

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 355**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/025509**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14151341**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14770186 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 2984166**

54 Título: **Composiciones para tratar MPSI**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361788724 P

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

11.02.2021

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**WILSON, JAMES M. y
GURDA, BRITTNEY L.**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 805 355 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para tratar MPSI

5 **Antecedentes de la invención**

Las mucopolisacaridosis son un grupo de trastornos hereditarios causados por la falta de enzimas lisosómicas específicas implicadas en la degradación de los glucosaminoglucanos (GAG), también llamados mucopolisacáridos. La acumulación de GAG parcialmente degradado provoca interferencia con la función celular, tisular y orgánica. A lo largo del tiempo, el GAG se acumula dentro de las células, la sangre y el tejido conectivo, dando como resultado un aumento del daño celular y orgánico. El más grave de los trastornos de mucopolisacaridosis (MPS), MPS I, está provocado por una deficiencia de la enzima α -L-iduronidasa (IDUA). Esto da lugar a tres síndromes clínicos que en orden de gravedad son los síndromes de Hurler, Hurler-Scheie y Scheie. Cada uno se hereda de forma autosómica recesiva y el grado de deficiencia enzimática está directamente relacionado con la gravedad del fenotipo clínico.

Se ha informado que el gen *IDUA* proporciona instrucciones para producir una enzima llamada alfa-L-iduronidasa, que es esencial para la descomposición de grandes moléculas de azúcar llamadas glucosaminoglucanos (GAG). Específicamente, se informa que la alfa-L-iduronidasa retira el sulfato de una molécula conocida como ácido alfa-L-idurónico sulfatado, que está presente en dos GAG llamados heparán sulfato y dermatán sulfato. La alfa-L-iduronidasa se encuentra en los lisosomas, compartimentos dentro de las células que digieren y reciclan diferentes tipos de moléculas. Se han encontrado más de 100 mutaciones en el gen *IDUA* que producen mucopolisacaridosis tipo I (MPS I). Las mutaciones que cambian un bloque de construcción de ADN (nucleótido) son las más comunes. Las mutaciones que hacen que la MPS I reduzca o elimine por completo la función de la alfa-L-iduronidasa.

Con respecto a los síndromes clínicos, la normativa actual de atención para el síndrome de Hurler es el trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT), tales como el trasplante de médula ósea (BMT) o los trasplantes de sangre del cordón umbilical (UCBT). El procedimiento se realiza lo antes posible y antes de los dos años de edad, para impactar tanto en aspectos somáticos como del SNC de la enfermedad. Sin embargo, HSCT para MPS I permanece asociado con una cantidad significativa de morbilidad y una tasa de mortalidad del 20 %. Si el trasplante no es una opción, entonces puede iniciarse la terapia de reemplazo enzimático (ERT) que requiere una infusión semanal de enzima para la vida del paciente. La ERT no afecta la progresión de la enfermedad del SNC, pero mejora parcialmente las manifestaciones somáticas. La organomegalia mejora significativamente aunque aspectos de la enfermedad en el sistema esquelético, ojo y corazón solo se mejoran parcialmente. Los pacientes pueden requerir cirugía para estabilizar la cadera y la rodilla y para tratar el síndrome del túnel carpiano y las contracciones de los dedos. La enfermedad cardíaca se trata médicamente, aunque finalmente puede requerirse cirugía.

La ERT para MPS I proporciona una enzima exógena para su absorción en los lisosomas y un catabolismo aumentado de GAG. Aunque las enzimas lisosómicas funcionan internamente, los receptores de manosa-6-fosfato de la superficie celular son capaces de unirse, internalizar y administrar estas enzimas a los lisosomas. IDUA recombinante (Aldurazyme®, BioMarin) está aprobado por la FDA para pacientes con formas Hurler y Hurler-Scheie de MPS I y para pacientes con la forma Scheie que tienen síntomas moderados a graves y se demostró que mejora la función pulmonar y la capacidad para caminar. También se ha observado que la ERT reduce la hepatomegalia en pacientes con MPS I, así como los niveles de GAG urinario. Sin embargo, ya que la enzima intravenosa no atraviesa fácilmente el cerebro, la ERT actualmente no aborda los síntomas neurológicos experimentados por algunos pacientes con MPS I.

Las complicaciones de la ERT giran en torno a la respuesta inmunitaria a la enzima recombinante, que puede variar de anafilaxia leve a completa, así como complicaciones del acceso periférico de por vida tales como infecciones locales y sistémicas. Hasta el 91 % de los pacientes que reciben Aldurazyme desarrollan anticuerpos contra la enzima, aunque no está claro cuánto afecta a la efectividad. Adicionalmente, la ERT requiere infusiones intravenosas (i.v.) semanales, administradas durante un período de 3-8 horas en un entorno hospitalario, que impacta significativamente en la calidad de vida del paciente y, a un alto coste, es una tensión importante en los sistemas de reembolso de atención médica.

A la luz de estas limitaciones, un tratamiento que pueda corregir más eficazmente la morbilidad asociada a MPS I sigue siendo una necesidad médica insatisfecha.

Hartung et al ("Correction of metabolic, craniofacial, and neurologic abnormalities in MPS I mice treated at birth with adeno-associated virus vector transducing the human α -L-iduronidase gene", *Molecular Therapy*, vol. 9, N.º 6, 1 de junio de 2004, páginas 866-875) describieron modelos murinos de enfermedades de almacenamiento lisosómico que brindan la oportunidad de evaluar el potencial de la terapia génica para prevenir las manifestaciones sistémicas de la enfermedad. Los autores concluyeron que la transducción mediada por AAV del gen *IDUA* en ratones recién nacidos *Idua*^{-/-} es suficiente para tener un impacto curativo importante en varios de los parámetros más importantes de la enfermedad.

Cardone et al ("Correction of Hunter syndrome in the MPSII mouse model by AAV2/8-mediated gene delivery", *Human Molecular Genetics*, vol. 15, N.º 7, 1 de enero de 2006) describió un diseño para un enfoque *in vivo* de terapia génica para el tratamiento de un ratón adulto con deficiencia de iduronato-2-sulfatasa. Los autores sugirieron en sus

descubrimientos que este enfoque de transferencia génica tiene potencial para el tratamiento sistémico de pacientes con síndrome de Hunter.

Sumario de la invención

5 En un aspecto, la invención proporciona un casete de expresión que comprende un gen de alfa-L-iduronidasa humana (hIDUA) que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos aproximadamente el 95 % idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica una alfa-L-iduronidasa humana funcional en células humanas, en donde dicho casete de expresión comprende además secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de la alfa-L-iduronidasa humana en células humanas, comprendiendo dichas secuencias de control reguladoras un promotor específico del hígado.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un vector que contiene el casete de expresión. En una realización, el casete de expresión se encuentra en un plásmido cis. En otra realización, el casete de expresión se encuentra en pENN.TBG.hIDUA.nRBG.

15 En otro aspecto más, la invención proporciona una partícula recombinante de virus adenoasociados (rAAV) que tiene una cápside de AAV y que contiene una repetición terminal invertida izquierda (ITR), un gen de la alfa-L-iduronidasa humana (hIDUA) bajo el control de secuencias reguladoras que controlan la expresión del mismo y una ITR derecha de AAV, en donde dicho gen hIDUA tiene una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 (FIGURA 1) o una secuencia al menos aproximadamente el 95 % idéntica a la misma que codifica una alfa-L-iduronidasa humana funcional. En una realización, el gen hIDUA funcional se expresa bajo el control de un promotor específico del hígado. Dicho promotor puede ser un promotor de globulina de unión a tiroxina (TBG).

20 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso en la partícula vírica recombinante adenoasociada AAV2/8.TBG.hIDUA.co.

25 En un otro aspecto más, la invención proporciona una composición para usar en el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo I (MPS I) que comprende el rAAV que comprende el casete de expresión descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Aún otros aspectos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la Descripción detallada de la invención.

Breve descripción de las figuras

35 Las Figuras 1A-1D proporcionan la secuencia del plásmido pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.RGB [SEQ ID NO: 3] descrito en el presente documento, que incluye la secuencia de ácido nucleico del gen IDUA humano funcional. El gen del IDUA funcional ubicado en la posición 1251-3213 de la FIG1 y su secuencia enzimática codificada también se proporcionan en la SEQ ID NO: 1 y 2. La secuencia se anota más para identificar las secuencias de los potenciadores alfa mic/bik, el intrón 1, la globulina de conejo poli A, los ITR, el origen de la replicación.

40 La Figura 2 proporciona el mapa circular de pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.RGB.

Descripción detallada de la invención

45 Las composiciones descritas en el presente documento proporcionan un casete de expresión que lleva un gen IDUA humano que expresa una cantidad terapéuticamente eficaz de enzima alfa-L-iduronidasa humana funcional en un sujeto humano.

50 Como se usa en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de la composición que administra y expresa en las células diana una cantidad de enzima suficiente para mejorar o tratar los síntomas de Hurler, los síndromes de Hurler-Scheie y/o Scheie y/o MPS I. El "tratamiento" puede incluir el empeoramiento de los síntomas de uno de los síndromes (o MPS I) y posiblemente la reversión de uno o más de los síntomas de los mismos.

55 Como se usa en el presente documento, una "alfa-L-iduronidasa humana funcional" se refiere a una enzima alfa-L-iduronidasa humana que funciona normalmente en humanos sin MPS1 o un síndrome asociado tales como los síndromes de Hurler, de Hurler-Scheie y/o de Scheie. Contrariamente, una variante de la enzima alfa-L-iduronidasa humana que provoca MPS1 o uno de estos síndromes se considera no funcional. En una realización, una alfa-1-iduronidasa humana funcional tiene la secuencia de aminoácidos de una alfa-L-iduronidasa humana de tipo silvestre descrita por Bremer et al., Mol. Genet. Metab. 104 (3): 289-294 (2011), secuencia de referencia NCBI NP_000194.2, reproducida en SEQ ID NO: 2 (653 aminoácidos). Sin embargo, se han descrito diversos polimorfismos funcionales (variantes) naturales de esta secuencia y pueden incluirse dentro del alcance de esta invención. Estas variantes incluyen, con referencia a la SEQ ID NO: 2, una glucosilación ligada a N en la posición 110 [Chen et al, J Proteome Res., 8:651-661 (2009)], un cambio de H a Q en la posición de aminoácido 33 [SEQ ID NO: 7, VAR_003350; Scott, HS, et al, Proc Natl Acad. Sci, 88:9695-9699 (1991); Scott, HS, et al, Genomics, 12:1311-1313 (1992); Scott HS, et al, Hum Genet, 90:327-327 (1992); Bertola F., et al, Hum Mutat, 32: E2189-E2210 (2011)], una reducción de H a Q en la

posición de aminoácido 82 [SEQ ID NO: 8, VAR_020976; Scott, HS, Hum Genet, antes citada], un cambio de R a Q en la posición 105 [SEQ ID NO: 9, VAR_003356; Scott, Hum Genet, anteriormente citada; Bertola et al, antes citada], un cambio de G a R en la posición 116 [SEQ ID NO: 12, VAR_003367], un cambio de V a A en la posición 279 [SEQ ID NO: 11, VAR_003359], un cambio de L a R en la posición 346 [SEQ ID NO: 12, VAR_017436, Teng, YN, et al, Clin. Genet, 57: 131-136 (2000)], un cambio de A a T en la posición 361 [SEQ ID NO: 13, VAR_003364; Scott, HS, et al, Hum Mol Genet, 2: 1471-1473 (1993); Yogalingam et al, Hum Mutat, 24: 199-207 (2004); Bertola, et al, antes citada], un cambio de H a N en la posición 449 [SEQ ID NO: 14, VAR_066228, Bertola et al, antes citada], un cambio de V a I en la posición 454 [SEQ ID NO: 15, VAR_003372; Yogalingam et al, anteriormente citada; Bertola, et al, antes citada], un cambio de A a T en la posición 591 [SEQ ID NO: 16, VAR_0066231, Bertola et al, citado anteriormente] y un cambio de A a T en la posición 622 [SEQ ID NO: 17, Scott et al, Genomics, anteriormente citada]. Véase, por ejemplo, UniProtKB/Swiss-Prot; www.uniprot.org/uniprot/P35475. En otra realización, una alfa-L-iduronidasa humana funcional puede incluir una secuencia de aminoácidos sintética en la que todos o una parte de los primeros 26 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, que corresponden al péptido líder (señal), se reemplazan por un péptido líder heterólogo. Este péptido líder, que es responsable de transportar la enzima fuera de la célula a través de su ruta secretora hacia la circulación, puede sustituirse con otro péptido líder adecuado, por ejemplo, tales como los péptidos líderes de interleucina-2 (IL-2) u oncostatina. Los péptidos líderes adecuados son preferentemente, aunque no necesariamente de origen humano. Los péptidos líderes adecuados pueden elegirse de <http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/zhang270.htm>, o pueden determinarse usando una diversidad de programas computacionales para determinar el péptido líder (señal) en una proteína seleccionada. Aunque no limitado, tales secuencias pueden tener de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 28 aminoácidos de longitud, o pueden ser más grandes o más pequeños según se requiera. Además, se ha descrito al menos un ensayo *in vitro* siendo útil para evaluar la actividad enzimática de una enzima IDUA [véase, por ejemplo, Kakkis et al, Mol Genet Metabol, marzo de 2001; 72(3): 199-208].

Adecuadamente, la composición y el método descritos en el presente documento no requieren inyecciones a largo plazo, semanalmente repetidas de una dosis terapéutica. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que el método descrito en el presente documento es útil para corregir el fenotipo del sistema nervioso central además de los síntomas somáticos asociados a los trastornos de MPSI.

30 Casete de expresión

El casete de expresión se compone de, como mínimo, un gen y sus secuencias reguladoras. Cuando el casete está diseñado para expresarse a partir de un virus adenoasociado recombinante, el casete de expresión contiene además repeticiones terminales invertidas (ITR) de 5' y 3' AAV. Estas ITR pueden ser de longitud completa o una o ambas ITR pueden estar truncadas. Por ejemplo, puede usarse una ITR 5' truncada que contiene una delección de la secuencia D y una eliminación del sitio de resolución terminal (trs), por ejemplo, para un AAV auto-complementario. En una realización, el rAAV está pseudotipado, es decir, la cápside de AAV proviene de una fuente AAV diferente a al AAV que proporciona las ITR. En una realización, se usan las ITR del serotipo 2 del AAV. Sin embargo, pueden seleccionarse ITR de otras fuentes adecuadas.

Como se describe en el presente documento, a los pacientes que padecen una de las afecciones descritas en el presente documento se administra un casete de expresión que lleva un gen funcional de alfa-L-iduronidasa humana (hIDUA) bajo el control de secuencias reguladoras que dirigen la expresión de una enzima funcional de alfa-L-iduronidasa humana en las células.

El casete de expresión contiene un gen hIDUA caracterizado por tener la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. Esta secuencia, desarrollada por los inventores, tiene una identidad de aproximadamente el 83 % con la secuencia de genes publicada de Genbank NP000194.2 que codifica la SEQ ID NO: 2. En otra realización, el casete de expresión contiene un gen hIDUA caracterizado por tener la secuencia de nucleótidos idéntica al menos en un 80 % a la SEQ ID NO: 1 y codifica una alfa-L-iduronidasa humana funcional. En otra realización, la secuencia tiene al menos aproximadamente el 85 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o al menos aproximadamente el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 y codifica una alfa-L-iduronidasa humana funcional. En una realización, la secuencia es al menos aproximadamente el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, al menos aproximadamente el 97 % idéntica a SEQ ID NO: 1 o al menos aproximadamente el 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1 y codifica una alfa-L-iduronidasa humana funcional. En una realización, esto abarca el gen hIDUA de longitud completa, incluyendo las secuencias del péptido líder de la alfa-L-iduronidasa humana (es decir, que codifica de aproximadamente el aminoácido 26 o aproximadamente el aminoácido 27, a aproximadamente el aminoácido 653 de SEQ ID NO: 2), que corresponde de aproximadamente 1 a aproximadamente 78 de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el gen hIDUA codifica una enzima alfa-L-iduronidasa humana sintética funcional que es un péptido sintético que comprende una secuencia líder heteróloga fusionada a la porción secretada de una enzima alfa-L-iduronidasa funcional, es decir, los aminoácidos aproximadamente 27 a aproximadamente 653 de la SEQ ID NO: 2 o una de las variantes funcionales de la misma que se identifican en el presente documento.

La identidad o similitud con respecto a una secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo resto) o similares (es decir, resto de aminoácido del mismo grupo en función de las propiedades comunes de la cadena lateral, véase a

continuación) con las regiones de péptidos y polipéptidos proporcionadas en el presente documento, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El porcentaje (%) de identidad es una medida de la relación entre dos polinucleótidos o dos polipéptidos, según se determina al comparar sus secuencias de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. En general, Las dos secuencias a comparar están alineadas para dar una correlación máxima entre las secuencias. Se examina la alineación de las dos secuencias y se determina el número de posiciones que dan una correspondencia exacta de aminoácidos o nucleótidos entre las dos secuencias, dividido por la longitud total de la alineación y multiplicado por 100 para dar una cifra de % de identidad. Esta cifra de % de identidad puede determinarse a lo largo de la longitud completa de las secuencias a comparar, que es particularmente adecuado para secuencias de la misma longitud o muy similar y que son altamente homólogas o de longitudes definidas más cortas, que es más adecuado para secuencias de longitud desigual o que tienen un menor nivel de homología. Hay una serie de algoritmos y programas de ordenador basados en ellos, que están disponibles para usarse en la bibliografía y/o están disponibles públicamente o en el mercado para realizar alineaciones y porcentajes de identidad. La selección del algoritmo o programa no es una limitación de la presente invención.

Algunos ejemplos de programas de alineación adecuados que incluyen, por ejemplo, el software CLUSTALW bajo Unix y luego importado al programa Bioedit (Hall, T. A. 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98); el paquete de análisis de secuencia de Wisconsin, versión 9.1 (Devereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12:387-395, 1984, disponible de Genetics Computer Group, Madison, Wis., EE.UU.). Los programas BESTFIT y GAP, pueden usarse para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad entre dos secuencias polipeptídicas.

Otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias incluyen, por ejemplo, la familia BLAST de programas disponibles en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Md., EE.UU. y accesible a través de la página de inicio del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov, el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencia GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4; y FASTA (Pearson W. R. y Lipman D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448, 1988, disponible como parte del paquete de análisis de secuencia de Wisconsin). Software SeqWeb (una interfaz basada en web para el paquete GCG Wisconsin: programa de hueco).

Como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las frases "que comprende" y "que incluye" son inclusivas de otros componentes, elementos, integrantes, etapas y similares. Contrariamente, la frase "que consiste" y sus variantes son exclusivas de otros componentes, elementos, integrantes, etapas y similares. El término "aproximadamente" abarca una variación dentro de e incluyendo $\pm 10\%$, a menos que se especifique de otro modo.

En una realización, el casete de expresión está diseñado para la expresión dirigida al hígado humano. Por lo tanto, un promotor específico del hígado es particularmente adecuado para el casete de expresión. En una realización, se selecciona el promotor de globulina de unión a tiroxina. En una realización, el promotor TBG tiene la secuencia de nucleótidos 442 a 901 de la FIGURA 1. Como alternativa, puede seleccionarse otro promotor específico del hígado. Los ejemplos de promotores que son específicos de tejido son bien conocidos para el hígado y otros tejidos (albúmina, Miyatake et al., (1997) J. Virol., 71:5124-32; promotor central del virus de la hepatitis B, Sandig et al., (1996) Gene Ther., 3:1002-9; alfa-fetoproteína (AFP), Arbutnot et al., (1996) Hum. Gene Ther., 7:1503-14), osteocalcina ósea (Stein et al., (1997) Mol. Biol. Rep., 24:185-96); sialoproteína ósea (Chen et al., (1996) J. Bone Miner. Res., 11:654-64), linfocitos (CD2, Hansal et al., (1998) J. Immunol., 161:1063-8; cadena pesada de inmunoglobulina; cadena del receptor de células T), neuronal tal como el promotor de enolasa específica de neurona (NSE) (Andersen et al., (1993) Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15), gen de cadena ligera de neurofilamento (Piccioli et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5) y el gen vgf específico de neurona (Piccioli et al., (1995) Neuron, 15:373-84), entre otros. Pueden seleccionarse otros promotores (no específicos del hígado), pero los casetes de expresión que contienen los mismos pueden no tener todas las ventajas de aquellos con TBG u otro promotor específico del hígado. Como alternativa, puede seleccionarse un promotor regulable. Véase, por ejemplo, el documento WO 2011/126808B2.

En una realización, el casete de expresión comprende uno o más potenciadores de expresión. En una realización, el casete de expresión contiene dos o más potenciadores de expresión. Estos potenciadores pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por ejemplo, un potenciador puede incluir un potenciador Alfa mic/bik. Este potenciador puede estar presente en dos copias que se encuentran adyacentes entre sí. Como alternativa, las copias dobles del potenciador pueden estar separadas por una o más secuencias. En otra realización más, el casete de expresión contiene además un intrón, por ejemplo, el intrón Promega. Otros intrones adecuados incluyen aquellos conocidas en la técnica, por ejemplo, tales como se describen en el documento WO 2011/126808.

Además, se proporciona un casete de expresión de la invención con una señal de poliadenilación adecuada. En una realización, la secuencia poli A es una poli A de globulina de conejo. En una realización, la secuencia poli A se caracteriza por la de los nt 3261-3387 de la FIGURA 1. Como alternativa, otra poliA, por ejemplo, una secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana (hGH), una poliA de SV40 o una poliA sintética. Aún otros elementos reguladores convencionales pueden ser adicionales u opcionalmente incluidos en un casete de expresión.

En una realización, el casete de expresión está diseñado por ingeniería en un vector adecuado, por ejemplo, un vector plasmídico que usa técnicas conocidas por aquellos expertos en la materia. Opcionalmente, una composición de la invención puede contener un primer casete de expresión que comprende el gen IDUA humano modificado y un segundo casete de expresión que comprende un gen diferente. En otra realización más, el IDUA humano funcional puede expresarse a partir de más de un casete de expresión, que puede estar ubicado en múltiples vectores, *por ejemplo*, como se describe en el documento WO 2011/126808.

En una realización, el casete de expresión se transporta por el pENN.TBG.hIDUA.nRBG, cuyo plásmido se usa para generar un virus recombinante adenoasociado que lleva el casete de expresión.

Producción de partículas víricas AAV

En una realización, la invención proporciona una partícula de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) que tiene una cápside de AAV y que contiene empaquetada en la misma una repetición terminal invertida 5' (ITR), un gen de la alfa-L-iduronidasa humana (hIDUA) bajo el control de secuencias reguladoras que controlan la expresión del mismo y una ITR 3' de AAV, en donde dicho gen hIDUA tiene una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 (FIGURA 1) o una secuencia al menos aproximadamente el 95 % idéntica a la misma que codifica una alfa-L-iduronidasa humana funcional. Un rAAV particularmente deseable es AAV2/8.TBG.hIDUA.co.

Se conocen métodos para preparar vectores basados en AAV. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Publicada de EE.UU. N.º 2007/0036760 (15 de febrero de 2007). El uso de cápsides de AAV de AAV8 es particularmente adecuado para las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Las secuencias de AAV8 y los métodos para generar vectores basados en la cápside de AAV8 se describen en la Patente de EE.UU. 7.282.199 B2, US 7.790.449 y US 8.318.480. También son adecuadas para su uso en la invención las cápsides de AAV9. Las secuencias de AAV9 y los métodos para generar vectores basados en la cápside de AAV9 se describen en la Patente de EE.UU. 7.906.111. Sin embargo, pueden seleccionarse o generarse otras cápsides de AAV para su uso en la invención. Las secuencias de varios de tales AAV se proporcionan en la Patente de EE.UU. 7.282.199 B2 citada anteriormente, US 7.790.449, US 8.318.480 y la patente de EE.UU. 7.906.111 y/o están disponibles en GenBank. Las secuencias de cualquiera de las cápsides de AAV pueden generarse fácilmente de forma sintética o usando una diversidad de técnicas de biología molecular e ingeniería genética. Las técnicas de producción adecuadas son bien conocidas por aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY). Como alternativa, los oligonucleótidos que codifican péptidos (por ejemplo, CDR) o los péptidos mismos pueden generarse sintéticamente, por ejemplo, por los conocidos métodos de síntesis de péptidos en fase sólida (Merrifield, (1962) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149; Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62). Véase, también, D M McCarty et al, "Self-complementary adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy*, (Agosto de 2001), Vol 8, Número 16, Páginas 1248-1254. Los AAV auto-complementarios se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 6.596.535; 7.125.717; y 7.456.683. Estos y otros métodos de producción adecuados están dentro del conocimiento de aquellos expertos en la materia y no son una limitación de la presente invención.

El virus recombinante adenoasociado (AAV) descrito en el presente documento puede generarse usando técnicas conocidas. Tal método implica cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una cápside de AAV; un gen rep funcional; un casete de expresión compuesto por, como mínimo, repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV y un transgén; y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento del casete de expresión en la proteína de la cápside del AAV.

Los componentes requeridos para cultivarse en la célula hospedadora para empaquetar un casete de expresión de AAV en una cápside de AAV pueden proporcionarse a la célula hospedadora en *trans*. Como alternativa, uno cualquiera o más de los componentes requeridos (por ejemplo, casete de expresión, secuencias *rep*, secuencias *cap* y/o funciones auxiliares) pueden proporcionarse mediante una célula hospedadora estable que se ha diseñado por ingeniería para contener uno o más de los componentes requeridos usando métodos conocidos por aquellos expertos en la materia. Lo más adecuadamente, una célula hospedadora estable tal contendrá el componente o componentes requeridos bajo el control de un promotor inducible. Sin embargo, el componente o componentes requeridos pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo. Se proporcionan en el presente documento ejemplos de promotores inducibles y constitutivos adecuados, en el análisis de elementos reguladores adecuados para su uso con el transgén. En otra alternativa más, una célula hospedadora estable seleccionada puede contener componente o componentes seleccionados bajo el control de un promotor constitutivo y otros componente o componentes seleccionados bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, puede generarse una célula hospedadora estable que deriva de 293 células (que contienen funciones E1 auxiliares bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contiene las proteínas rep y/o cap bajo el control de promotores inducibles. Un experto en la materia puede generar incluso otras células hospedadoras estables.

El casete de expresión, secuencias *rep*, secuencias *cap* y las funciones auxiliares requeridas para producir el rAAV de la invención pueden administrarse a la célula hospedadora de empaquetamiento en forma de cualquier elemento genético que transfiera las secuencias transportadas sobre el mismo. El elemento genético seleccionado puede

administrarse mediante cualquier método adecuado, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Los métodos usados para construir cualquier realización de la presente invención son conocidos por aquellos expertos en la manipulación de ácidos nucleicos e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante y técnicas sintéticas. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. De forma similar, son bien conocidos los métodos para generar viriones de rAAV y la selección de un método adecuado no es una limitación de la presente invención. Véase, por ejemplo, K. Fisher et al, (1993) *J. Virol.*, 70:520-532 y la Patente de EE.UU. N.º 5.478.745.

A menos que se especifique otra cosa, las ITR de AAV y otros componentes de AAV seleccionados descritos en el presente documento, pueden seleccionarse fácilmente de entre cualquier AAV. Estas ITR u otros componentes de AAV pueden aislarse fácilmente usando técnicas disponibles para aquellos expertos en la materia a partir de una secuencia de AAV. Dicho AAV puede aislarse u obtenerse de fuentes académicas, comerciales o públicas (por ejemplo, la American Type Culture Collection, Manassas, VA). Como alternativa, las secuencias de AAV pueden obtenerse a través de medios sintéticos u otros adecuados por referencia a secuencias publicadas tales como las disponibles en la bibliografía o en bases de datos tales como, por ejemplo, GenBank®, PubMed® o similares.

A. El casete de expresión

El casete de expresión es como se define en el presente documento. Además, el casete de expresión y/o un vector como se describe en el presente documento puede contener secuencias transgénicas o reguladoras adicionales. El casete de expresión se empaqueta en una proteína de la cápside y se administra a una célula hospedadora seleccionada.

1. El transgén

La invención puede incluir el uso de múltiples transgenes. Los transgenes adecuados pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la materia. La selección del transgén no se considera ser una limitación de esta invención.

2. Elementos reguladores

Además de los elementos principales identificados anteriormente para el casete de expresión, el vector también incluye elementos de control convencionales que están unidos operativamente al transgén de una manera que permite su transcripción, su traducción y/o su expresión en una célula transfectada con el vector o infectada con el virus producido por la invención. Como se usa en el presente documento, las secuencias "unidas operativamente" incluyen las secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de inicio de la transcripción, de terminación, promotoras y potenciadoras apropiadas; señales de procesamiento del ARN eficientes tales como las señales de corte y empalme y de poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción del producto codificado. Una gran cantidad de secuencias de control de expresión, incluyendo los promotores que son nativos, constitutivos, inducibles y/o específicos de tejido, se conocen en la técnica y pueden utilizarse.

Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral (opcionalmente con el potenciador del RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador del CMV) [véase, por ejemplo, Boshart et al, (1985) *Cell*, 41:521-530], el promotor SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de β -actina, el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK) y el promotor EF1 [Invitrogen]. Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden regularse mediante compuestos suministrados de forma exógena, factores ambientales tales como temperatura o la presencia de un estado fisiológico específico, por ejemplo, fase aguda, un estado de diferenciación concreto de la célula o únicamente en células en replicación. Los promotores inducibles y los sistemas inducibles están disponibles a partir de una diversidad de fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito muchos otros sistemas y un experto en la materia puede seleccionarlos fácilmente. Algunos ejemplos de promotores inducibles regulados por compuestos suministrados de forma exógena, incluyen, el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por zinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de polimerasa T7 [Publicación de Patente Internacional N.º WO 98/10088]; el promotor de ecdisona de insectos [No et al, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351], el sistema reprimible por tetraciclina [Gossen et al, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551], el sistema inducible por tetraciclina [Gossen et al, (1995) *Science*, 268:1766-1769, véase también Harvey et al, (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518], el sistema inducible por RU486 [Wang et al, (1997) *Nat. Biotech.*, 15:239-243 y Wang et al, (1997) *Gene Ther.*, 4:432-441] y el sistema inducible por rapamicina [Magari et al, (1997) *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872], incluyendo, por ejemplo, el sistema Argent™ que está disponible de Ariad. Otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación concreto de la célula o únicamente en células en replicación.

Otra realización del transgén incluye un gen operativamente unido a un promotor específico de tejido. Por ejemplo, si se desea la expresión en el músculo esquelético, debería usarse un promotor activo en el músculo. Estos incluyen los promotores de genes que codifican la β -actina esquelética, la cadena ligera de miosina 2A, la distrofina, la desmina, MHC, la creatina quinasa muscular, así como promotores musculares sintéticos con actividades superiores a los promotores naturales (véase Li et al., (1999) Nat. Biotech., 17:241-245). Los ejemplos de promotores que son específicos de tejido conocidos para el SNC/neuronas incluyen, por ejemplo, el promotor de la enolasa específica de neurona (NSE) (Andersen et al., (1993) Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15), gen de cadena ligera de neurofilamento (Piccioli et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5) y el gen vgf específico de neurona (Piccioli et al., (1995) Neuron, 15:373-84), entre otros. En otra realización, se usará el promotor nativo para el transgén. Puede preferirse el promotor nativo cuando se desea que la expresión del transgén imite la expresión nativa. El promotor nativo puede usarse cuando la expresión del transgén debe regularse temporal o evolutivamente, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En una realización adicional, otros elementos de control de la expresión nativos, tales como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias de consenso de Kozak también pueden usarse para imitar la expresión nativa.

La combinación del transgén, promotor/potenciador e ITR AAV 5' y 3' se denominan un casete de expresión para facilitar su referencia en el presente documento. Proporcionado con las enseñanzas de esta invención, el diseño de un casete de expresión tal puede realizarse recurriendo a técnicas convencionales.

3. Administración del casete de expresión a una célula hospedadora de empaquetamiento AAV

El casete de expresión puede transportarse en cualquier vector adecuado, por ejemplo, un plásmido, que se administra a una célula hospedadora. Los plásmidos útiles en esta invención pueden diseñarse por ingeniería de modo que sean adecuados para la replicación y, opcionalmente, integración en células procariontas, células de mamífero o ambas. Estos plásmidos (u otros vectores que llevan el casete de expresión) contienen secuencias que permiten la replicación del casete de expresión en eucariotas y/o procariontas y marcadores de selección para estos sistemas. Los marcadores seleccionables o genes indicadores pueden incluir secuencias que codifican resistencia a kanamicina, geneticina, higromicina o purimicina, entre otros. Los plásmidos también pueden contener ciertos genes indicadores o marcadores seleccionables que pueden usarse para señalar la presencia del vector en células bacterianas, tales como la resistencia a ampicilina. Otros componentes del plásmido pueden incluir un origen de replicación y un amplicón, tales como el sistema de amplicón que emplea el antígeno nuclear del virus Epstein Barr. Este sistema de amplicón u otros componentes similares de amplicón permiten una alta replicación episómica de copias en las células. Preferentemente, la molécula que lleva el casete de expresión se transfecta en la célula, donde puede existir de forma transitoria. Como alternativa, el casete de expresión puede integrarse de manera estable en el genoma de la célula hospedadora, ya sea cromosómicamente o como un episoma. En determinadas realizaciones, el casete de expresión puede estar presente en múltiples copias, opcionalmente en concatámeros cabeza a cabeza, cabeza a cola o cola a cola. Se conocen técnicas de transfección adecuadas y pueden utilizarse fácilmente para administrar el casete de expresión a la célula hospedadora.

Generalmente, cuando se administra el vector que comprende el casete de expresión por transfección, el vector se administra en una cantidad de aproximadamente 5 μ g a aproximadamente 100 μ g de ADN, de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 50 μ g de ADN a aproximadamente 1×10^4 células a aproximadamente 1×10^{13} células, o aproximadamente 1×10^5 células. Sin embargo, las cantidades relativas de ADN del vector a las células hospedadoras pueden ajustarse, teniendo en cuenta factores tales como el vector seleccionado, el método de administración y las células hospedadoras seleccionadas.

B. Empaquetamiento de células hospedadoras

Además del casete de expresión, la célula hospedadora contiene las secuencias que dirigen la expresión de una proteína de la cápside del AAV de la invención en la célula hospedadora y las secuencias rep de la misma fuente que la fuente de las ITR del AAV encontradas en el casete de expresión o de una fuente de complementación cruzada. La célula hospedadora de empaquetamiento también requiere funciones auxiliares para empaquetar el rAAV de la invención. Dichas funciones auxiliares son bien conocidas en la técnica y no se duplicarán en el presente documento. De forma similar, se conocen métodos para producir vectores adecuados que tienen cápsides de AAV. [Véase, *por ejemplo*, la Solicitud de Patente Publicada de EE.UU. N.º US 2007/0036760].

La construcción de un rAAV que codifica un casete de expresión descrito en el mismo presente documento puede suspenderse en un vehículo fisiológicamente compatible, puede administrarse a un sujeto. En una realización, el vehículo es solución salina estéril sola u, opcionalmente, con cualquiera de una serie de soluciones tamponantes (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Otros vehículos ejemplares incluyen lactosa, sacarosa, fosfato cálcico, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de sésamo y agua. La selección del vehículo no es una limitación de la presente invención.

Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden contener, además de los rAAV y el vehículo o vehículos, otros ingredientes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes o estabilizantes químicos. En una realización, la administración es a través de administración intravenosa. Sin embargo, aún pueden seleccionarse otras

vías de administración. Como alternativa o adicionalmente, las vías de administración pueden combinarse, si se desea.

En una realización, la invención incluye una composición liofilizada que contiene un rAAV como se describe en el presente documento o una mezcla de rAAV, en forma liofilizada. Opcionalmente, uno o más estabilizantes o conservantes están presentes en esta composición. Adecuadamente, para su uso, una composición liofilizada se reconstituye con un diluyente adecuado, por ejemplo, solución salina estéril o una solución salina tamponada.

Las dosificaciones del vector vírico dependerán principalmente de factores tales como la afección a tratar, la edad, el peso y la salud del paciente y, por lo tanto, pueden variar entre los pacientes. Por ejemplo, una dosis terapéuticamente eficaz del vector vírico generalmente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 100 ml, o aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 10 ml, o aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 5 ml, o aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1 ml, de solución que contiene concentraciones de aproximadamente 3×10^9 a 3×10^{13} genomas de vector vírico (partículas)/ml de agente de suspensión acuoso. Otra dosis ejemplar es de aproximadamente 3×10^9 a 3×10^{13} genomas de AAV por 1 kg. Un volumen adecuado es de aproximadamente 1 ml. En otra realización, una dosis terapéuticamente eficaz de la construcción rAAV está en el intervalo de aproximadamente 0,001 ng a aproximadamente 1000 mg/70 kg animal, que puede administrarse en una dosis única o en una serie de dos o más dosis. Pueden determinarse otras dosificaciones adecuadas. La dosificación se ajustará para equilibrar el beneficio terapéutico frente a cualquier efecto secundario y tales dosificaciones pueden variar dependiendo de la aplicación terapéutica para la que se emplea el vector recombinante.

USO MÉDICO

Las composiciones de la presente invención evitan complicaciones de la terapia de reemplazo enzimático relacionadas con la respuesta inmunitaria a la enzima recombinante que puede variar de anafilaxia leve a completa, así como complicaciones del acceso periférico de por vida, tales como infecciones locales y sistémicas. Además, en contraste con ERT, la composición de la invención no requiere inyecciones a largo plazo, semanalmente repetidas. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que el método terapéutico dirigido al hígado descrito en el presente documento es útil para corregir el fenotipo del sistema nervioso central asociado a trastornos de MPSI al proporcionar transferencia génica eficiente, a largo plazo brindada por los vectores con alta eficiencia de transducción, podría proporcionar niveles continuos elevados de IDUA circulante, que proporciona aprovechamiento terapéutico a través de la barrera hematoencefálica. Además, La transferencia de genes hepáticos de AAV puede proporcionar tolerancia activa y prevenir la formación de anticuerpos contra la enzima.

Se proporciona un casete de expresión de hIDUA modificado para su uso en el tratamiento de mucopolisacaridosis de tipo I que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un casete de expresión de hIDUA modificado como se describe en el presente documento. También se describe un método para tratar y/o mejorar los síntomas de síndromes de Hurler, de Hurler-Scheie y de Scheie.

En una realización, el rAAV se administra por vía intravenosa.

En otra realización, el rAAV se administra en una cantidad de aproximadamente 3×10^9 a aproximadamente 3×10^{12} se administra al sujeto. Aunque se prevé que una sola administración de rAAV sea eficaz, dado que el hígado es un órgano regenerativo, la administración puede repetirse (por ejemplo, trimestralmente, bianualmente, anualmente, o según sea de otra manera necesario. Opcionalmente, puede administrarse una dosis inicial de una cantidad terapéuticamente eficaz en sesiones de infusión divididas, teniendo en cuenta la edad y la capacidad del sujeto para tolerar infusiones. Sin embargo, no se requieren inyecciones semanales repetidas de una dosis terapéutica completa, proporcionando una ventaja al paciente en términos de comodidad y resultado terapéutico.

Los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no son una limitación de la invención descrita en el presente documento.

Ejemplo 1 - Producción de transgén y vector

Se sintetizó una secuencia de nucleótidos modificada que codifica una alfa-L-iduronidasa humana funcional. La secuencia resultante es particularmente adecuada para la expresión humana y tiene menos de aproximadamente el 90 % de identidad con el gen IDUA humano funcional (hIDUA; Genbank NP000194.2). El transgén resultante se insertó después en un plásmido que contiene los elementos cis necesarios para el empaquetamiento en un vector AAV disponible de UPenn Vector Core usando sitios *MluI* y *Sall* de ingeniería genética. La expresión génica se dirigió por la globulina de unión a tiroideas humana (TBG, Hayashi Y, Mori Y, Janssen OE, et al. Human thyroxine-binding globulin gene: complete sequence and transcriptional regulation. Mol Endocrinol 1993; 7: 1049-1060]. El plásmido resultante, mostrado en la Figura 2, pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.RGB contiene el gen hIDUA modificado bajo el control de secuencias de control de la expresión, incluyendo el promotor TBG específico del hígado. El plásmido contiene además la ITR 5' AAV2, repeticiones en tándem de los potenciadores alfa mic/bic, el promotor TBG, una secuencia de intrones de Promega, el gen IDUA humano modificado de SEQ ID NO: 1, una poli A de globulina de conejo y una ITR AAV2 - 3'.

Las preparaciones de vectores a gran escala se realizaron esencialmente como describen Lock et al. [Rapid, simple,

and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. Hum Gene Ther 21(10): 1259-1271. (2010)]. Las transfecciones basadas en PEI se realizaron en pilas de células de 10 capas que contenían el 75 % de monocapas confluentes de células HEK293. Se clarificaron 10 l de medio de cultivo de materia prima de las pilas de células y luego se concentraron por filtración de flujo tangencial. La materia prima clarificada concentrada se purificó sobre gradientes de yodixanol (Optiprep; Sigma Chemical Co., St Louis, MO). Todas las fracciones directamente debajo de una banda de proteína contaminante visible se recogieron y agruparon. Las fracciones agrupadas se diafiltraron contra PBS/NaCl 35 mM y concentrado utilizando concentradores de giro Amicon Ultra 15 (Millipore). Se añadió glicerol al producto concentrado diafiltrado hasta un 5 % final y la preparación se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C. Los vectores resultantes se denominan en el presente documento AAV8.TBG.hIDUA o AAV2/8.TBG.hIDUA. En determinadas ubicaciones, las partículas de AAV recombinantes se denominan AAV8.TBG.hIDUAco o AAV2/8.TBG.hIDUAco. El plásmido contiene además la ITR 5' AAV2, repeticiones en tándem de los potenciadores alfa mic/bic, el promotor TBG, una secuencia de intrones de Promega, el gen IDUA humano modificado de SEQ ID NO: 1, una poli A de globulina de conejo y una ITR AAV2 - 3'.

Ejemplo 2 -

A. Ensayos basados en células

Las células HEK 293 se mantuvieron en medio de crecimiento que contenía Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco®, Life Technologies™) con suero bovino fetal al 5 % (FBS; XXX), 1 % de penicilina/estreptomicina (p/s; Life Technologies™). Las transfecciones de ADN plasmídico se llevaron a cabo usando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™, Life Technologies™) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, las células se colocaron en placas a una densidad de 5×10^5 células/pocillo en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos en medio de transfección (DMEM + 5 % de FBS, sin p/s) y se dejó adherir durante la noche a 37 °C en 5 % de CO₂. Al día siguiente, las células se verificaron para una confluencia del 90-95 % y los medios se renovaron. El ADN plasmídico y Lipofectamine™ 2000 se diluyeron con medio de suero reducido Opti-MEM I® (sin suero) para una relación final de 1:2,5 (ADN: Lipofectamine™ 2000). La solución de transfección Lipofectamine™ 2000 se incubó durante cinco minutos a 22 °C antes de mezclarla con la solución de ADN. Esta mezcla final de transfección que contiene la solución de ADN: Lipofectamine™ 2000 se incubó más durante 20 minutos (22 °C) antes de la adición a los pocillos que contenían células y medios. Las células simuladas no recibieron ADN plasmídico y se utilizó un plásmido que codifica para eGFP como control de transfección. Se transfectaron tres pocillos para cada construcción probada. Las células se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂; los medios fueron reemplazados por medios de crecimiento cuatro horas después. El contenido de cada pocillo se cosechó 72 horas más tarde y se recogió a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Las células se resuspendieron en 100 µl/pocillo de tampón de lisis (0,2 % Triton X-100, 0,9 % NaCl, pH 4,0) y se congelaron/descongelaron tres veces con agitación vorticial. Además, los lisados se trataron con benzonasa durante 30 minutos a 37 °C antes de la congelación/descongelación final. Los restos celulares se sedimentaron a 10 000 rpm (4 °C) durante 10 minutos y los lisados celulares clarificados finales se colocaron en hielo y se analizaron inmediatamente para determinar la actividad enzimática.

B. Lisis de tejidos y extracción de proteínas

Los tejidos congelados se semi-descongelaron en una caja sobre una cama de hielo seco y se cortaron pequeños trozos de tejido húmedo (~20 mg, ~10 mg de bazo) en una pequeña placa de Petri. Los tejidos pre-procesados se sumergieron en un Eppendorf de 2 ml con 1 ml de tampón de lisis (0,2 % Triton X-100, 0,9 % NaCl, pH 4,0) y una perla de acero de 5 mm. Las muestras se homogeneizaron en un tisularizador a 30 Hz durante 2 minutos. Las muestras homogeneizadas se centrifugaron brevemente a 6000 rpm durante 30 segundos y se retiraron las perlas de acero de 5 mm. Los lisados tisulares se interrumpieron aún más sometiendo a ultrasonidos usando un microhorn de 1-1/16" de diámetro y se congelaron durante la noche a -80 °C. Las muestras procesadas se descongelaron al día siguiente a 22 °C y se clarificaron por centrifugación (10 000 rpm/10 minutos/4 °C). Las capas de lípidos flotantes del cerebro u otros tejidos grasos, se aspiraron antes del ensayo. Las muestras se almacenaron en hielo húmedo y se ensayaron inmediatamente para determinar la actividad enzimática.

C. Estimación de proteínas

La proteína total se estimó utilizando el ensayo de Bradford basado en Coomassie (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, se configuró una curva patrón usando albúmina de suero bovino (BSA) para generar un intervalo de trabajo de 1-25 µg/ml y un blanco que representa el tampón de dilución de proteína sin BSA. Las muestras se diluyeron dos veces de 1/300 -1/1200 y se mezclaron en una proporción 1:1 de proteína diluida: Reactivo Bradford en una placa de fondo plano de 96 pocillos. Se permitió que las muestras se equilibraran a 22 °C durante 15 minutos y se recogieron los valores de absorbancia en un lector de placas a la longitud de onda sugerida de 595 nm. Los valores brutos se convirtieron en concentraciones de µg/ml utilizando la curva patrón con corrección del blanco. Las cantidades de microgramos después se convirtieron y se informaron en miligramos.

D. Ensayos de actividad enzimática

La actividad de la enzima IDUA se ensayó usando ácido 4-metilumbeliferil alfa-L-idopranosidurónico, Sal de ciclohexilamonio (4-MU-Ildo; Toronto Research Chemicals, Inc.) como sustrato de acuerdo con métodos publicados previamente [Kakkis et al, Mol Genet Metab, marzo de 2001; 72(3): 199-208]. En resumen, 5-15 μ l de lisados, o suero, se llevaron hasta 100 μ l con agua doblemente destilada (ddH₂O) y 100 μ l de sustrato 4-MU-Ildo 100 μ M, diluido con tampón de reacción (acetato sódico 0,1 M, pH 3,5, NaCl 0,15 M, 0,05 % de Triton X-100) se combinó en una cubeta de metilacrilato (Thermo Scientific). Las reacciones se incubaron durante 1-3 horas en un baño de agua a 37 °C y terminaron con la adición de un tampón de parada 1x (glicina 290 mM, carbonato sódico 180 mM, pH 10,5). Los productos se leyeron en un QuantiFluor™-ST (Promega) a través del canal UV (Ex 365 nm, Em 440 - 470 nm). Los valores de fluorescencia en bruto se registraron y se convirtieron a nmol/ml/h usando una curva patrón de cantidades conocidas de 4-Metilumbeliferona (M-5410; Biosynth®). Los lisados de células y tejidos se normalizaron a valores de proteína estimados (nmol/mg/h; véase la sección de métodos titulada "estimación de proteínas").

E. Extracción de ADN y análisis de copia genómica

Se usó PCR Taqman para determinar la carga de ADN del vector en células diploides. Para la detección y cuantificación de genomas de vectores por PCR en tiempo real, el ADN celular total se extrajo de los tejidos usando un Mini Kit de ADN QIAamp (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). Los conjuntos de cebadores y sondas se diseñaron para dirigirse a la región nRBG poliA del vector, usando las siguientes secuencias; directa: GCCAAAAATTATGGGGACAT, inversa: ATTCCAACACACTATTGCAATG, sonda: 6FAM-ATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCT-TAMRA. Las curvas patrón para la cuantificación del genoma del vector se establecieron con los plásmidos cis usados para la producción del vector correspondiente. La PCR se realizó con una mezcla maestra universal de PCR TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) con 200 ng de ADN celular total como molde, cebadores 300 nM y sondas 200 nM cada uno. Los ciclos fueron durante 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C.

F. Inmunotransferencia

La inmunotransferencia se realizó de acuerdo con métodos convencionales. En resumen, se usó el sistema de gel NuPAGE (Life Technologies), geles bis-tris 4-12 %. La transferencia fue después de 30 minutos a 20V a una membrana de PVDF. El bloque fue 10 % de NFDm en T-PBS (durante la noche). El MAb primario fue IDUA anti-humano de ratón 1:300 (1,5 horas); 1 % de NFDm en T-PBS. Secundario: Conejo anti-ratón unido a HRP 1:3000 (1 h); 1 % de NFDm en la detección de T-PBS fue por el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura (Thermo Scientific), 30 segundos de exposición en película de rayos X.

Ejemplo 3 - Estudios *in vivo* en ratones y perros

Pueden encontrarse deficiencias de IDUA en perros, permitiendo el estudio de la enfermedad y las terapias en un animal grande. Los perros MPS I portan una mutación recesiva (nula) en el gen IDUA, en donde una mutación G>A en el sitio de corte y empalme del donador del intrón 1 crea un codón de terminación prematuro en la unión exón-intrón [Menon, K.P., P.T. Tieu y E.F. Neufeld, Architecture of the canine IDUA gene and mutation underlying canine mucopolysaccharidosis I. Genomics, 1992. 14(3): p. 763-8.]. El curso de la enfermedad en el perro es análogo al síndrome de Hurler-Scheie; las manifestaciones de la enfermedad incluyen enfermedad esquelética significativa, incluyendo deformidad en el pecho.

El análisis de GAG en orina es un marcador bioquímico usado para determinar la efectividad de los tratamientos para MPS I en el entorno clínico.

La acumulación de glucosaminoglucanos (GAG) se evaluó en los órganos principales mediante tinción con azul de Alcian (pH 1) de secciones de parafina. La acumulación de GAG sin procesar dentro de las células se visualiza particularmente bien en secciones delgadas de 1 μ m de tejidos embebidos en plástico teñidos con azul de toluidina. Secciones delgadas (1 μ m) de tejidos embebidos en epon, teñido con azul de toluidina. Esto muestra células que contienen material de almacenamiento ("células espumosas, de esponja").

La inmunohistoquímica se realizó con anticuerpo contra gangliósido GM3 en el cerebro. Muestra almacenamiento anormal de GM3 en neuronas. La corteza se evaluó en perros y la corteza e hipotálamo en ratones. La expresión de IDUA humana en el hígado se evaluó por inmunofluorescencia.

A. Estudios con ratones

Se preparó hIDUA modificado con AAV8.TBG como se describe en el Ejemplo 1. Los ratones (aproximadamente 3 meses) se inyectaron por vía intravenosa a dosis de aproximadamente 1 x 10¹¹ GC, 3 x 10¹⁰ GC, 3 x 10⁹ GC, 1 x 10⁹ GC y se evaluaron ~ 2 semanas después de la inyección.

Los resultados mostraron una ausencia disminuida o completa de tinción de GAG en los animales a los que se les administró 1 x 10¹¹, 3 x 10¹⁰ y 3 x 10⁹. En estos animales, se observó una disminución o ausencia total de lesiones de almacenamiento en secciones delgadas.

En los animales dosificados a 1×10^9 , el almacenamiento de GAG se ve más o menos como en ratones no tratados y las lesiones de almacenamiento se ven más o menos como en ratones no tratados

5 Para almacenamiento de GM3, solo se evaluaron los animales dosificados en 1×10^{11} GC y 3×10^{10} GC, y se observó una mejora muy débil en el almacenamiento de GM3 en las neuronas.

Se observó una fuerte expresión (100 % de hepatocitos) de IDUA en animales dosificados a 1×10^{11} GC. Esto cae con dosis más bajas, con muy pocos hepatocitos positivos visibles a 1×10^9 GC.

10 *B. Estudios caninos*

Se preparó hIDUA modificado con AAV8.TBG como se describe en el Ejemplo 1. Los perros (de aproximadamente 8 meses de edad) fueron inyectados por vía intravenosa a una dosis de 1×10^{11} GC y evaluados después de cuatro meses después de la inyección (es decir, 1 año de edad).

15 Este estudio muestra la reversión de las lesiones de almacenamiento. Más particularmente, el aclaramiento prácticamente completo del almacenamiento de GAG en todos los órganos principales se observa mediante la tinción de azul Alcian. No se observan lesiones de almacenamiento en secciones delgadas de corazón, riñón o hígado. Se observa una reducción o eliminación completa de la acumulación de GM3 en las neuronas. La expresión de IDUA en el hígado se observa por inmunofluorescencia en > 95 % de los hepatocitos.

Ejemplo 4 - Tratamiento de Hurler-Scheie con AAV2/8.TBG.hIDUA

25 La transferencia de genes mediada por AAV8 de IDUA se evaluará en pacientes con Hurler-Scheie. Los sujetos recibirían una única infusión de vector en una vena periférica que, según los datos preclínicos, debería conducir a una producción estable de la enzima a niveles cercanos a los obtenidos en sujetos normales. El ensayo puede implicar diferentes dosis de vector, por ejemplo, 3×10^{11} GC/kg; 1×10^{12} GC/kg; 3×10^{12} GC/kg y por favor añadir el intervalo de dosis. La evaluación más no invasiva de la efectividad es el nivel de GAG en orina que están elevados en la enfermedad y parcialmente corregidos después de la ERT. El injerto transgénico y su nivel de expresión se 30 determinarán midiendo IDUA en suero. Los GAG en orina también se medirán antes y después de la terapia génica.

(Texto independiente de listado de secuencias)

35 La siguiente información se proporciona para secuencias que contienen texto independiente de secuencias con el identificador numérico <223>.

SEQ ID NO: (que contiene texto independiente)	Texto independiente bajo <223>
SEQ ID NO: 3	<220> <221> región de repetición _<222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> potenciador <222> (221)..(320) <223> Alfa mic/bik <220> <221> potenciador <222> (327)..(426) <223> Alfa mic/bik <220> <221> promotor <222> (442)..(901) <223> promotor TBG <220> <221> señal TATA <222> (885)..(888)

(continuación)

SEQ ID NO: (que contiene texto independiente)	Texto independiente bajo <223>
	<220> <221> Intrón <222> (1027)..(1159) <223> intrón 1 <220> <221> CDS <222> (1251)..(3212) <223> alfa-L-IDUE humana <220> <221> señal poliA _ <222> (3261)..(3387) <220> <221> región de repetición <222> (3476)..(3605) <223> 3' ITR (ubicada en el complemento) <220> <221> origen de rep <222> (3782)..(4220) <223> f1\ori (ubicado en el complemento) <220> <221> origen de rep <222> (4249)..(4891) <223> pUC\origen de replicación <220> <221> misc_feature <222> (5566)..(6381) <223> resistencia a kanamicina ubicada en la cadena complementaria

Una lista de secuencias marcada "Z6622PCT_ST25.txt" se archiva en este documento en forma electrónica. Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de entendimiento, será evidente para los expertos en la materia, a la luz de las enseñanzas de la presente invención, que pueden hacerse determinados cambios y modificaciones de la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Los Fideicomisarios de la Universidad de Pensilvania
- <120> Composiciones y métodos para tratar MPS1
- <130> UPN-Z6622
- 15 <150> 61/788724
- <151> 15/03/2013
- <160> 17
- 20 <170> PatentIn versión 3,5
- <210> 1
- <211> 1971
- 25 <212> ADN
- <213> humano
- <220>
- <221> CDS

ES 2 805 355 T3

<222> (1)..(1971)

<400> 1

atg cgg ccc ctg agg cct aga gct gct ctg ctg gca ctg ctg gcc agt	48
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser	
1 5 10 15	
ctg ctg gct gcc cct cct gtg gcc cct gcc gaa gcc cct cac ctg gtg	96
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val	
20 25 30	
cat gtg gat gcc gcc aga gcc ctg tgg cct ctg cgg aga ttc tgg cgg	144
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg	
35 40 45	
agc acc ggc ttt tgc ccc cca ctg cct cac agc cag gcc gac cag tac	192
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr	
50 55 60	
gtg ctg agc tgg gac cag cag ctg aac ctg gcc tac gtg ggc gcc gtg	240
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val	
65 70 75 80	
ccc cac aga ggc atc aaa cag gtg aga acc cac tgg ctg ctg gaa ctg	288
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu	
85 90 95	
gtg aca acc cgg ggc tcc acc ggc aga ggc ctg agc tac aac ttc acc	336
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr	
100 105 110	
cac ctg gac ggc tac ctg gac ctg ctg aga gag aac cag ctg ctg ccc	384
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro	
115 120 125	
ggc ttc gag ctg atg ggc agc gcc agc ggc cac ttc acc gac ttc gag	432
Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu	
130 135 140	
gac aag cag caa gtc ttt gag tgg aag gac ctg gtg tcc agc ctg gcc	480

ES 2 805 355 T3

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

ES 2 805 355 T3

ctg tgg gcc gaa gtg tcc cag gcc ggc acc gtg ctg gac agc aat cat	1248
Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His	
405 410 415	
aca gtg ggc gtg ctg gcc tcc gcc cac aga cct cag gga ccc gcc gat	1296
Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp	
420 425 430	
gct tgg cgg gct gcc gtg ctg atc tac gcc agc gac gat acc aga gcc	1344
Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala	
435 440 445	
cac ccc aac aga tcc gtg gcc gtg acc ctg cgg ctg aga ggc gtg cca	1392
His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro	
450 455 460	
cca ggc cct gga ctg gtg tac gtg acc aga tac ctg gac aac ggc ctg	1440
Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu	
465 470 475 480	
tgc agc ccc gac ggc gaa tgg cgc aga ctg ggc aga cct gtg ttc ccc	1488
Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro	
485 490 495	
acc gcc gag cag ttc cgg cgg atg aga gcc gct gag gat cct gtg gct	1536
Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala	
500 505 510	
gct gcc cct aga cct ctg cct gct ggc ggc aga ctg acc ctg agg ccc	1584
Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro	
515 520 525	
gct ctg aga ctg cct agt ctg ctg ctg gtg cac gtg tgc gcc agg ccc	1632
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro	
530 535 540	
gag aag cct ccc ggc cag gtg aca aga ctg aga gcc ctg ccc ctg acc	1680
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr	
545 550 555 560	
cag ggc cag ctg gtg ctg gtg tgg tcc gat gag cac gtg ggc agc aag	1728
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys	
565 570 575	
tgc ctg tgg acc tac gag atc cag ttc agc cag gac ggc aag gcc tac	1776
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr	
580 585 590	
acc ccc gtg tcc cgg aag ccc agc acc ttc aac ctg ttc gtg ttc agc	1824
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser	
595 600 605	
ccc gat aca ggc gcc gtg tcc ggc tct tat aga gtg cgg gcc ctg gac	1872
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp	
610 615 620	
tac tgg gcc aga ccc ggc cct ttc agc gac ccc gtg ccc tac ctg gaa	1920
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu	
625 630 635 640	
gtg ccc gtg cct aga ggc ccc cct agc ccc ggc aac cct tga gtc gac	1968
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro Val Asp	
645 650 655	
ccg	1971
Pro	

ES 2 805 355 T3

<210> 2
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> humano

5

<400> 2

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205

ES 2 805 355 T3

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

ES 2 805 355 T3

450		455		460											
Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Tyr	Val	Thr	Arg	Tyr	Leu	Asp	Asn	Gly	Leu
465					470					475					480
Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Glu	Trp	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Pro	Val	Phe	Pro
				485					490					495	
Thr	Ala	Glu	Gln	Phe	Arg	Arg	Met	Arg	Ala	Ala	Glu	Asp	Pro	Val	Ala
			500					505					510		
Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Arg	Pro
		515					520					525			
Ala	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	His	Val	Cys	Ala	Arg	Pro
	530					535					540				
Glu	Lys	Pro	Pro	Gly	Gln	Val	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr
545					550					555					560
Gln	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Val	Trp	Ser	Asp	Glu	His	Val	Gly	Ser	Lys
				565					570					575	
Cys	Leu	Trp	Thr	Tyr	Glu	Ile	Gln	Phe	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Ala	Tyr
			580					585					590		
Thr	Pro	Val	Ser	Arg	Lys	Pro	Ser	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Val	Phe	Ser
		595					600					605			
Pro	Asp	Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Gly	Ser	Tyr	Arg	Val	Arg	Ala	Leu	Asp
	610					615					620				
Tyr	Trp	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	Pro	Val	Pro	Tyr	Leu	Glu
625					630					635					640
Val	Pro	Val	Pro	Arg	Gly	Pro	Pro	Ser	Pro	Gly	Asn	Pro			
				645					650						

<210> 3
 <211> 6863
 5 <212> ADN
 <213> plásmido que lleva hIDUA

<220>
 <221> región de repetición
 10 <222> (1)..(130)
 <223> 5' ITR

<220>
 <221> potenciador

ES 2 805 355 T3

<222> (221)..(320)
 <223> Alfa mic/bik

 <220>
 5 <221> potenciador
 <222> (327)..(426)
 <223> Alfa mic/bik

 <220>
 10 <221> promotor
 <222> (442)..(901)
 <223> promotor TBG

 <220>
 15 <221> señal TATA
 <222> (885)..(888)

 <220>
 20 <221> Intrón
 <222> (1027)..(1159)
 <223> intrón 1

 <220>
 25 <221> CDS
 <222> (1251)..(3212)
 <223> alfa-L-IDUE humana

 <220>
 30 <221> señal poli(A)
 <222> (3261)..(3387)

 <220>
 35 <221> región de repetición
 <222> (3476)..(3605)
 <223> 3' ITR (ubicada en el complemento)

 <220>
 40 <221> origen de rep
 <222> (3782)..(4220)
 <223> f1\ori (ubicado en el complemento)

 <220>
 45 <221> origen de rep
 <222> (4249)..(4891)
 <223> pUC\origen de replicación\

 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (5566)..(6381)
 <223> resistencia a kanamicina ubicada en la cadena complementaria

 <400> 3

 ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctcg ggcgaccttt 60
 ggtcgccccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
 aggggttctt tgtagttaat gattaaccgc ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg 180
 atcctctaga actatagcta gaattcgccc ttaagctagc aggtaattt ttaaaaagca 240
 gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggtaataaat 300

ES 2 805 355 T3

ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa aaagcagtca aaagtccaag	360
tggcccttgg cagcatttac tctctctggt tgctctgggt aataatctca ggagcacaaa	420
cattccagat cggcgcgcc agggctggaa gctaccttg acatcatttc ctctgcgaat	480
gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc ttttgtacaa	540
ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttgcc caatagttag aactttttcc	600
tgctgcctct tgggtctttt gcctatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactcttgcc	660
agcatggact taaaccctc cagctctgac aatcctcttt ctcttttgtt ttacatgaag	720
ggctctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta tcattttttg ctttgttcct	780
cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc ccagggttaa tgctggggtt	840
aatttataac taagagtgct ctagttttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaaga	900
tgttgctttc tgagagacag ctttattgcg gtagtttatc acagttaa at tgctaacgca	960
gtcagtgtt ctgacacaac agtctogaac ttaagctgca gaagttggc gtgaggcact	1020
gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg	1080
tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcacctt ttggtcttac tgacatccac	1140
tttgctttc tctccacagg tgcactcc cagttcaatt acagctctta aggctagagt	1200
acttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtgccacc atg cgg	1256
	Met Arg
	1
ccc ctg agg cct aga gct gct ctg ctg gca ctg ctg gcc agt ctg ctg	1304
Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Leu	
	5 10 15
gct gcc cct cct gtg gcc cct gcc gaa gcc cct cac ctg gtg cat gtg	1352
Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val His Val	
	20 25 30
gat gcc gcc aga gcc ctg tgg cct ctg cgg aga ttc tgg cgg agc acc	1400
Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg Ser Thr	
	35 40 45 50
ggc ttt tgc ccc cca ctg cct cac agc cag gcc gac cag tac gtg ctg	1448
Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr Val Leu	
	55 60 65
agc tgg gac cag cag ctg aac ctg gcc tac gtg ggc gcc gtg ccc cac	1496
Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val Pro His	
	70 75 80
aga ggc atc aaa cag gtg aga acc cac tgg ctg ctg gaa ctg gtg aca	1544
Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu Val Thr	
	85 90 95
acc cgg ggc tcc acc ggc aga ggc ctg agc tac aac ttc acc cac ctg	1592
Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr His Leu	
	100 105 110
gac ggc tac ctg gac ctg ctg aga gag aac cag ctg ctg ccc ggc ttc	1640

ES 2 805 355 T3

Asp 115	Gly	Tyr	Leu	Asp	Leu 120	Leu	Arg	Glu	Asn	Gln 125	Leu	Leu	Pro	Gly	Phe 130	
gag	ctg	atg	ggc	agc	gcc	agc	ggc	cac	ttc	acc	gac	ttc	gag	gac	aag	1688
Glu	Leu	Met	Gly	Ser	Ala 135	Ser	Gly	His	Phe 140	Thr	Asp	Phe	Glu	Asp	Lys 145	
cag	caa	gtc	ttt	gag	tgg	aag	gac	ctg	gtg	tcc	agc	ctg	gcc	aga	cgg	1736
Gln	Gln	Val	Phe 150	Glu	Trp	Lys	Asp 155	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Ala	Arg	Arg 160	
tac	atc	ggc	aga	tac	gga	ctg	gcc	cac	gtg	tcc	aag	tgg	aac	ttc	gag	1784
Tyr	Ile	Gly 165	Arg	Tyr	Gly	Leu 170	Ala	His	Val	Ser	Lys 175	Trp	Asn	Phe	Glu	
aca	tgg	aac	gag	ccc	gac	cac	cac	gac	ttc	gac	aac	gtg	tca	atg	acc	1832
Thr	Trp 180	Asn	Glu	Pro	Asp 185	His	His	Asp	Phe	Asp	Asn 190	Val	Ser	Met	Thr	
atg	cag	ggc	ttt	ctg	aac	tac	tac	gac	gcc	tgc	tcc	gag	ggc	ctg	aga	1880
Met	Gln	Gly	Phe	Leu	Asn 200	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Cys 205	Ser	Glu	Gly	Leu	Arg 210	
195																
gcc	gcc	agt	cct	gcc	ctg	aga	ctg	ggc	gga	ccc	ggc	gat	agc	ttc	cac	1928
Ala	Ala	Ser	Pro 215	Ala	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly 220	Pro	Gly	Asp	Ser	Phe	His 225	
acc	ccc	ccc	aga	agc	ccc	ctg	agc	tgg	ggc	ctg	ctg	aga	cac	tgc	cac	1976
Thr	Pro	Pro	Arg 230	Ser	Pro	Leu	Ser	Trp 235	Gly	Leu	Leu	Arg	His	Cys	His 240	
gac	ggc	acc	aat	ttc	ttc	acc	ggc	gag	gcc	ggc	gtg	cgg	ctg	gac	tac	2024
Asp	Gly	Thr 245	Asn	Phe	Phe	Thr	Gly 250	Glu	Ala	Gly	Val	Arg 255	Leu	Asp	Tyr	
atc	agc	ctg	cac	cgg	aag	ggc	gcc	aga	agc	agc	atc	agc	atc	ctg	gaa	2072
Ile	Ser 260	Leu	His	Arg	Lys 265	Gly	Ala	Arg	Ser	Ser	Ile 270	Ser	Ile	Leu	Glu	
cag	gaa	aag	gtc	gtc	gcc	cag	cag	atc	cgg	cag	ctg	ttc	ccc	aag	ttc	2120
Gln	Glu	Lys	Val	Val	Ala 280	Gln	Gln	Ile	Arg	Gln	Leu	Phe	Pro	Lys	Phe 290	
275																
gcc	gac	acc	ccc	atc	tac	aac	gac	gag	gcc	gac	ccc	ctg	gtg	gga	tgg	2168
Ala	Asp	Thr	Pro 295	Ile	Tyr	Asn	Asp	Glu	Ala 300	Asp	Pro	Leu	Val	Gly	Trp 305	
tca	ctg	cct	cag	cct	tgg	aga	gcc	gac	gtg	acc	tac	gcc	gct	atg	gtg	2216
Ser	Leu	Pro	Gln 310	Pro	Trp	Arg	Ala	Asp 315	Val	Thr	Tyr	Ala	Ala	Met	Val 320	
gtg	aaa	gtg	atc	gcc	cag	cat	cag	aac	ctg	ctg	ctg	gcc	aac	acc	acc	2264
Val	Lys 325	Val	Ile	Ala	Gln	His	Gln	Asn 330	Leu	Leu	Leu	Ala	Asn	Thr	Thr 335	
agc	gcc	ttc	cct	tac	gcc	ctg	ctg	agc	aac	gac	aac	gcc	ttc	ctg	agc	2312
Ser	Ala 340	Phe	Pro	Tyr	Ala 345	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	Asn 350	Ala	Phe	Leu	Ser	
tac	cac	ccc	cac	ccc	ttc	gcc	cag	aga	acc	ctg	acc	gcc	cgg	ttc	cag	2360
Tyr	His 355	Pro	His	Pro	Phe 360	Ala	Gln	Arg	Thr	Leu 365	Thr	Ala	Arg	Phe	Gln 370	

ES 2 805 355 T3

gtg aac aac acc aga ccc ccc cac gtg cag ctg ctg aga aag ccc gtg	2408
Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys Pro Val	
375 380 385	
ctg acc gct atg gga ctg ctg gct ctg ctg gac gag gaa cag ctg tgg	2456
Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln Leu Trp	
390 395 400	
gcc gaa gtg tcc cag gcc ggc acc gtg ctg gac agc aat cat aca gtg	2504
Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His Thr Val	
405 410 415	
ggc gtg ctg gcc tcc gcc cac aga cct cag gga ccc gcc gat gct tgg	2552
Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp Ala Trp	
420 425 430	
cgg gct gcc gtg ctg atc tac gcc agc gac gat acc aga gcc cac ccc	2600
Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala His Pro	
435 440 445 450	
aac aga tcc gtg gcc gtg acc ctg cgg ctg aga ggc gtg cca cca ggc	2648
Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro Pro Gly	
455 460 465	
cct gga ctg gtg tac gtg acc aga tac ctg gac aac ggc ctg tgc agc	2696
Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu Cys Ser	
470 475 480	
ccc gac ggc gaa tgg cgc aga ctg ggc aga cct gtg ttc ccc acc gcc	2744
Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro Thr Ala	
485 490 495	
gag cag ttc cgg cgg atg aga gcc gct gag gat cct gtg gct gct gcc	2792
Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala Ala Ala	
500 505 510	
cct aga cct ctg cct gct ggc ggc aga ctg acc ctg agg ccc gct ctg	2840
Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro Ala Leu	
515 520 525 530	
aga ctg cct agt ctg ctg ctg gtg cac gtg tgc gcc agg ccc gag aag	2888
Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro Glu Lys	
535 540 545	
cct ccc ggc cag gtg aca aga ctg aga gcc ctg ccc ctg acc cag ggc	2936
Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr Gln Gly	
550 555 560	
cag ctg gtg ctg gtg tgg tcc gat gag cac gtg ggc agc aag tgc ctg	2984
Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys Cys Leu	
565 570 575	
tgg acc tac gag atc cag ttc agc cag gac ggc aag gcc tac acc ccc	3032
Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr Thr Pro	
580 585 590	
gtg tcc cgg aag ccc agc acc ttc aac ctg ttc gtg ttc agc ccc gat	3080
Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser Pro Asp	
595 600 605 610	
aca ggc gcc gtg tcc ggc tct tat aga gtg cgg gcc ctg gac tac tgg	3128
Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp Tyr Trp	
615 620 625	

ES 2 805 355 T3

gcc aga ccc ggc cct ttc agc gac ccc gtg ccc tac ctg gaa gtg ccc	3176
Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu Val Pro	
630 635 640	
gtg cct aga ggc ccc cct agc ccc ggc aac cct tga gtcgacccgg	3222
Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro	
645 650	
gcggcctcga ggacgggggtg aactacgcct gaggatccga tctttttccc tctgcaaaaa	3282
attatgggga catcatgaag ccccttgagc atctgacttc tggctaataa aggaaattta	3342
ttttcattgc aatagtgtgt tggaattttt tgtgtctctc actcggaagc aattcgttga	3402
tctgaatttc gaccacccat aatacccatt accctggtag ataagtagca tggcgggtta	3462
atcattaact acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc	3522
tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgcgcc cgggctttgc ccgggcggcc	3582
tcagtgagcg agcgcgagcg cagccttaat taacctaat cactggccgt cgttttacia	3642
cgctcgact gggaaaacc tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatccccct	3702
ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc	3762
agcctgaatg gcgaatggga cgcgccctgt agcggcgcac taagcgcggc ggggtgtggtg	3822
gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccttag cgcgccctcc tttcgctttc	3882
ttcccttctt ttctcgccac gtctcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc	3942
cctttagggt tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt	4002
gatggttcac gtagtgggccc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag	4062
tccacgttct ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caaactcaa ccctatctcg	4122
gtctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag	4182
ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatca tgtgagcaaa aggccagcaa	4242
aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct	4302
gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa	4362
agataccagg cgtttcccc tggaaagctcc ctctgtgcgt ctctgttcc gaccctgccg	4422
cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca	4482
cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa	4542
cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg	4602
gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg	4662
tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaaga	4722
acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc	4782
tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgttg caagcagcag	4842

ES 2 805 355 T3

attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac 4902
 gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggca tgagattatc aaaaaggatc 4962
 ttcacctaga tccttttgat cctccggcgt tcagcctgtg ccacagccga caggatgggtg 5022
 accaccattt gccccatatc accgtcggta ctgatcccgt cgtcaataaa ccgaaccgct 5082
 acaccctgag catcaaactc ttttatcagt tggatcatgt cggcgggtgc gcggccaaga 5142
 cggtcgagct tcttcaccag aatgacatca ccttcctcca ccttcacctc cagcaaatcc 5202
 agcccttccc gatctggtga actgccggat gccttgctcg taaagatgcg gttagctttt 5262
 acccctgcat ctttgagcgc tgaggtctgc ctctgaaga aggtggtgct gactcatacc 5322
 aggcctgaat cgcctcatca tccagccaga aagtgagga gccacggttg atgagagctt 5382
 tgttgtaggt ggaccagttg gtgattttga acttttgctt tgccacggaa cggctctgct 5442
 tgtcgggaag atgcgtgatc tgatccttca actcagcaaa agttcgattt attcaacaaa 5502
 gccgccgtcc cgtcaagtca gcgtaatgct ctgccagtgt tacaaccaat taaccaattc 5562
 tgattagaaa aactcatcga gcatcaaatg aaactgcaat ttattcatat caggattatc 5622
 aataccatat ttttgaaaaa gccgtttctg taatgaagga gaaaactcac cgaggcagtt 5682
 ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc tgcgattccg actcgtcca catcaatata 5742
 acctattaat ttcccctcgt caaaaataag gttatcaagt gagaaatcac catgagtgac 5802
 gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagctt atgcatttct ttccagactt gttcaacagg 5862
 ccagccatta cgctcgtcat caaatcact cgcatcaacc aaaccgttat tcattcgtga 5922
 ttgcgctga gcgagacgaa atacgcgatc gctgttaaaa ggacaattac aacaggaat 5982
 cgaatgcaac cggcgcagga aactgccag cgcatcaaca atattttcac ctgaatcagg 6042
 atattcttct aatacctgga atgctgtttt cccggggatc gcagtgggtga gtaaccatgc 6102
 atcatcagga gtacggataa aatgcttgat ggtcgggaaga ggcataaatt ccgtcagcca 6162
 gtttagtctg accatctcat ctgtaacatc attggcaacg ctacccttgcc catgtttcag 6222
 aaacaactct ggcgcacggt gcttcccata caatcgaatg attgtcgcac ctgattgccc 6282
 gacattatcg cgagcccatt tatacccata taaatcagca tccatgttg gaaatcaatcg 6342
 cggcctcgag caagacgttt cccgttgaat atggctcata acacccttg tattactggt 6402
 tatgtaagca gacagtttta ttgttcatga tgatatattt ttatcttgtg caatgtaaca 6462
 tcagagattt tgagacacca tgttcttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg 6522
 tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga 6582
 gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcggc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg 6642
 gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccagc tggaaagcgg gcagtgagcg 6702
 caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct 6762

ES 2 805 355 T3

tccggctcgt atggtgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta 6822

tgaccatgat tacgccagat ttaattaagg ccttaattag g 6863

5 <210> 4
<211> 653
<212> PRT
<213> plásmido que lleva hIDUA

10 <400> 4

ES 2 805 355 T3

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
195 200 205

ES 2 805 355 T3

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

ES 2 805 355 T3

450																	
Pro	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Tyr	Val	Thr	Arg	Tyr	Leu	Asp	Asn	Gly	Leu		
465					470					475					480		
	Cys	Ser	Pro	Asp	Gly	Glu	Trp	Arg	Arg	Leu	Gly	Arg	Pro	Val	Phe	Pro	
				485						490					495		
	Thr	Ala	Glu	Gln	Phe	Arg	Arg	Met	Arg	Ala	Ala	Glu	Asp	Pro	Val	Ala	
				500					505					510			
	Ala	Ala	Pro	Arg	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Arg	Leu	Thr	Leu	Arg	Pro	
			515					520					525				
	Ala	Leu	Arg	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	His	Val	Cys	Ala	Arg	Pro	
		530					535					540					
	Glu	Lys	Pro	Pro	Gly	Gln	Val	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	
		545				550					555					560	
	Gln	Gly	Gln	Leu	Val	Leu	Val	Trp	Ser	Asp	Glu	His	Val	Gly	Ser	Lys	
				565						570					575		
	Cys	Leu	Trp	Thr	Tyr	Glu	Ile	Gln	Phe	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Ala	Tyr	
				580					585					590			
	Thr	Pro	Val	Ser	Arg	Lys	Pro	Ser	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Val	Phe	Ser	
			595					600					605				
	Pro	Asp	Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Gly	Ser	Tyr	Arg	Val	Arg	Ala	Leu	Asp	
		610					615					620					
	Tyr	Trp	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	Pro	Val	Pro	Tyr	Leu	Glu	
		625				630					635					640	
	Val	Pro	Val	Pro	Arg	Gly	Pro	Pro	Ser	Pro	Gly	Asn	Pro				
				645						650							

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> sintético

5

<400> 5
 gccaaaaatt atggggacat

20

10

<210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> sonda para la región nRBG poliA del vector

ES 2 805 355 T3

<400> 6
atgaagcccc ttgagcatct gacttct

27

5 <210> 7
<211> 653
<212> PRT
<213> variante hIDUA H a Q en la pos de aa 33 [VAR_003350]

10 <400> 7

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

ES 2 805 355 T3

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

ES 2 805 355 T3

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650

<210> 8
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> variante hIDUA

5

<400> 8

ES 2 805 355 T3

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

ES 2 805 355 T3

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

ES 2 805 355 T3

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650

<210> 9
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> variante hIDUA

5

<400> 9

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95

ES 2 805 355 T3

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Gln Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350

ES 2 805 355 T3

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
 450 455 460
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590
 Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

ES 2 805 355 T3

595

600

605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

- <210> 10
- <211> 653
- <212> PRT
- <213> variante hIDUA

- <400> 10

ES 2 805 355 T3

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110

His Leu Asp Arg Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn

ES 2 805 355 T3

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
 450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650

<210> 11
 <211> 653
 <212> PRT

ES 2 805 355 T3

<213> variante hIDUA

<400> 11

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240

ES 2 805 355 T3

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255
 Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270
 Leu Glu Gln Glu Lys Val Ala Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285
 Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300
 Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320
 Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335
 Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
 450 455 460
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495

ES 2 805 355 T3

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650

<210> 12
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> variante hIDUA

5

<400> 12

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60

ES 2 805 355 T3

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

ES 2 805 355 T3

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

<210> 13
<211> 653
<212> PRT
<213> variante hIDUA

5

<400> 13

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
115 120 125

ES 2 805 355 T3

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Thr Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
370 375 380

ES 2 805 355 T3

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
 450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640

ES 2 805 355 T3

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

5 <210> 14
<211> 653
<212> PRT
<213> variante hIDUA

<400> 14

ES 2 805 355 T3

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
 100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
 115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
 130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
 145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
 165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
 180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
 195 200 205

ES 2 805 355 T3

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
 210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
 225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
 245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
 260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445

Asn Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

ES 2 805 355 T3

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

ES 2 805 355 T3

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

ES 2 805 355 T3

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
 275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
 290 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
 305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
 325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
 340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
 385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Ile Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
 450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
 515 520 525

ES 2 805 355 T3

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
 580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
 595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
 610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
 625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
 645 650

<210> 16
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> variante hIDUA

5

<400> 16

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
 20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
 35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
 50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
 65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
 85 90 95

ES 2 805 355 T3

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
340 345 350

ES 2 805 355 T3

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Thr Tyr
580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

ES 2 805 355 T3

595

600

605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

<210> 17
<211> 653
<212> PRT
<213> variante hIDUA

5

<400> 17

ES 2 805 355 T3

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn

ES 2 805 355 T3

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

ES 2 805 355 T3

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Thr Leu Asp
610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

REIVINDICACIONES

1. Un vector que lleva un casete de expresión que comprende un gen de la alfa-L-iduronidasa humana (hIDUA) que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos aproximadamente el 80 % idéntica a SEQ ID NO: 1 que codifica una alfa-L-iduronidasa humana funcional en células humanas, en donde dicho casete de expresión comprende además secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de la alfa-L-iduronidasa humana en células humanas, comprendiendo dichas secuencias de control reguladoras un promotor específico del hígado.
2. El vector de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen hIDUA modificado es al menos aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 95 % a aproximadamente el 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 1.
3. El vector de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la alfa-L-iduronidasa humana funcional se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) de aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente 653 de SEQ ID NO: 2;
 - (b) una enzima humana sintética que comprende una secuencia líder heteróloga fusionada a aproximadamente los ácidos 27 a aproximadamente 653 de SEQ ID NO: 2;
 - (c) una variante de secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 que tiene una o más de las modificaciones que comprenden: una reducción H en la posición de aminoácido 82; un cambio de R a Q en la posición 105; un cambio de G a R en la posición 116; un cambio de V a A en la posición 279; un cambio de L a R en la posición 346; un cambio de A a T en la posición 361; un cambio de H a N en la posición 449; un cambio de V a I en la posición 454; un cambio de A a T en la posición 591; y un cambio de A a T en la posición 622.
4. El vector de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el casete de expresión comprende además un poli A seleccionado de poli A de globulina de conejo.
5. El vector de acuerdo con la reivindicación 1 que es el plásmido pENN.TBG.hIDUA.nRBG.
6. Una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que tiene una cápside de AAV y que contiene empaquetada en la misma una repetición terminal invertida 5' (ITR), un gen de la alfa-L-iduronidasa humana (hIDUA) bajo el control de secuencias reguladoras que controlan la expresión del mismo y una ITR 3' de AAV, en donde dicho gen hIDUA tiene una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia al menos aproximadamente el 95 % idéntica a la misma que codifica una alfa-L-iduronidasa humana funcional.
7. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el gen hIDUA modificado se expresa bajo el control de un promotor específico del hígado.
8. El vector de acuerdo con la reivindicación 1 o el rAAV de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde el promotor es un promotor TBG.
9. El vector de acuerdo con la reivindicación 1 o el rAAV de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el vector comprende además uno o más potenciadores, opcionalmente en donde los potenciadores son iguales o diferentes.
10. El vector de acuerdo con la reivindicación 9 o el rAAV de acuerdo con la reivindicación 9, en donde los potenciadores se seleccionan del grupo que consiste en un intrón, un potenciador de CMV y un potenciador de Alfa mic/bik, opcionalmente en donde más de una copia de un potenciador seleccionado está presente en el vector, opcionalmente además en donde la más de una copia del potenciador se encuentra en tándem.
11. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV seleccionada de AAV8 y AAV9.
12. El rAAV de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el rAAV está pseudotipado, opcionalmente en donde los ITR son de un AAV2.
13. Una partícula vírica adenoasociada recombinante AAV2/8.TBG.hIDUA.co.
14. Una composición para su uso en el tratamiento de la mucopolisacaridosis tipo I (MPS I) que comprende una cantidad eficaz de la composición que comprende el rAAV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicho rAAV se administra por vía intravenosa o en donde el rAAV se administra al sujeto en una cantidad de aproximadamente 3×10^9 a aproximadamente 3×10^{12} .

FIG. 1A

pENN.AAV.TBG.PI. 6863 pb ADN circular

CARACTERÍSTICAS	Ubicación/Calificadores
misc_structure	complemento (5566..6381) /vntifkey="88" /label=Kan-r
rep_origin	4249..4891 /vntifkey="33" /label=pUC\origin\of\replication
promotor	442..901 /vntifkey="29" /label=TBG
TATA_signal	885..888 /vntifkey="41" /label=TATA
potenciador	221..320 /vntifkey="9" /label=Alpha\mic/bik
potenciador	327..426 /vntifkey="9" /label=Alpha\mic/bik
intrón	1027..1159 /vntifkey="15" /label=Intron_1 /note="chimeric intron"
polyA_signal	3261..3387 /vntifkey="25" /label=Rabbit\globin\poly\A
repeat_region	1..130 /vntifkey="34" /label=5'\ITR
repeat_region	complemento (3476..3605) /vntifkey="34" /label=3'\ITR
rep_origin	complemento (3782..4220) /vntifkey="33" /label=f1\ori
CDS	1251..3212 /vntifkey="4" /label=Human\alpha-L-IDUA

FIG. 1B

RECuento DE BASES 1584 a 1971 c 1702 g 1606 t
 ORIGEN

1 ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctcg ggcgaccttt
 61 ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gaggtgccaa ctccatcact
 121 aggggttccct tgtagttaat gattaaccgg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg
 181 atcctctaga actatagcta gaattcgccc ttaagctagc aggttaattt ttaaaaagca
 241 gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggtaataaat
 301 ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa aaagcagtca aaagtccaag
 361 tggcccttgg cagcatttac tctctctggt tgctctgggt aataatctca ggagcaciaa
 421 cattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctaccttg acatcatttc ctctgcgaat
 481 gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc ttttgtaciaa
 541 ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc caatagttag aactttttcc
 601 tgctgectct tgggtgctttt gectatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactcttgcc
 661 agcatggact taaaccctc cagctctgac aatcctcttt ctcttttgtt ttacatgaag
 721 ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta ccatttttg ctttgttcc
 781 cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc ccagggttaa tgctgggggtt
 841 aatttataac taagagtgct ctagttttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaaga
 901 tgttgctttc tgagagacag ctttattgcy gtagtttatc acagttaaat tgctaacyca
 961 gtcagtgtct ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagtggctc gtgaggcact
 1021 gggcaggtaa gtatcaagg tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg
 1081 tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcacctt ttggctctac tgacatccac
 1141 tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta aggctagagt
 1201 acttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtgccacc atgcccggccc
 1261 tgaggcctag agctgctctg ctggcactgc tggccagctc gctggctgcc cctcctgtgg
 1321 cccctgccga agcccctcac ctggtgcatg tggatgccgc cagagccctg tggcctctgc
 1381 ggagattctg ggggagcacc ggtttttgcc ccccactgcc tcacagccag gccgaccagt
 1441 acgtgctgag ctgggaccag cagctgaacc tggcctactg gggcgccgtg cccacagag
 1501 gcatcaaaca ggtgagaacc cactggtctc tggaaactgg gacaaccgg ggctccaccg
 1561 gcagaggcct gagctacaac ttcaccacc tggacggcta cctggacctg ctgagagaga
 1621 accagctgct gcccggttc gagcttagg gcagcggcag cggcacttc accgactcg
 1681 aggacaagca gcaagtcttt gagtggaaag acctggtgtc cagcctggcc agacgtaca
 1741 tcggcagata cggactggcc cacgtgtcca agtggaaact cgagacatgg aacgagcccg
 1801 accaccacga ctctgacaac gtgtcaatga ccatgcaggg ctttctgaac tactacgagc
 1861 cctgctccga gggcctgaga gccgccagtc ctgccctgag actggggcga cccggcgata
 1921 gcttccacac cccccccaga agccccctga getggggcct gctgagacac tgccacgagc
 1981 gcaccaattt cttcaccggc gaggccggcg tgcggctgga ctacatcagc ctgcaccgga
 2041 agggcgccag aagcagcatc agcatcctgg aacaggaaaa ggtcgtcgc cagcagatcc
 2101 ggcagctggt ccccaagttc gccgacacc ccatctacia cgacgaggcc gaccccctgg
 2161 tgggatggtc actgcctcag ccttggagag ccgacgtgac ctacgccgtc atggtggtga
 2221 aagtgatcgc ccagcatcag aacctgctgc tggccaacac caccagcgc ttccttacg
 2281 ccctgctgag caacgacaac gccttctctga gctaccacc ccacccttc gccagagaa
 2341 ccctgaccgc ccggttccag gtgaacaaca ccagacccc ccacgtcag ctgctgagaa
 2401 agcccgtgct gaccgctatg ggactgctgg ctctgctgga cgaggaacag ctgtggggccg
 2461 aagtgtccca ggccggcacc gtctggaca gcaatcatac agtggcgctg ctggcctccg
 2521 cccacagacc tcagggacc gccgatgctt ggcgggctgc cgtgctgatc tacgccagc
 2581 acgataccag agcccacccc aacagatccg tggccgtgac cctgcccgtg agagcgtgc
 2641 caccaggccc tggactggtg tacgtgacca gatacctgga caacggcctg tgcagccccg
 2701 acggcgaatg gcgcagactg ggcagacctg tgttccccac cgcgagcag ttccggcgga
 2761 tgagagccgc tgaggatcct gtggctgctg cccctagacc tctgctgct ggccgagac

FIG. 1C

2821 tgaccctgag gcccgctctg agaactgccta gtctgtctgt ggtgcacgtg tgcgccagge
 2881 ccgagaagcc tcccggccag gtgacaagac tgagagccct gccctgacc cagggccagc
 2941 tgggtctggt gtggtccgat gagcacgtgg gcagcaagtg cctgtggacc tacgagatcc
 3001 agttcagcca ggacggcaag gcctacaccc ccgtgtcccg gaagccagc accttcaacc
 3061 tgttcgtggt cagccccgat acagggcccg tgtccggctc ttatagagtg cgggccctgg
 3121 actactgggc cagaccgggc cctttcagcg accccgtgcc ctacctggaa gtgcccgctc
 3181 ctagaggccc ccctagcccc ggcaaccctt gagtcgaccc gggcgccctc gaggacgggg
 3241 tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc cctctgccc aaattatggg gacatcatga
 3301 agccccctga gcatctgact tctggctaata aaaggaaatt tttttcatt gcaatagtgt
 3361 gttggaattt tttgtgtctc tcaactcgaa gcaattcgtt gatctgaatt tcgaccaccc
 3421 ataataccca ttaccctggg agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa
 3481 cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccggg
 3541 cgaccaaagg tcgcccagc cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag cgaagcagcg
 3601 cgcagcctta ataacctaa ttcactggcc gtcgtttttac aacgtcgtga ctgggaaaac
 3661 cctggcgcta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat
 3721 agcgaagagg ccgcaccga tcgccccttc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg
 3781 gacgcgcctt gtageggcgc attaaagcgc ggggtgtgg tggttacgc cagcgtgacc
 3841 gctacacttg ccagcgcct agcgcgcct tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg tttccgattt
 3901 acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg tttccgattt
 3961 agtgccttac ggcacctga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatgggtc acgtagtggg
 4021 ccatcgcctt gatagacggt ttttcgcctt ttgacgttgg agtccacgtt ctttaaatagt
 4081 ggactcttgt tccaaaactg aacaacactc aacctatct cggctctatc ttttgattta
 4141 taagggattt tgccgatttc ggctatttgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaaattt
 4201 aacgcgaatt ttaacaaaat catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaa
 4261 aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat
 4321 cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaaccgc acaggactat aaagatacca ggcgtttccc
 4381 cctggaaget cctcgtgctg ctctcctggt ccgaccctgc cgttaccgg atacctgtcc
 4441 gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt
 4501 tcgggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgacg aacccccctg tcagcccagc
 4561 cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg
 4621 ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca
 4681 gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggatctgc
 4741 gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagtggta gctcttgatc cggcaaaaa
 4801 accaccgctg gtagegggtg ttttttggtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa
 4861 ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac
 4921 tcaagttaag ggattttggg catgagatta tcaaaaagga tcttcacctg gatecttttg
 4981 atcctcggc gttcagcctg tgccacagcc gacaggatgg tgaccacctt ttgccccata
 5041 tcaccgctgg tactgatccc gtcgtcaata aaccgaaccg ctacaccctg agcatcaaac
 5101 tcttttatca gttggatcat gtcggcgggt tcgcccgaac gacggctcag cttcttcacc
 5161 agaatgacat caccttctc caccttcctc ctacgcaaat ccagcccttc ccgatctggt
 5221 gaactgcgg atgccttgtc ggtaaagatg cggtttagct ttaccctcgc atctttgagc
 5281 gctgaggtct gcctcgtgaa gaaggtgttg ctgactcata ccaggcctga atcgccccat
 5341 catccagcca gaaagtgagg gagccacggt tgatgagagc tttgtttagg gtggaccagt
 5401 tgggtgattt gaacttttgc tttgccacgg aacggctctg gttgtcggga agatgcgtga
 5461 tctgatcctt caactcagca aaagttcgat ttattcaaca aagccgcctg cccgtcaagt
 5521 cagcgtaatg ctctgcagc gttacaacca attaaccaat tctgattaga aaaactcctc
 5581 gagcatcaaa tgaaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa
 5641 aagccgtttc tgtaatgaag gagaaaaact accgaggcag ttccatagga tggcaagatc

FIG. 1D

5701 ctggtatcgg tctgcgatlc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttcccctc
5761 gtcaaaaata aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa
5821 tggcaaaagc ttatgcattt ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc
5881 atcaaaatca ctgcacatcaa ccaaaccggtt attcattcgt gattgcgcct gagcagagacg
5941 aaatacgcga tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgcag
6001 gaacactgcc agcgcacatcaa caatattttc acctgaatca ggatattcct ctaatacctg
6061 gaatgctggt ttcccgggga tcgcagtggt gagtaaccat gcatcatcag gagtacggat
6121 aaaatgcttg atggtcggaa gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc
6181 atctgtaaca tcattggcaa cgctaccctt gccatgtttc agaaacaact ctggcgcac
6241 gggcttccca tacaatcgat agattgtcgc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca
6301 tttataccca tataaatcag catccatggt ggaatttaat cgcggcctcg agcaagacgt
6361 ttcccgttga atatggctca taacaccctt tgtattactg tttatgtaag cagacagttt
6421 tattgttcat gatgatatat ttttatcttg tgcaatgtaa catcagagat tttgagacac
6481 catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg
6541 agctgatacc gctcgcgcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc
6601 ggaagagcgc ccaatacgcga aaccgcctct ccccgcgctt tggccgattc attaatgcag
6661 ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag
6721 ttagctcact cattagcac cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttggtg
6781 tgggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgacctg attacgccag
6841 atttaattaa ggccttaatt agg

