcc	tca	tgc	gtg	cac	agc	att	gaa	ggg	atg	atc	tct	cag	ctg	gag	gga					1630										
Ala	Ser	Cys	Val	His	Ser	Ile	Glu	Gly	Met	Ile	Ser	Gln	Leu	Glu	Gly															
				375					380					385																
gtg	cag	cag	atc	tca	gtc	agc	ctg	gcc	gag	ggc	act	gct	acc	gtg	ctg					1678										
Val	Gln	Gln	Ile	Ser	Val	Ser	Leu	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Thr	Val	Leu															
			390					395					400																	
tac	aat	ccc	agt	gtc	atc	tca	cct	gag	gaa	ctg	cgg	gct	gca	att	gag					1726										
Tyr	Asn	Pro	Ser	Val	Ile	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	Ile	Glu															
	405						410					415																		
gac	atg	ggg	ttc	gaa	gct	tcc	gtg	gtc	tcc	gaa	tct	tgc	agt	acc	aac					1774										
Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala	Ser	Val	Val	Ser	Glu	Ser	Cys	Ser	Thr	Asn															
	420					425					430																			
ccc	ctg	ggg	aat	cat	tcc	gcc	gga	aac	tct	atg	gtg	cag	act	acc	gac					1822										
Pro	Leu	Gly	Asn	His	Ser	Ala	Gly	Asn	Ser	Met	Val	Gln	Thr	Thr	Asp															
	435				440					445					450															
ggg	aca	cct	act	tct	gtg	cag	gag	gtc	gca	cca	cac	aca	gga	cgc	ctg					1870										
Gly	Thr	Pro	Thr	Ser	Val	Gln	Glu	Val	Ala	Pro	His	Thr	Gly	Arg	Leu															
				455				460						465																
cca	gcc	aat	cat	gct	ccc	gat	atc	ctg	gcc	aaa	agc	ccc	cag	tcc	act					1918										
Pro	Ala	Asn	His	Ala	Pro	Asp	Ile	Leu	Ala	Lys	Ser	Pro	Gln	Ser	Thr															
			470				475						480																	
cga	gct	gtg	gca	cct	cag	aag	tgt	ttt	ctg	cag	atc	aaa	ggc	atg	acc					1966										
Arg	Ala	Val	Ala	Pro	Gln	Lys	Cys	Phe	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly	Met	Thr															
		485				490						495																		
tgc	gcc	tct	tgc	gtg	agc	aac	att	gag	cgg	aat	ctg	cag	aag	gaa	gct					2014										
Cys	Ala	Ser	Cys	Val	Ser	Asn	Ile	Glu	Arg	Asn	Leu	Gln	Lys	Glu	Ala															
	500					505					510																			
ggg	gtg	ctg	agc	gtg	ctg	gtc	gca	ctg	atg	gcc	gga	aag	gct	gag	atc					2062										
Gly	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Val	Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Ile															
	515				520					525				530																
aag	tac	gac	cct	gaa	gtg	atc	cag	cca	ctg	gag	att	gcc	cag	ttc	atc					2110										
Lys	Tyr	Asp	Pro	Glu	Val	Ile	Gln	Pro	Leu	Glu	Ile	Ala	Gln	Phe	Ile															
				535				540						545																
cag	gat	ctg	ggc	ttt	gag	gcc	gct	gtg	atg	gaa	gac	tat	gct	ggg	agc					2158										

ES 2 784 264 T3

Gln	Asp	Leu	Gly	Phe	Glu	Ala	Ala	Val	Met	Glu	Asp	Tyr	Ala	Gly	Ser	
			550					555					560			
gat	gga	aac	att	gaa	ctg	acc	atc	acc	gga	atg	act	tgt	gcc	tct	tgc	2206
Asp	Gly	Asn	Ile	Glu	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Met	Thr	Cys	Ala	Ser	Cys	
		565					570					575				
gtg	cac	aac	atc	gag	agt	aaa	ctg	act	aga	acc	aat	ggg	att	acc	tac	2254
Val	His	Asn	Ile	Glu	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Thr	Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	
	580					585					590					
gcc	agt	gtg	gcc	ctg	gct	aca	tca	aag	gct	ctg	gtg	aaa	ttc	gac	ccc	2302
Ala	Ser	Val	Ala	Leu		Ala	Thr	Ser	Lys	Ala	Leu	Val	Lys	Phe	Asp	Pro
595					600					605					610	
gag	atc	att	gga	cct	agg	gat	atc	att	aag	atc	att	gag	gaa	atc	ggc	2350
Glu	Ile	Ile	Gly	Pro	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Ile	Ile	Glu	Glu	Ile	Gly	
				615					620					625		
ttt	cac	gca	agc	ctg	gcc	cag	cgc	aac	cca	aat	gcc	cac	cat	ctg	gac	2398
Phe	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Gln	Arg	Asn	Pro	Asn	Ala	His	His	Leu	Asp	
			630					635					640			
cat	aag	atg	gag	atc	aag	cag	tgg	aag	aaa	agt	ttc	ctg	tgc	tca	ctg	2446
His	Lys	Met	Glu	Ile	Lys	Gln	Trp	Lys	Lys	Ser	Phe	Leu	Cys	Ser	Leu	
		645					650					655				
gtg	ttt	gga	atc	ccc	gtc	atg	gcc	ctg	atg	atc	tac	atg	ctg	atc	cct	2494
Val	Phe	Gly	Ile	Pro	Val	Met	Ala	Leu	Met	Ile	Tyr	Met	Leu	Ile	Pro	
	660					665					670					
agc	aac	gag	cca	cac	cag	tcc	atg	gtg	ctg	gat	cat	aac	atc	att	cct	2542
Ser	Asn	Glu	Pro	His	Gln	Ser	Met	Val	Leu	Asp	His	Asn	Ile	Ile	Pro	
675					680					685					690	
ggc	ctg	tcc	atc	ctg	aat	ctg	att	ttc	ttt	atc	ctg	tgc	aca	ttc	gtg	2590
Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Ile	Phe	Phe	Ile	Leu	Cys	Thr	Phe	Val	
				695					700					705		
cag	ctg	ctg	gga	ggc	tgg	tac	ttt	tat	gtg	cag	gca	tat	aaa	tca	ctg	2638
Gln	Leu	Leu	Gly	Gly	Trp	Tyr	Phe	Tyr	Val	Gln	Ala	Tyr	Lys	Ser	Leu	
			710					715					720			
cga	cac	cgg	agc	gcc	aat	atg	gac	gtg	ctg	att	gtc	ctg	gca	acc	tct	2686
Arg	His	Arg	Ser	Ala	Asn	Met	Asp	Val	Leu	Ile	Val	Leu	Ala	Thr	Ser	
		725					730					735				
atc	gcc	tac	gtg	tat	agt	ctg	gtc	atc	ctg	gtg	gtc	gca	gtg	gca	gag	2734
Ile	Ala	Tyr	Val	Tyr	Ser	Leu	Val	Ile	Leu	Val	Val	Ala	Val	Ala	Glu	
	740					745					750					
aag	gca	gaa	cgg	agc	cca	gtg	act	ttc	ttt	gat	acc	cct	cca	atg	ctg	2782
Lys	Ala	Glu	Arg	Ser	Pro	Val	Thr	Phe	Phe	Asp	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	
755					760					765				770		
ttc	gtg	ttt	atc	gct	ctg	ggc	aga	tgg	ctg	gaa	cat	ctg	gca	aag	tca	2830
Phe	Val	Phe	Ile	Ala	Leu	Gly	Arg	Trp	Leu	Glu	His	Leu	Ala	Lys	Ser	
				775					780					785		
aaa	acc	agc	gag	gct	ctg	gca	aag	ctg	atg	agc	ctg	cag	gct	acc	gaa	2878
Lys	Thr	Ser	Glu	Ala	Leu	Ala	Lys	Leu	Met	Ser	Leu	Gln	Ala	Thr	Glu	
			790					795					800			

gca	aca	gtg	gtc	act	ctg	gga	gag	gac	aac	ctg	atc	att	cgc	gag	gaa	2926
Ala	Thr	Val	Val	Thr	Leu	Gly	Glu	Asp	Asn	Leu	Ile	Ile	Arg	Glu	Glu	
		805					810					815				
cag	gtg	cct	atg	gaa	ctg	gtc	cag	cga	ggc	gat	atc	gtg	aag	gtg	gtc	2974
Gln	Val	Pro	Met	Glu	Leu	Val	Gln	Arg	Gly	Asp	Ile	Val	Lys	Val	Val	
		820				825					830					
cca	ggg	gga	aaa	ttc	ccc	gtg	gac	ggc	aag	gtc	ctg	gag	ggg	aat	act	3022
Pro	Gly	Gly	Lys	Phe	Pro	Val	Asp	Gly	Lys	Val	Leu	Glu	Gly	Asn	Thr	
		835			840					845					850	
atg	gcc	gat	gaa	tcc	ctg	atc	acc	ggc	gag	gct	atg	cct	gtg	aca	aag	3070
Met	Ala	Asp	Glu	Ser	Leu	Ile	Thr	Gly	Glu	Ala	Met	Pro	Val	Thr	Lys	
				855					860						865	
aaa	cca	gga	tca	act	gtc	att	gct	ggc	agc	atc	aac	gca	cac	ggg	tcc	3118
Lys	Pro	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Ala	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	His	Gly	Ser	
			870					875					880			
gtg	ctg	atc	aag	gcc	aca	cat	gtc	ggg	aat	gac	aca	act	ctg	gct	cag	3166
Val	Leu	Ile	Lys	Ala	Thr	His	Val	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Leu	Ala	Gln	
		885					890					895				
att	gtg	aaa	ctg	gtc	gag	gaa	gcc	cag	atg	tcc	aag	gct	cct	atc	cag	3214
Ile	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Gln	Met	Ser	Lys	Ala	Pro	Ile	Gln	
		900				905					910					
cag	ctg	gcc	gat	cgg	ttc	tcc	ggc	tac	ttc	gtg	ccc	ttc	atc	att	atc	3262
Gln	Leu	Ala	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Tyr	Phe	Val	Pro	Phe	Ile	Ile	Ile	
				920						925					930	
atg	tct	aca	ctg	act	ctg	gtg	gtc	tgg	att	gtg	atc	gga	ttc	att	gac	3310
Met	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Val	Val	Trp	Ile	Val	Ile	Gly	Phe	Ile	Asp	
				935				940						945		
ttt	ggc	gtg	gtc	cag	aga	tat	ttt	ccc	aac	cct	aat	aag	cac	atc	agc	3358
Phe	Gly	Val	Val	Gln	Arg	Tyr	Phe	Pro	Asn	Pro	Asn	Lys	His	Ile	Ser	
			950					955					960			
cag	acc	gaa	gtg	atc	atc	agg	ttc	gca	ttt	cag	acc	agt	att	aca	gtg	3406
Gln	Thr	Glu	Val	Ile	Ile	Arg	Phe	Ala	Phe	Gln	Thr	Ser	Ile	Thr	Val	
		965				970						975				
ctg	tgc	atc	gcc	tgc	cca	tgt	tca	ctg	ggg	ctg	gct	acc	ccc	aca	gca	3454
Leu	Cys	Ile	Ala	Cys	Pro	Cys	Ser	Leu	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro	Thr	Ala	
		980				985					990					
gtg	atg	gtc	gga	aca	gga	gtg	gca	gca	cag	aac	gga	att	ctg	atc	aag	3502
Val	Met	Val	Gly	Thr	Gly	Val	Ala	Ala	Gln	Asn	Gly	Ile	Leu	Ile	Lys	
		995			1000				1005						1010	
ggc	ggg	aaa	ccc	ctg	gag	atg	gcc	cac	aag	atc	aaa	act	gtg	atg	ttt	3550
Gly	Gly	Lys	Pro	Leu	Glu	Met	Ala	His	Lys	Ile	Lys	Thr	Val	Met	Phe	
				1015					1020					1025		
gac	aaa	act	ggg	acc	att	aca	cat	gga	gtg	ccc	cgc	gtc	atg	cga	gtg	3598
Asp	Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	Thr	His	Gly	Val	Pro	Arg	Val	Met	Arg	Val	
			1030					1035					1040			
ctg	ctg	ctg	ggc	gat	gtg	gca	acc	ctg	cct	ctg	aga	aag	gtc	ctg	gca	3646
Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Val	Ala	Thr	Leu	Pro	Leu	Arg	Lys	Val	Leu	Ala	
		1045				1050						1055				

gtg gtc gga aca gca gag gct agc tcc gaa cac cca ctg ggg gtg gcc Val Val Gly Thr Ala Glu Ala Ser Ser Glu His Pro Leu Gly Val Ala 1060 1065 1070	3694
gtc aca aag tac tgc aaa gag gaa ctg ggc act gag acc ctg ggg tat Val Thr Lys Tyr Cys Lys Glu Glu Leu Gly Thr Glu Thr Leu Gly Tyr 1075 1080 1085 1090	3742
tgt act gac ttc cag gca gtg ccc gga tgc gga atc gga tgt aaa gtc Cys Thr Asp Phe Gln Ala Val Pro Gly Cys Gly Ile Gly Cys Lys Val 1095 1100 1105	3790
tct aac gtg gaa ggg att ctg gct cac agt gag cgg ccc ctg agc gca Ser Asn Val Glu Gly Ile Leu Ala His Ser Glu Arg Pro Leu Ser Ala 1110 1115 1120	3838
cct gca tcc cat ctg aat gaa gca gga agc ctg cca gca gag aag gac Pro Ala Ser His Leu Asn Glu Ala Gly Ser Leu Pro Ala Glu Lys Asp 1125 1130 1135	3886
gct gtg cct cag acc ttt tcc gtc ctg atc ggc aac aga gaa tgg ctg Ala Val Pro Gln Thr Phe Ser Val Leu Ile Gly Asn Arg Glu Trp Leu 1140 1145 1150	3934
cgg aga aat ggg ctg aca att tct agt gac gtg tcc gat gcc atg aca Arg Arg Asn Gly Leu Thr Ile Ser Ser Asp Val Ser Asp Ala Met Thr 1155 1160 1165 1170	3982
gat cac gag atg aaa ggc cag act gca att ctg gtg gcc atc gac gga Asp His Glu Met Lys Gly Gln Thr Ala Ile Leu Val Ala Ile Asp Gly 1175 1180 1185	4030
gtc ctg tgc ggc atg att gct atc gca gat gcc gtg aag cag gag gct Val Leu Cys Gly Met Ile Ala Ile Ala Asp Ala Val Lys Gln Glu Ala 1190 1195 1200	4078
gca ctg gcc gtc cat acc ctg cag tct atg ggc gtg gac gtg gtc ctg Ala Leu Ala Val His Thr Leu Gln Ser Met Gly Val Asp Val Val Leu 1205 1210 1215	4126
atc acc ggg gat aac cgg aaa aca gct aga gca att gcc act caa gtg Ile Thr Gly Asp Asn Arg Lys Thr Ala Arg Ala Ile Ala Thr Gln Val 1220 1225 1230	4174
ggc atc aat aag gtg ttc gct gaa gtc ctg cct agc cac aag gtc gca Gly Ile Asn Lys Val Phe Ala Glu Val Leu Pro Ser His Lys Val Ala 1235 1240 1245 1250	4222
aaa gtg cag gag ctg cag aac aag ggc aag aaa gtc gcc atg gtg gga Lys Val Gln Glu Leu Gln Asn Lys Gly Lys Lys Val Ala Met Val Gly 1255 1260 1265	4270
gac ggc gtg aat gat agc cca gct ctg gca cag gca gac atg gga gtc Asp Gly Val Asn Asp Ser Pro Ala Leu Ala Gln Ala Asp Met Gly Val 1270 1275 1280	4318
gct att ggg aca gga act gac gtg gca atc gag gcc gct gat gtg gtc Ala Ile Gly Thr Gly Thr Asp Val Ala Ile Glu Ala Ala Asp Val Val 1285 1290 1295	4366
ctg att agg aat gac ctg ctg gat gtg gtc gct tct att cat ctg agt Leu Ile Arg Asn Asp Leu Leu Asp Val Val Ala Ser Ile His Leu Ser	4414

ES 2 784 264 T3

1300	1305	1310	
aag agg aca gtg agg cgc att cgc atc aac ctg gtg ctg gcc ctg atc Lys Arg Thr Val Arg Arg Ile Arg Ile Asn Leu Val Leu Ala Leu Ile 1315	1320	1325	4462 1330
tac aat ctg gtg gga att cca atc gca gcc ggc gtg ttt atg cca att Tyr Asn Leu Val Gly Ile Pro Ile Ala Ala Gly Val Phe Met Pro Ile 1335	1340	1345	4510
ggg atc gtc ctg cag ccc tgg atg ggc tca gct gca atg gcc gct tca Gly Ile Val Leu Gln Pro Trp Met Gly Ser Ala Ala Met Ala Ala Ser 1350	1355	1360	4558
agc gtg agc gtg gtc ctg tcc tct ctg cag ctg aaa tgc tac aag aaa Ser Val Ser Val Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Lys Cys Tyr Lys Lys 1365	1370	1375	4606
cca gac ctg gag cgg tac gaa gct cag gca cac gga cat atg aag ccc Pro Asp Leu Glu Arg Tyr Glu Ala Gln Ala His Gly His Met Lys Pro 1380	1385	1390	4654
ctg acc gct tcc cag gtg tct gtc cac atc ggc atg gac gat aga tgg Leu Thr Ala Ser Gln Val Ser Val His Ile Gly Met Asp Asp Arg Trp 1395	1400	1405	4702 1410
agg gac agc cca agg gcc act cca tgg gat cag gtc agt tac gtg agc Arg Asp Ser Pro Arg Ala Thr Pro Trp Asp Gln Val Ser Tyr Val Ser 1415	1420	1425	4750
cag gtc agc ctg agt tca ctg acc agc gac aag ccc tcc cgc cat tct Gln Val Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Lys Pro Ser Arg His Ser 1430	1435	1440	4798
gca gcc gct gat gac gac ggg gac aag tgg agc ctg ctg ctg aac gga Ala Ala Ala Asp Asp Asp Gly Asp Lys Trp Ser Leu Leu Leu Asn Gly 1445	1450	1455	4846
agg gac gaa gaa cag tat atc taa ggtaccaata aagacctctt attttcattc Arg Asp Glu Glu Gln Tyr Ile 1460	1465		4900
atcaggtgtg gttggttttt ttgtgtgggg gcggatccat cggatcccgt gcggaccgag			4960
cggccgcagg aacccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc			5020
actgaggccg ggcgaccaa ggtcgcccgga cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg			5080
agcgagcgag cgcgcagctg cctgcag			5107

<210> 3
 <211> 1465
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> [CDS]:473-4.870 de SEQ ID NO 1

<400> 3

Met	Pro	Glu	Gln	Glu	Arg	Gln	Ile	Thr	Ala	Arg	Glu	Gly	Ala	Ser	Arg
1			5						10				15		
Lys	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Ser	Leu	Pro	Thr	Arg	Ala	Trp	Glu	Pro	Ala
			20					25					30		

Met	Lys	Lys	Ser	Phe	Ala	Phe	Asp	Asn	Val	Gly	Tyr	Glu	Gly	Gly	Leu
		35					40					45			
Asp	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Ser	Gln	Val	Ala	Thr	Ser	Thr	Val	Arg	Ile
	50					55					60				
Leu	Gly	Met	Thr	Cys	Gln	Ser	Cys	Val	Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Arg	Ile
	65				70				75					80	
Ser	Asn	Leu	Lys	Gly	Ile	Ile	Ser	Met	Lys	Val	Ser	Leu	Glu	Gln	Gly
			85						90					95	
Ser	Ala	Thr	Val	Lys	Tyr	Val	Pro	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Gln	Gln	Val
			100					105					110		
Cys	His	Gln	Ile	Gly	Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala	Ser	Ile	Ala	Glu	Gly
	115						120					125			
Lys	Ala	Ala	Ser	Trp	Pro	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Ala	Gln	Glu	Ala	Val
	130					135					140				
Val	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Gly	Met	Thr	Cys	Gln	Ser	Cys	Val	Ser	Ser
	145				150				155					160	
Ile	Glu	Gly	Lys	Val	Arg	Lys	Leu	Gln	Gly	Val	Val	Arg	Val	Lys	Val
			165					170						175	
Ser	Leu	Ser	Asn	Gln	Glu	Ala	Val	Ile	Thr	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Leu	Ile
			180					185					190		
Gln	Pro	Glu	Asp	Leu	Arg	Asp	His	Val	Asn	Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala
		195				200					205				
Ala	Ile	Lys	Ser	Lys	Val	Ala	Pro	Leu	Ser	Leu	Gly	Pro	Ile	Asp	Ile
	210					215					220				
Glu	Arg	Leu	Gln	Ser	Thr	Asn	Pro	Lys	Arg	Pro	Leu	Ser	Ser	Ala	Asn
	225				230					235				240	
Gln	Asn	Phe	Asn	Asn	Ser	Glu	Thr	Leu	Gly	His	Gln	Gly	Ser	His	Val
			245					250						255	
Val	Thr	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Asp	Gly	Met	His	Cys	Lys	Ser	Cys	Val
		260						265					270		
Leu	Asn	Ile	Glu	Glu	Asn	Ile	Gly	Gln	Leu	Leu	Gly	Val	Gln	Ser	Ile
	275					280						285			
Gln	Val	Ser	Leu	Glu	Asn	Lys	Thr	Ala	Gln	Val	Lys	Tyr	Asp	Pro	Ser
	290				295						300				
Cys	Thr	Ser	Pro	Val	Ala	Leu	Gln	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro
	305				310					315				320	
Gly	Asn	Phe	Lys	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Gly	Ala	Glu	Gly	Ser	Gly	Thr
			325					330						335	
Asp	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Asn
			340					345					350		
Gln	Val	Gln	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Thr	Leu	Ile	Ala	Ile	Ala	Gly	Met
		355					360					365			
Thr	Cys	Ala	Ser	Cys	Val	His	Ser	Ile	Glu	Gly	Met	Ile	Ser	Gln	Leu
	370					375					380				
Glu	Gly	Val	Gln	Gln	Ile	Ser	Val	Ser	Leu	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Thr
	385				390				395					400	
Val	Leu	Tyr	Asn	Pro	Ser	Val	Ile	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala
			405					410						415	
Ile	Glu	Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala	Ser	Val	Val	Ser	Glu	Ser	Cys	Ser
		420					425						430		
Thr	Asn	Pro	Leu	Gly	Asn	His	Ser	Ala	Gly	Asn	Ser	Met	Val	Gln	Thr
	435					440						445			
Thr	Asp	Gly	Thr	Pro	Thr	Ser	Val	Gln	Glu	Val	Ala	Pro	His	Thr	Gly
	450				455						460				
Arg	Leu	Pro	Ala	Asn	His	Ala	Pro	Asp	Ile	Leu	Ala	Lys	Ser	Pro	Gln
	465				470					475				480	
Ser	Thr	Arg	Ala	Val	Ala	Pro	Gln	Lys	Cys	Phe	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly
			485					490						495	
Met	Thr	Cys	Ala	Ser	Cys	Val	Ser	Asn	Ile	Glu	Arg	Asn	Leu	Gln	Lys
			500					505					510		
Glu	Ala	Gly	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Val	Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Lys	Ala
	515						520					525			
Glu	Ile	Lys	Tyr	Asp	Pro	Glu	Val	Ile	Gln	Pro	Leu	Glu	Ile	Ala	Gln

530						535						540					
Phe	Ile	Gln	Asp	Leu	Gly	Phe	Glu	Ala	Ala	Val	Met	Glu	Asp	Tyr	Ala		
545						550				555					560		
Gly	Ser	Asp	Gly	Asn	Ile	Glu	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Met	Thr	Cys	Ala		
				565					570					575			
Ser	Cys	Val	His	Asn	Ile	Glu	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Thr	Asn	Gly	Ile		
			580					585					590				
Thr	Tyr	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Thr	Ser	Lys	Ala	Leu	Val	Lys	Phe		
		595					600					605					
Asp	Pro	Glu	Ile	Ile	Gly	Pro	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Ile	Ile	Glu	Glu		
610						615						620					
Ile	Gly	Phe	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Gln	Arg	Asn	Pro	Asn	Ala	His	His		
625					630					635				640			
Leu	Asp	His	Lys	Met	Glu	Ile	Lys	Gln	Trp	Lys	Lys	Ser	Phe	Leu	Cys		
				645				650					655				
Ser	Leu	Val	Phe	Gly	Ile	Pro	Val	Met	Ala	Leu	Met	Ile	Tyr	Met	Leu		
			660					665					670				
Ile	Pro	Ser	Asn	Glu	Pro	His	Gln	Ser	Met	Val	Leu	Asp	His	Asn	Ile		
		675					680					685					
Ile	Pro	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Ile	Phe	Phe	Ile	Leu	Cys	Thr		
690						695					700						
Phe	Val	Gln	Leu	Leu	Gly	Gly	Trp	Tyr	Phe	Tyr	Val	Gln	Ala	Tyr	Lys		
705					710					715				720			
Ser	Leu	Arg	His	Arg	Ser	Ala	Asn	Met	Asp	Val	Leu	Ile	Val	Leu	Ala		
				725					730					735			
Thr	Ser	Ile	Ala	Tyr	Val	Tyr	Ser	Leu	Val	Ile	Leu	Val	Val	Ala	Val		
			740					745					750				
Ala	Glu	Lys	Ala	Glu	Arg	Ser	Pro	Val	Thr	Phe	Phe	Asp	Thr	Pro	Pro		
		755					760					765					
Met	Leu	Phe	Val	Phe	Ile	Ala	Leu	Gly	Arg	Trp	Leu	Glu	His	Leu	Ala		
770						775					780						
Lys	Ser	Lys	Thr	Ser	Glu	Ala	Leu	Ala	Lys	Leu	Met	Ser	Leu	Gln	Ala		
785					790					795				800			
Thr	Glu	Ala	Thr	Val	Val	Thr	Leu	Gly	Glu	Asp	Asn	Leu	Ile	Ile	Arg		
				805				810						815			
Glu	Glu	Gln	Val	Pro	Met	Glu	Leu	Val	Gln	Arg	Gly	Asp	Ile	Val	Lys		
			820					825					830				
Val	Val	Pro	Gly	Gly	Lys	Phe	Pro	Val	Asp	Gly	Lys	Val	Leu	Glu	Gly		
		835					840					845					
Asn	Thr	Met	Ala	Asp	Glu	Ser	Leu	Ile	Thr	Gly	Glu	Ala	Met	Pro	Val		
850						855					860						
Thr	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Ala	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	His		
865					870					875				880			
Gly	Ser	Val	Leu	Ile	Lys	Ala	Thr	His	Val	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Leu		
				885					890					895			
Ala	Gln	Ile	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Gln	Met	Ser	Lys	Ala	Pro		
			900					905					910				
Ile	Gln	Gln	Leu	Ala	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Tyr	Phe	Val	Pro	Phe	Ile		
		915					920					925					
Ile	Ile	Met	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Val	Val	Trp	Ile	Val	Ile	Gly	Phe		
930						935					940						
Ile	Asp	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Arg	Tyr	Phe	Pro	Asn	Pro	Asn	Lys	His		
945					950					955				960			
Ile	Ser	Gln	Thr	Glu	Val	Ile	Ile	Arg	Phe	Ala	Phe	Gln	Thr	Ser	Ile		
				965					970					975			
Thr	Val	Leu	Cys	Ile	Ala	Cys	Pro	Cys	Ser	Leu	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro		
			980					985					990				
Thr	Ala	Val	Met	Val	Gly	Thr	Gly	Val	Ala	Ala	Gln	Asn	Gly	Ile	Leu		
			995				1000						1005				
Ile	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Leu	Glu	Met	Ala	His	Lys	Ile	Lys	Thr	Val		
1010						1015					1020						
Met	Phe	Asp	Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	Thr	His	Gly	Val	Pro	Arg	Val	Met		
1025					1030					1035				1040			

```

Arg Val Leu Leu Leu Gly Asp Val Ala Thr Leu Pro Leu Arg Lys Val
      1045                      1050                      1055
Leu Ala Val Val Gly Thr Ala Glu Ala Ser Ser Glu His Pro Leu Gly
      1060                      1065                      1070
Val Ala Val Thr Lys Tyr Cys Lys Glu Glu Leu Gly Thr Glu Thr Leu
      1075                      1080                      1085
Gly Tyr Cys Thr Asp Phe Gln Ala Val Pro Gly Cys Gly Ile Gly Cys
      1090                      1095                      1100
Lys Val Ser Asn Val Glu Gly Ile Leu Ala His Ser Glu Arg Pro Leu
      1105                      1110                      1115                      1120
Ser Ala Pro Ala Ser His Leu Asn Glu Ala Gly Ser Leu Pro Ala Glu
      1125                      1130                      1135
Lys Asp Ala Val Pro Gln Thr Phe Ser Val Leu Ile Gly Asn Arg Glu
      1140                      1145                      1150
Trp Leu Arg Arg Asn Gly Leu Thr Ile Ser Ser Asp Val Ser Asp Ala
      1155                      1160                      1165
Met Thr Asp His Glu Met Lys Gly Gln Thr Ala Ile Leu Val Ala Ile
      1170                      1175                      1180
Asp Gly Val Leu Cys Gly Met Ile Ala Ile Ala Asp Ala Val Lys Gln
      1185                      1190                      1195                      1200
Glu Ala Ala Leu Ala Val His Thr Leu Gln Ser Met Gly Val Asp Val
      1205                      1210                      1215
Val Leu Ile Thr Gly Asp Asn Arg Lys Thr Ala Arg Ala Ile Ala Thr
      1220                      1225                      1230
Gln Val Gly Ile Asn Lys Val Phe Ala Glu Val Leu Pro Ser His Lys
      1235                      1240                      1245
Val Ala Lys Val Gln Glu Leu Gln Asn Lys Gly Lys Lys Val Ala Met
      1250                      1255                      1260
Val Gly Asp Gly Val Asn Asp Ser Pro Ala Leu Ala Gln Ala Asp Met
      1265                      1270                      1275                      1280
Gly Val Ala Ile Gly Thr Gly Thr Asp Val Ala Ile Glu Ala Ala Asp
      1285                      1290                      1295
Val Val Leu Ile Arg Asn Asp Leu Leu Asp Val Val Ala Ser Ile His
      1300                      1305                      1310
Leu Ser Lys Arg Thr Val Arg Arg Ile Arg Ile Asn Leu Val Leu Ala
      1315                      1320                      1325
Leu Ile Tyr Asn Leu Val Gly Ile Pro Ile Ala Ala Gly Val Phe Met
      1330                      1335                      1340
Pro Ile Gly Ile Val Leu Gln Pro Trp Met Gly Ser Ala Ala Met Ala
      1345                      1350                      1355                      1360
Ala Ser Ser Val Ser Val Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Lys Cys Tyr
      1365                      1370                      1375
Lys Lys Pro Asp Leu Glu Arg Tyr Glu Ala Gln Ala His Gly His Met
      1380                      1385                      1390
Lys Pro Leu Thr Ala Ser Gln Val Ser Val His Ile Gly Met Asp Asp
      1395                      1400                      1405
Arg Trp Arg Asp Ser Pro Arg Ala Thr Pro Trp Asp Gln Val Ser Tyr
      1410                      1415                      1420
Val Ser Gln Val Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Lys Pro Ser Arg
      1425                      1430                      1435                      1440
His Ser Ala Ala Ala Asp Asp Asp Gly Asp Lys Trp Ser Leu Leu Leu
      1445                      1450                      1455
Asn Gly Arg Asp Glu Glu Gln Tyr Ile
      1460                      1465

```

<210> 4
 <211> 1465
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> [CDS]:473-4.870 de SEQ ID NO 2

<400> 4

Met	Pro	Glu	Gln	Glu	Arg	Gln	Ile	Thr	Ala	Arg	Glu	Gly	Ala	Ser	Arg	1	5	10	15
Lys	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Ser	Leu	Pro	Thr	Arg	Ala	Trp	Glu	Pro	Ala	20	25	30	
Met	Lys	Lys	Ser	Phe	Ala	Phe	Asp	Asn	Val	Gly	Tyr	Glu	Gly	Gly	Leu	35	40	45	
Asp	Gly	Leu	Gly	Pro	Ser	Ser	Gln	Val	Ala	Thr	Ser	Thr	Val	Arg	Ile	50	55	60	
Leu	Gly	Met	Thr	Cys	Gln	Ser	Cys	Val	Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Arg	Ile	65	70	75	80
Ser	Asn	Leu	Lys	Gly	Ile	Ile	Ser	Met	Lys	Val	Ser	Leu	Glu	Gln	Gly	85	90	95	
Ser	Ala	Thr	Val	Lys	Tyr	Val	Pro	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Gln	Gln	Val	100	105	110	
Cys	His	Gln	Ile	Gly	Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala	Ser	Ile	Ala	Glu	Gly	115	120	125	
Lys	Ala	Ala	Ser	Trp	Pro	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Ala	Gln	Glu	Ala	Val	130	135	140	
Val	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Gly	Met	Thr	Cys	Gln	Ser	Cys	Val	Ser	Ser	145	150	155	160
Ile	Glu	Gly	Lys	Val	Arg	Lys	Leu	Gln	Gly	Val	Val	Arg	Val	Lys	Val	165	170	175	
Ser	Leu	Ser	Asn	Gln	Glu	Ala	Val	Ile	Thr	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Leu	Ile	180	185	190	
Gln	Pro	Glu	Asp	Leu	Arg	Asp	His	Val	Asn	Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala	195	200	205	
Ala	Ile	Lys	Ser	Lys	Val	Ala	Pro	Leu	Ser	Leu	Gly	Pro	Ile	Asp	Ile	210	215	220	
Glu	Arg	Leu	Gln	Ser	Thr	Asn	Pro	Lys	Arg	Pro	Leu	Ser	Ser	Ala	Asn	225	230	235	240
Gln	Asn	Phe	Asn	Asn	Ser	Glu	Thr	Leu	Gly	His	Gln	Gly	Ser	His	Val	245	250	255	
Val	Thr	Leu	Gln	Leu	Arg	Ile	Asp	Gly	Met	His	Cys	Lys	Ser	Cys	Val	260	265	270	
Leu	Asn	Ile	Glu	Glu	Asn	Ile	Gly	Gln	Leu	Leu	Gly	Val	Gln	Ser	Ile	275	280	285	
Gln	Val	Ser	Leu	Glu	Asn	Lys	Thr	Ala	Gln	Val	Lys	Tyr	Asp	Pro	Ser	290	295	300	
Cys	Thr	Ser	Pro	Val	Ala	Leu	Gln	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Leu	Pro	Pro	305	310	315	320
Gly	Asn	Phe	Lys	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	Gly	Ala	Glu	Gly	Ser	Gly	Thr	325	330	335	
Asp	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Asn	340	345	350	
Gln	Val	Gln	Gly	Thr	Cys	Ser	Thr	Thr	Leu	Ile	Ala	Ile	Ala	Gly	Met	355	360	365	
Thr	Cys	Ala	Ser	Cys	Val	His	Ser	Ile	Glu	Gly	Met	Ile	Ser	Gln	Leu	370	375	380	
Glu	Gly	Val	Gln	Gln	Ile	Ser	Val	Ser	Leu	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Thr	385	390	395	400
Val	Leu	Tyr	Asn	Pro	Ser	Val	Ile	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	405	410	415	
Ile	Glu	Asp	Met	Gly	Phe	Glu	Ala	Ser	Val	Val	Ser	Glu	Ser	Cys	Ser	420	425	430	
Thr	Asn	Pro	Leu	Gly	Asn	His	Ser	Ala	Gly	Asn	Ser	Met	Val	Gln	Thr	435	440	445	
Thr	Asp	Gly	Thr	Pro	Thr	Ser	Val	Gln	Glu	Val	Ala	Pro	His	Thr	Gly	450	455	460	
Arg	Leu	Pro	Ala	Asn	His	Ala	Pro	Asp	Ile	Leu	Ala	Lys	Ser	Pro	Gln	465	470	475	480
Ser	Thr	Arg	Ala	Val	Ala	Pro	Gln	Lys	Cys	Phe	Leu	Gln	Ile	Lys	Gly	485	490	495	

Met	Thr	Cys	Ala	Ser	Cys	Val	Ser	Asn	Ile	Glu	Arg	Asn	Leu	Gln	Lys
			500					505					510		
Glu	Ala	Gly	Val	Leu	Ser	Val	Leu	Val	Ala	Leu	Met	Ala	Gly	Lys	Ala
		515					520					525			
Glu	Ile	Lys	Tyr	Asp	Pro	Glu	Val	Ile	Gln	Pro	Leu	Glu	Ile	Ala	Gln
	530					535					540				
Phe	Ile	Gln	Asp	Leu	Gly	Phe	Glu	Ala	Ala	Val	Met	Glu	Asp	Tyr	Ala
545					550					555					560
Gly	Ser	Asp	Gly	Asn	Ile	Glu	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Met	Thr	Cys	Ala
			565						570					575	
Ser	Cys	Val	His	Asn	Ile	Glu	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Thr	Asn	Gly	Ile
			580					585					590		
Thr	Tyr	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Thr	Ser	Lys	Ala	Leu	Val	Lys	Phe
		595					600					605			
Asp	Pro	Glu	Ile	Ile	Gly	Pro	Arg	Asp	Ile	Ile	Lys	Ile	Ile	Glu	Glu
	610					615					620				
Ile	Gly	Phe	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Gln	Arg	Asn	Pro	Asn	Ala	His	His
625					630					635					640
Leu	Asp	His	Lys	Met	Glu	Ile	Lys	Gln	Trp	Lys	Lys	Ser	Phe	Leu	Cys
			645						650					655	
Ser	Leu	Val	Phe	Gly	Ile	Pro	Val	Met	Ala	Leu	Met	Ile	Tyr	Met	Leu
			660					665					670		
Ile	Pro	Ser	Asn	Glu	Pro	His	Gln	Ser	Met	Val	Leu	Asp	His	Asn	Ile
		675					680					685			
Ile	Pro	Gly	Leu	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Ile	Phe	Phe	Ile	Leu	Cys	Thr
	690					695					700				
Phe	Val	Gln	Leu	Leu	Gly	Gly	Trp	Tyr	Phe	Tyr	Val	Gln	Ala	Tyr	Lys
705					710					715					720
Ser	Leu	Arg	His	Arg	Ser	Ala	Asn	Met	Asp	Val	Leu	Ile	Val	Leu	Ala
			725						730					735	
Thr	Ser	Ile	Ala	Tyr	Val	Tyr	Ser	Leu	Val	Ile	Leu	Val	Val	Ala	Val
			740					745					750		
Ala	Glu	Lys	Ala	Glu	Arg	Ser	Pro	Val	Thr	Phe	Phe	Asp	Thr	Pro	Pro
		755					760					765			
Met	Leu	Phe	Val	Phe	Ile	Ala	Leu	Gly	Arg	Trp	Leu	Glu	His	Leu	Ala
	770						775					780			
Lys	Ser	Lys	Thr	Ser	Glu	Ala	Leu	Ala	Lys	Leu	Met	Ser	Leu	Gln	Ala
785					790					795					800
Thr	Glu	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Gly	Glu	Asp	Asn	Leu	Ile	Ile	Arg	
			805					810					815		
Glu	Glu	Gln	Val	Pro	Met	Glu	Leu	Val	Gln	Arg	Gly	Asp	Ile	Val	Lys
			820					825					830		
Val	Val	Pro	Gly	Gly	Lys	Phe	Pro	Val	Asp	Gly	Lys	Val	Leu	Glu	Gly
		835					840					845			
Asn	Thr	Met	Ala	Asp	Glu	Ser	Leu	Ile	Thr	Gly	Glu	Ala	Met	Pro	Val
	850					855						860			
Thr	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Ala	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	His
865					870					875					880
Gly	Ser	Val	Leu	Ile	Lys	Ala	Thr	His	Val	Gly	Asn	Asp	Thr	Thr	Leu
			885						890					895	
Ala	Gln	Ile	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Gln	Met	Ser	Lys	Ala	Pro
			900					905					910		
Ile	Gln	Gln	Leu	Ala	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Tyr	Phe	Val	Pro	Phe	Ile
	915						920					925			
Ile	Ile	Met	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Val	Val	Trp	Ile	Val	Ile	Gly	Phe
	930					935						940			
Ile	Asp	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Arg	Tyr	Phe	Pro	Asn	Pro	Asn	Lys	His
945					950					955					960
Ile	Ser	Gln	Thr	Glu	Val	Ile	Ile	Arg	Phe	Ala	Phe	Gln	Thr	Ser	Ile
			965						970					975	
Thr	Val	Leu	Cys	Ile	Ala	Cys	Pro	Cys	Ser	Leu	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro
			980					985					990		
Thr	Ala	Val	Met	Val	Gly	Thr	Gly	Val	Ala	Ala	Gln	Asn	Gly	Ile	Leu

		995					1000					1005				
Ile	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Leu	Glu	Met	Ala	His	Lys	Ile	Lys	Thr	Val	
	1010					1015					1020					
Met	Phe	Asp	Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	Thr	His	Gly	Val	Pro	Arg	Val	Met	
1025					1030					1035					1040	
Arg	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	Asp	Val	Ala	Thr	Leu	Pro	Leu	Arg	Lys	Val	
				1045					1050					1055		
Leu	Ala	Val	Val	Gly	Thr	Ala	Glu	Ala	Ser	Ser	Glu	His	Pro	Leu	Gly	
			1060					1065					1070			
Val	Ala	Val	Thr	Lys	Tyr	Cys	Lys	Glu	Glu	Leu	Gly	Thr	Glu	Thr	Leu	
	1075						1080				1085					
Gly	Tyr	Cys	Thr	Asp	Phe	Gln	Ala	Val	Pro	Gly	Cys	Gly	Ile	Gly	Cys	
	1090					1095					1100					
Lys	Val	Ser	Asn	Val	Glu	Gly	Ile	Leu	Ala	His	Ser	Glu	Arg	Pro	Leu	
1105					1110					1115					1120	
Ser	Ala	Pro	Ala	Ser	His	Leu	Asn	Glu	Ala	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	
				1125					1130					1135		
Lys	Asp	Ala	Val	Pro	Gln	Thr	Phe	Ser	Val	Leu	Ile	Gly	Asn	Arg	Glu	
			1140					1145					1150			
Trp	Leu	Arg	Arg	Asn	Gly	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asp	Val	Ser	Asp	Ala	
	1155						1160				1165					
Met	Thr	Asp	His	Glu	Met	Lys	Gly	Gln	Thr	Ala	Ile	Leu	Val	Ala	Ile	
	1170					1175					1180					
Asp	Gly	Val	Leu	Cys	Gly	Met	Ile	Ala	Ile	Ala	Asp	Ala	Val	Lys	Gln	
1185					1190					1195					1200	
Glu	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	His	Thr	Leu	Gln	Ser	Met	Gly	Val	Asp	Val	
				1205					1210					1215		
Val	Leu	Ile	Thr	Gly	Asp	Asn	Arg	Lys	Thr	Ala	Arg	Ala	Ile	Ala	Thr	
			1220					1225					1230			
Gln	Val	Gly	Ile	Asn	Lys	Val	Phe	Ala	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	His	Lys	
	1235						1240				1245					
Val	Ala	Lys	Val	Gln	Glu	Leu	Gln	Asn	Lys	Gly	Lys	Lys	Val	Ala	Met	
	1250					1255					1260					
Val	Gly	Asp	Gly	Val	Asn	Asp	Ser	Pro	Ala	Leu	Ala	Gln	Ala	Asp	Met	
1265					1270					1275					1280	
Gly	Val	Ala	Ile	Gly	Thr	Gly	Thr	Asp	Val	Ala	Ile	Glu	Ala	Ala	Asp	
			1285						1290					1295		
Val	Val	Leu	Ile	Arg	Asn	Asp	Leu	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Ser	Ile	His	
			1300					1305					1310			
Leu	Ser	Lys	Arg	Thr	Val	Arg	Arg	Ile	Arg	Ile	Asn	Leu	Val	Leu	Ala	
	1315						1320					1325				
Leu	Ile	Tyr	Asn	Leu	Val	Gly	Ile	Pro	Ile	Ala	Ala	Gly	Val	Phe	Met	
	1330					1335					1340					
Pro	Ile	Gly	Ile	Val	Leu	Gln	Pro	Trp	Met	Gly	Ser	Ala				

<210> 5
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de AAT directo

5 <400> 5
 ctggtctaga acgcgtcgcc accccctcca ccttgg 36

<210> 6
<211> 36
10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de AAT inverso

15 <400> 6
 atcatgatgc ggccgcttca ctgtcccagg tcagtg 36

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ácido nucleico que comprende:

- 5 a) una secuencia de nucleótidos del promotor mínimo del gen de $\alpha 1$ -antitripsina (AAT);
b) una secuencia de nucleótidos codificante de la ATPasa 2 transportadora del cobre humana (ATP7B);
c) una secuencia de señal de poliadenilación; y
d) secuencias de ITR 5' e ITR 3' de un virus adenoasociado (AAV);

10 en donde el promotor mínimo del gen de $\alpha 1$ antitripsina es la única secuencia de elementos reguladores de la transcripción eucariota de dicha construcción de ácido nucleico.

15 2. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos del promotor del gen de $\alpha 1$ -antitripsina (AAT) es la secuencia delimitada por las bases 156-460 de SEQ. ID. NO. 1.

3. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la secuencia de aminoácidos de ATP7B es SEQ. ID. NO. 3.

20 4. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la secuencia de nucleótidos codificante de ATP7B se selecciona del grupo que consiste en

- a) la secuencia codificante delimitada por las bases 473-4.870 de SEQ. ID. NO. 1;
- b) la secuencia codificante delimitada por las bases 473-4.870 de SEQ. ID. NO. 2; y
- 25 c) una secuencia en donde al menos 1.170 de los codones codificantes de la ATPasa 2 transportadora del cobre son idénticos a los codones de la secuencia codificante delimitada por las bases 473-4.870 de SEQ. ID. NO. 2.

5. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde las secuencias de ITR 5' e ITR 3' de un AAV son de un serotipo seleccionado del grupo que consiste en un AAV1, un AAV2 y un AAV4, preferentemente del serotipo AAV2.

30 6. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la secuencia de nucleótidos de la construcción es SEQ. ID. NO. 1 o SEQ. ID. NO. 2.

35 7. Un vector de expresión que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

8. El vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el vector es un vector de AAV.

40 9. Una célula hospedadora que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8.

10. Una partícula vírica que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8.

45 11. La partícula vírica de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la partícula vírica comprende proteínas de la cápside de un AAV.

50 12. La partícula vírica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la partícula vírica comprende proteínas de la cápside de un AAV de un serotipo seleccionado de uno o más del grupo que consiste en AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 y AAV10.

55 13. Una composición farmacéutica que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8, una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 9, una partícula vírica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 14. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8, una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 9 o una partícula vírica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para su uso como un medicamento.

65 15. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, un vector de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8, una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 9 o una partícula vírica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento de una afección causada por una deficiencia o disfunción de ATP7B en el ser humano, seleccionada entre las siguientes afecciones: trastornos

coleostáticos, enfermedad de Alzheimer, cáncer y enfermedad de Wilson, preferentemente, en el tratamiento de la enfermedad de Wilson.

5 16. Un proceso de producción de partículas víricas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que comprende las etapas de:

a) cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 9 en un medio de cultivo; y
b) recoger las partículas víricas del sobrenadante del cultivo celular y/o del interior de las células, en donde la célula hospedadora comprende además:

10 i) una construcción de ácido nucleico codificante de los genes rep y/o cap de AAV no portadora de las secuencias de ITR;
e/o
ii) una construcción de ácido nucleico que comprende genes auxiliares víricos.

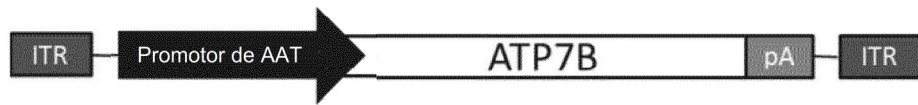


Figura 1

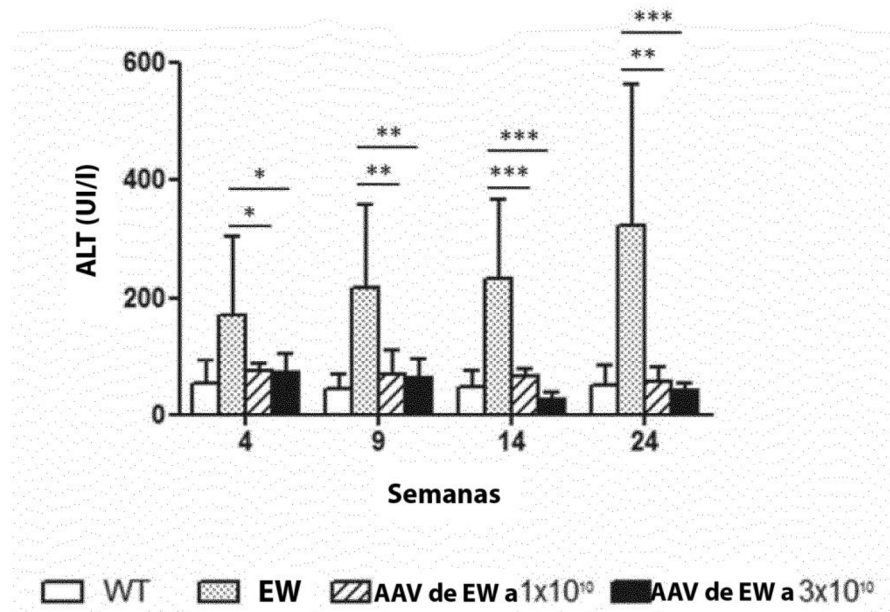


Figura 2

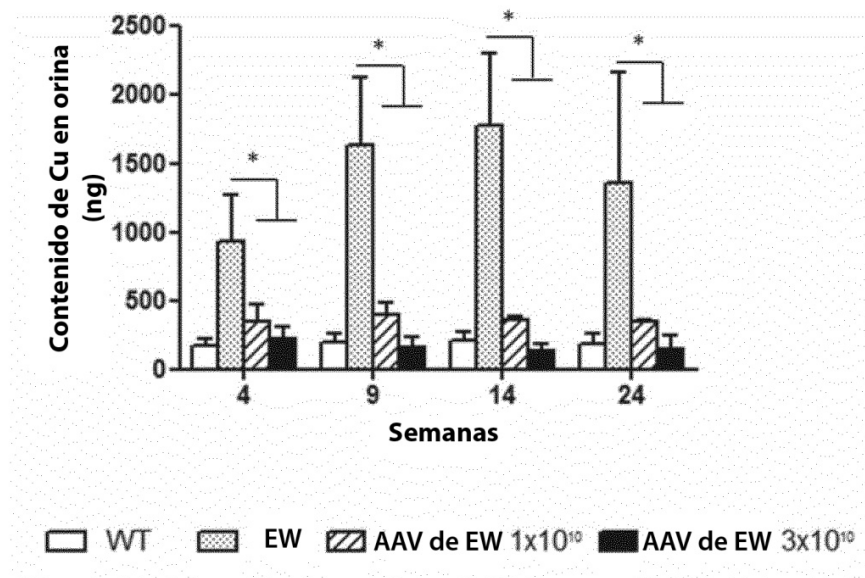


Figura 3

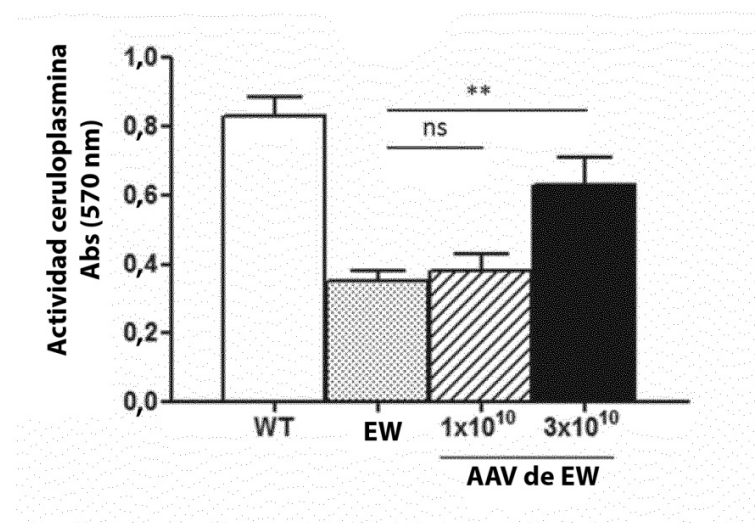


Figura 4

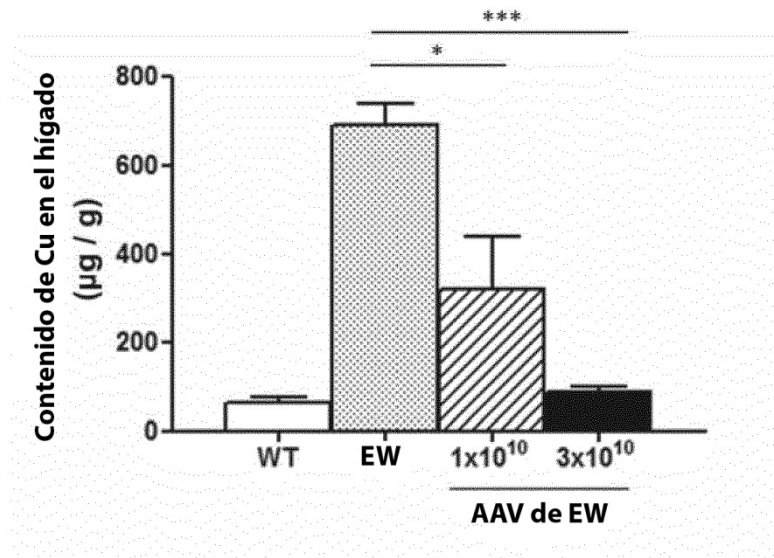


Figura 5A

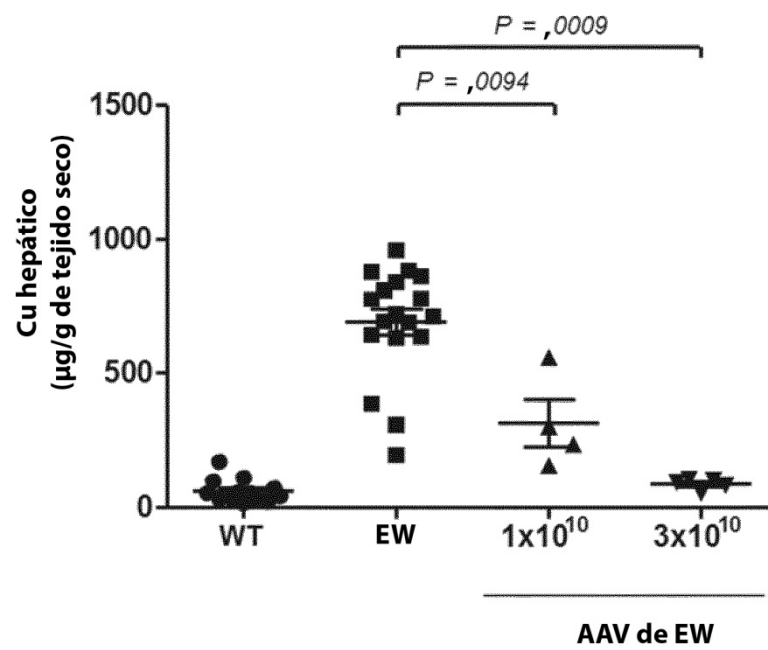


Figura 5B

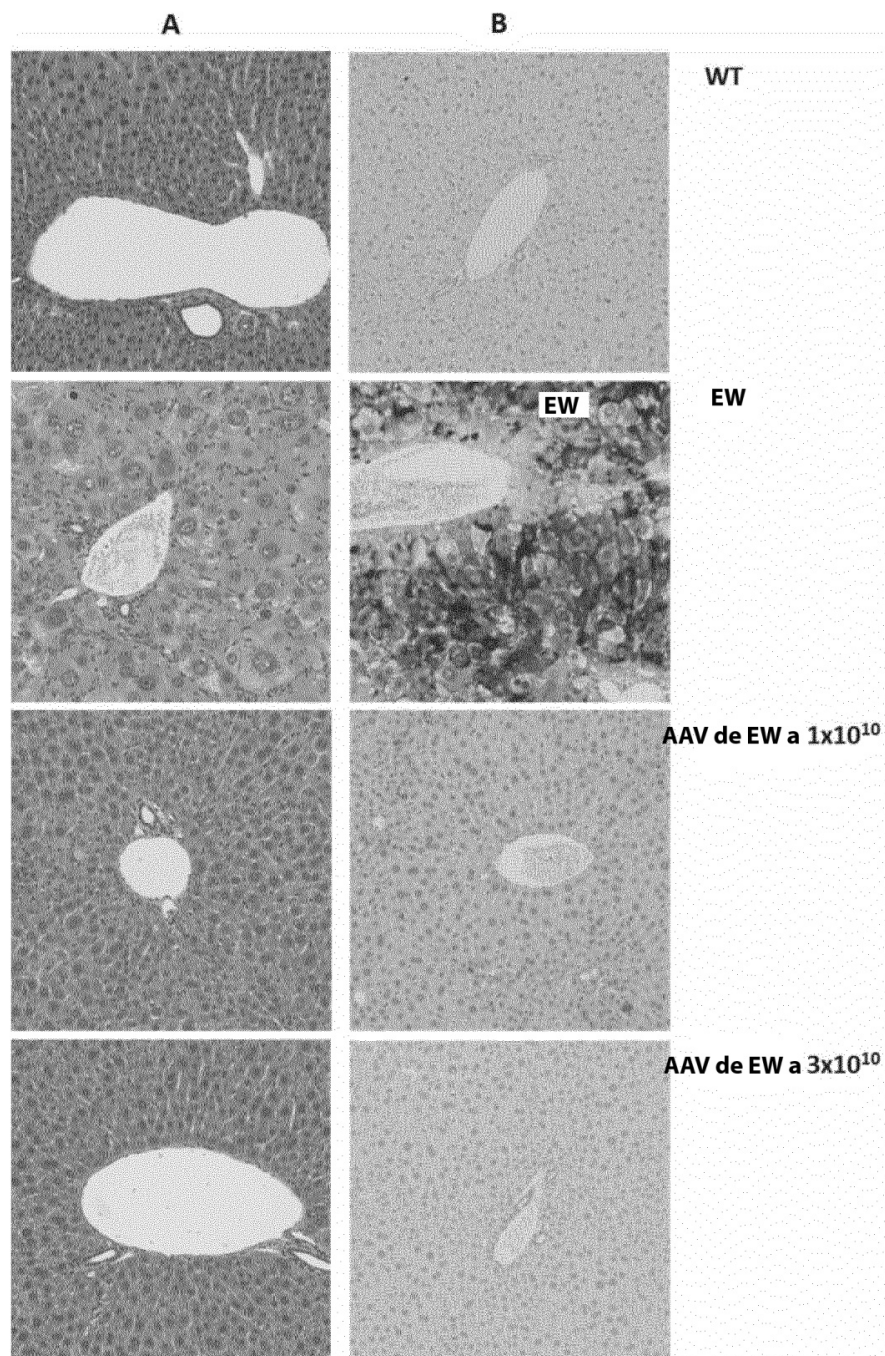


Figura 6

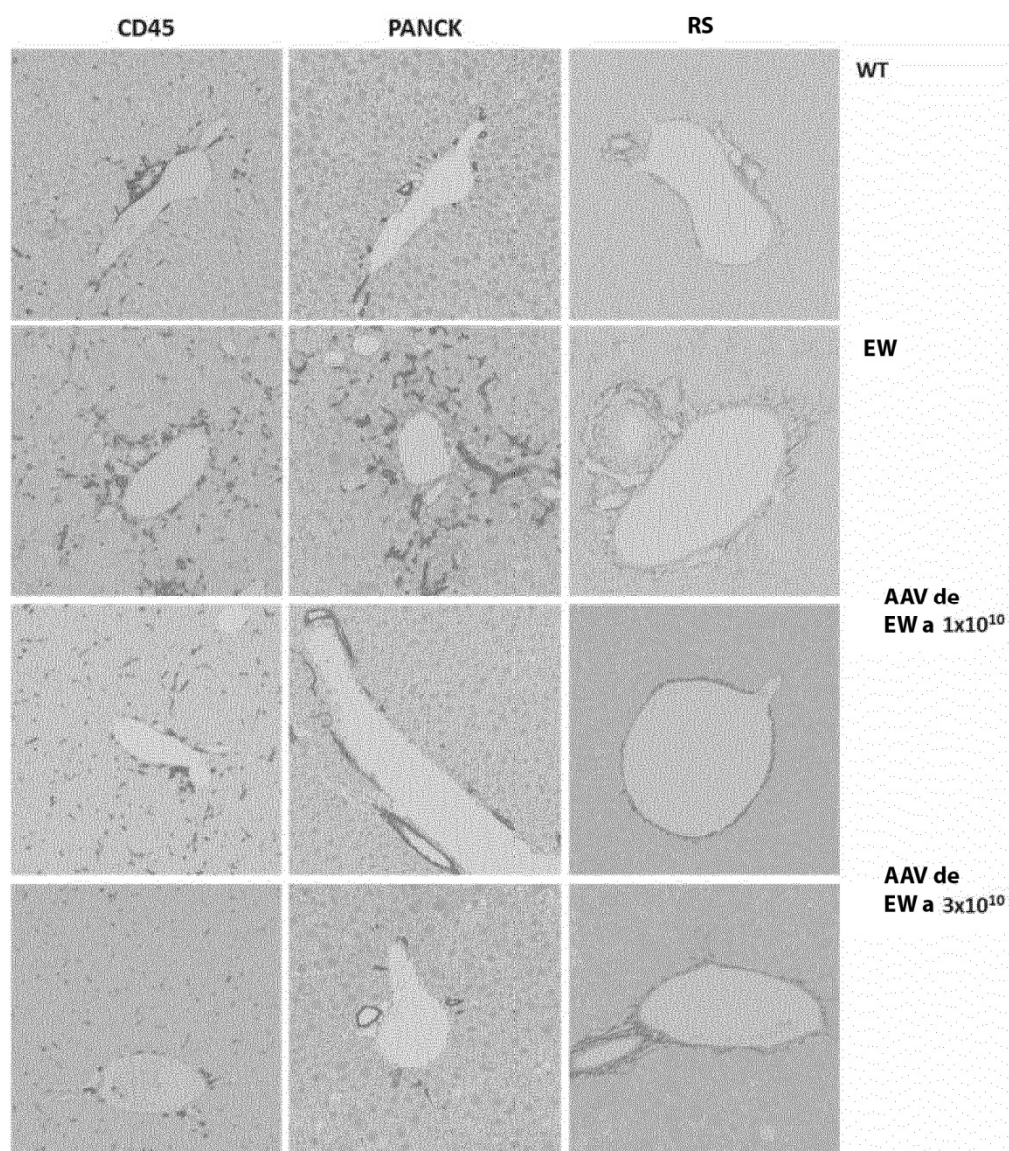


Figura 7

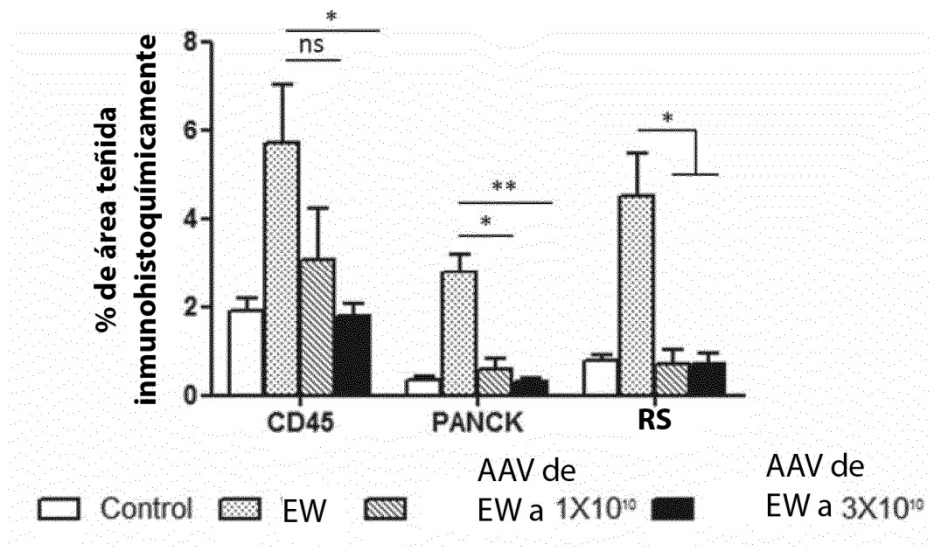


Figura 8

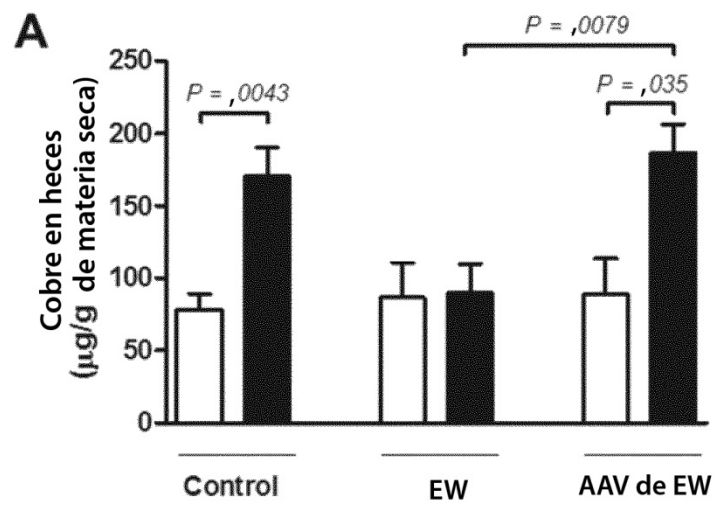


Figura 9A

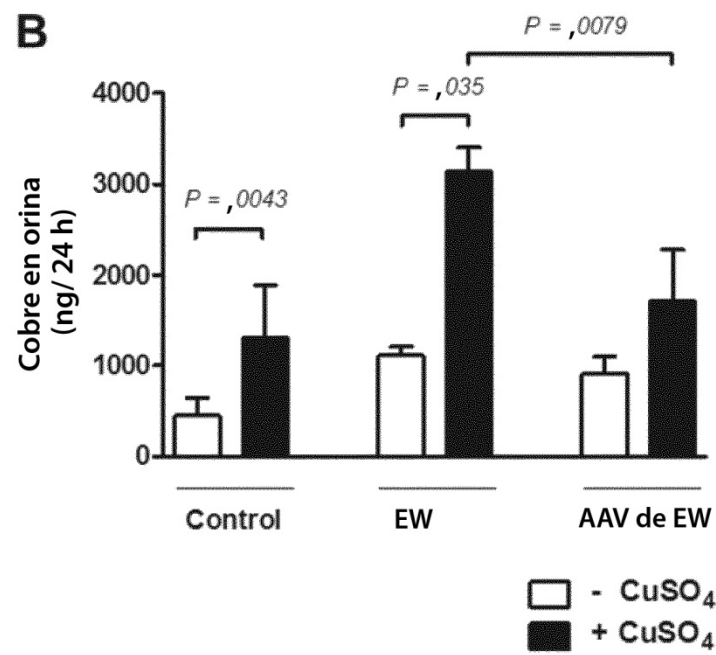


Figura 9B

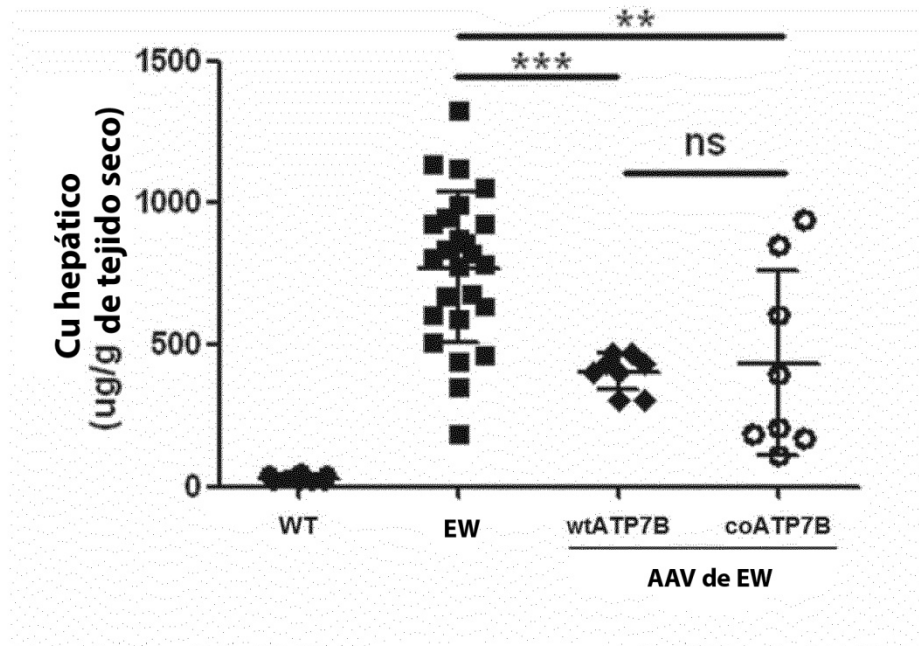


Figura 10