



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 151**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04745818 .7**

96 Fecha de presentación : **11.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1634956**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2006**

54 Título: **Vector de virus adeno-asociado recombinante para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.**

30 Prioridad: **13.06.2003 JP 2003-169714**
30.10.2003 JP 2003-371103

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2010

73 Titular/es: **Japan as Represented by President of
National Center for Geriatrics and Gerontology
36-3, Gengo, Morioka-cho
Obu-shi, Aichi 4748511, JP
National Institute of Biomedical Innovation**

72 Inventor/es: **Tabira, Takeshi y
Hara, Hideo**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Vector de virus adeno-asociado recombinante para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de un vector de virus adeno-asociado que expresa el péptido A β para la
10 fabricación de un agente terapéutico para administración oral en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la técnica

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por placas seniles (neuríticas), ovillos neurofibrilares, y la alteración y
15 disminución en el número de células neurales en el cerebro. En particular, se considera que el β -amiloide depositado en las placas seniles juega un papel fundamental en el desarrollo patológico de la enfermedad de Alzheimer. El péptido β -amiloide, el componente principal del depósito β -amiloide, se produce por la descomposición parcial de la proteína precursora de β -amiloide (β APP) mediante las secretasas β y γ en las células neurales.

20 Recientemente, se ha dado a conocer que se había suprimido la formación de placas seniles y se había reducido el número de placas seniles existentes mediante la administración del péptido A β junto con un adyuvante para la inmunización en ratones transgénicos que tienen formas familiares de patología de Alzheimer y sobreexpresan una proteína del precursor amiloide humano (Schenk D., Barbour R., Dunn W. y col.: Nature: 173-177, 1999).

25 Como presuntos mecanismos de las reacciones anteriormente mencionadas, se proponen ahora tres teorías. Según la primera teoría, el anticuerpo contra A β producido en el cuerpo mediante la administración del péptido A β se une al A β agregado en las placas seniles y la fagocitosis microglial del producto resultante estimula el aclaramiento de las placas seniles. El anticuerpo se une también al A β segregado y la fagocitosis del producto resultante estimula la supresión de la citotoxicidad de A β en las células neurales. Esto conduce al tratamiento de la demencia y similar. Según la segunda
30 teoría, el anticuerpo contra A β producido mediante la administración del péptido A β se une al A β reconociendo su aminoácido en el término N para solubilizar el A β agregado o insolubilizado y suprimir adicionalmente la agregación y deposición del A β segregado, lo que da como resultado la reducción en la deposición amiloide. Según la tercera teoría, la así denominada teoría "sink", el anticuerpo contra A β no pasa a través de la barrera hematoencefálica pero A β se difunde desde el sistema nervioso central al sistema periférico reduciendo A β en la sangre periférica y el tejido
35 periférico.

Basándose en las teorías anteriormente mencionadas, se ha intentado también el desarrollo de procedimientos preventivos y terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer con vectores de virus. Se ha descrito, por ejemplo, que la administración oral de un vector de adenovirus, en el que se incorpora ADNc de A β de ratones C57BL/6, permitió la
40 expresión de A β en los tejidos del tracto gastrointestinal superior en los ratones y que el anticuerpo dirigido contra A β en el suero de ratón inhibió la agregación del péptido A β *in vitro* (Takeshi Tabira e Hideo Hara, Fiscal 2002 Welfare Science Research, "21 Century-Type Medical Pioneering/Promoting Research (Field of Dementia), Publication Report on Research Results" publicado por Incorporated Foundation, Japan Foundation for Longevity Science (Choju Kagaku Shinko Zaidan), Marzo de 2002, pp. 49-54). En este informe, sin embargo, no se ha informado de ningún experimento
45 *in vivo* y no se ha confirmado el efecto terapéutico en animales.

Además, se sabe que la citocina TGF- β 1 (factor β 1 de crecimiento transformante) estimula la producción de cito-
50 cinas inflamatorias (IL-1 β (interleucina-1 β), TNF- α (factor α de necrosis tumoral y similares) en células endoteliales vasculares. Adicionalmente, se ha informado recientemente de que TGF- β 1 estimula cambios patológicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer tales como la deposición amiloide cerebrovascular y la degeneración microvascular (Wyss-coray, T. y col.; Chronic overproduction of transforming growth factor- β -1 by astrocytes promotes Alzheimer's disease-like microvascular degeneration en transgenic mice: Am. J. Pathol. 156: 139-150, 2000).

Los agentes terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer han de suprimir la formación de placas seniles y la
55 deposición amiloide en el sistema nervioso central y al mismo tiempo no deberían difundirse hacia otros órganos o producir efectos secundarios tales como encefalitis por cuestiones relacionadas con la seguridad. Sin embargo, no se ha informado hasta la fecha de ningún agente terapéutico que cumpla estos requisitos que utilice el antígeno A β .

Resumen de la invención

60 Los inventores han encontrado ahora que la deposición amiloide y la formación de placas seniles se reducen en el cerebro por expresión del antígeno A β en células intestinales que inducen la inmunidad humoral, induciendo de esta manera la producción de anticuerpos contra este antígeno A β , usando un virus adeno-asociado recombinante (VAAr). Además, los inventores han encontrado también que no se encuentra observación inflamatoria en el cerebro y otros
65 órganos tales como los riñones cuando se usa este virus adeno-asociado recombinante. La presente invención se basa en estos hallazgos.

Según esto, un objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un vector de virus adeno-asociado en la fabricación de un agente terapéutico para la administración oral para expresar el péptido β amiloide en células intestinales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en el que el vector de virus adeno-asociado comprende un ADN que codifica dicho péptido β amiloide y un ADN que codifica un péptido señal capaz de segregar extracelularmente dicho péptido β amiloide, en una forma operativa.

El vector de virus adeno-asociado es capaz de expresar un fragmento de péptido que contiene un emplazamiento de inducción de la inmunidad humoral del péptido β amiloide y comprende un ADN que codifica este fragmento de péptido de una forma operativa.

Adicionalmente, la invención proporciona una composición farmacéutica para la administración oral para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende dicho vector de virus adeno-asociado.

Con el uso del vector de virus adeno-asociado recombinante, se puede inducir la producción de anticuerpos sin inducir respuestas inmunes celulares y se pueden suprimir la formación de placas seniles y la deposición amiloide en el sistema nervioso central. Adicionalmente, con el uso de este virus adeno-asociado recombinante, se puede reducir la concentración de TGF- β 1 en la sangre y se pueden suprimir el progreso de la deposición amiloide cerebrovascular y la degeneración microvascular cerebral. Además, según el vector de virus adeno-asociado recombinante, es posible un tratamiento muy seguro de la enfermedad de Alzheimer sin producir efectos secundarios tales como encefalitis y trastornos en el hígado.

Breve descripción de los dibujos

la fig. 1 muestra la cantidad de producción del anticuerpo dirigido contra $A\beta$ en el suero de los ratones a los cuales se administró oralmente $A\beta$ 1-43 que expresaba el vector de virus adeno-asociado;

la fig. 2 muestra el efecto supresor del anticuerpo dirigido contra $A\beta$ en el suero de ratón sobre la agregación de $A\beta$ *in vitro*;

la fig. 3 muestra la reactividad de la proliferación celular del anticuerpo dirigido contra $A\beta$ de células de bazo de los ratones tratados con el péptido $A\beta$ 42;

la fig. 4 muestra las relaciones promedio del área de acumulación de $A\beta$ en las regiones del córtex del lóbulo frontal, lóbulo parietal e hipocampo en los ratones a los cuales se administró oralmente $A\beta$ 1-43 que expresaba el vector de virus adeno-asociado;

la fig. 5 muestra las relaciones promedio del área de acumulación de $A\beta$ en las regiones del córtex del lóbulo frontal, lóbulo parietal e hipocampo en los ratones a los cuales se administró oralmente $A\beta$ 1-21 que expresaba el vector de virus adeno-asociado;

la fig. 6 muestra la concentración de TGF- β 1 en el suero procedente de ratones a los cuales se administró oralmente $A\beta$ 1-43 que expresaba el vector de virus adeno-asociado.

Descripción detallada de la invención

Un vector de virus adeno-asociado para uso según la presente invención comprende un ADN que codifica un fragmento de péptido que contiene un emplazamiento de inducción de la inmunidad humoral del péptido β amiloide (péptido $A\beta$) en una forma operativa, por tanto, se puede expresar dicho fragmento de péptido. La expresión "en una forma operativa" usada en el presente documento significa que el gen transferido (ADN) se inserta en el vector en un modo en el que dicho gen se puede expresar bajo el control de los elementos reguladores apropiados (es decir, promotores, potenciadores, y terminadores de la transcripción).

Se puede especificar fácilmente el emplazamiento de inducción de la inmunidad humoral del péptido $A\beta$ por cualquier persona experta en la técnica. Por ejemplo, el emplazamiento de inducción de la inmunidad humoral anteriormente mencionado está presente en la región de los restos de aminoácidos 4 a 10 del péptido $A\beta$ ($A\beta$ 4-10). Según esto, el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado que se va a expresar por el vector de virus adeno-asociado de la presente invención comprende preferiblemente $A\beta$ 4-10.

Además, un ejemplo de la secuencia de aminoácidos $A\beta$ 4-10 son los aminoácidos 4 a 10 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2. Según esto, el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado comprende preferiblemente los aminoácidos 4 a 10 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos del ADN que codifica esta secuencia de aminoácidos no está particularmente limitada; por ejemplo, se pueden usar los nucleótidos 10 a 30 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1. Según esto, el ADN que codifica el fragmento de péptido del antígeno comprende preferiblemente los nucleótidos 10 a 30 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1.

Según una realización preferida de la presente invención, el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado comprende los aminoácidos 1 a 43 del péptido $A\beta$ ($A\beta$ 1-43). Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos

de A β 1-43 es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2; según esto, el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos del ADN que codifica esta secuencia de aminoácidos no está particularmente limitada; por ejemplo, se puede usar la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1. Según esto, el ADN que codifica el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado comprende preferiblemente la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1.

Según otra realización preferida de la presente invención, el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado comprende los aminoácidos 1 a 21 del péptido A β (A β 1-21). Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de A β 1-21 es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4; según esto, el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de nucleótidos del ADN que codifica esta secuencia de aminoácidos no está particularmente limitada; por ejemplo, se puede usar la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3. Según esto, el ADN que codifica el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado comprende preferiblemente la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3.

Las secuencias de aminoácidos de A β 1-43 y A β -21 anteriormente mencionadas no solo contienen un emplazamiento de inducción de la inmunidad humoral sino también una secuencia de reconocimiento del receptor de las células T; sin embargo, estos fragmentos de péptido del antígeno inducen principalmente la producción de anticuerpos e inducen fuertemente las respuestas inmunes cuando se expresan en el sistema inmune de la mucosa intestinal por el vector de virus adeno-asociado de la presente invención.

Con el fin de presentar eficazmente el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado expresado por el vector de virus adeno-asociado en forma de antígeno, dicho fragmento de péptido del antígeno se segrega en el exterior de las células infectadas después de expresarse en el interior de las células. Según esto, el vector de virus adeno-asociado comprende un ADN que codifica un péptido señal que permite que se exprese el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado que se va a segregar extracelularmente, en una forma operativa. La expresión “comprender de forma operativa” según se usa en el presente documento significa que el péptido señal anteriormente mencionado se expresa junto con el fragmento de péptido del antígeno anteriormente mencionado al mismo tiempo que se segrega extracelularmente dicho fragmento de péptido del antígeno expresado mediante dicho péptido señal. El procedimiento para integrar el ADN que codifica el péptido señal anteriormente mencionado en el vector de virus adeno-asociado de una forma operativa puede ser cualquier procedimiento conocido por las personas expertas en la técnica, un gen de fusión en el que se fusionan dos ADN de tal manera que se expresa el péptido señal con su término N unido a dicho fragmento de péptido del antígeno.

El péptido señal anteriormente mencionado puede ser cualquiera conocido por las personas expertas en la técnica; sin embargo, se usa preferiblemente el péptido señal localizado en el término N de la proteína del precursor amiloide (APP). Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos del péptido señal de APP es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 6; según esto, el péptido señal anteriormente mencionado que se va a expresar por el vector de virus adeno-asociado comprende preferiblemente la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 6. La secuencia de nucleótidos del ADN que codifica esta secuencia de aminoácidos no está particularmente limitada; se puede usar, por ejemplo, la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 5. Según esto, el ADN que codifica el péptido señal anteriormente mencionado comprende preferiblemente la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 5.

Según una realización preferida de la presente invención, el vector de virus adeno-asociado comprende el ADN que codifica una proteína fusionada en la que el péptido señal de APP está unido al término N de A β 1-43. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de esta proteína fusionada es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 8 y un ejemplo de la secuencia de nucleótidos del ADN que codifica ésta son los nucleótidos 9 a 191 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 7.

Según otra realización preferida de la presente invención, el vector de virus adeno-asociado comprende el ADN que codifica una proteína fusionada en la que el péptido señal de APP está unido en el término N de A β 1-21. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de esta proteína fusionada es la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 10 y un ejemplo de la secuencia de nucleótidos del ADN que codifica ésta son los nucleótidos 17 a 133 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 9.

Adicionalmente, el vector de virus adeno-asociado puede contener elementos reguladores, tales como promotores, potenciadores y terminadores, para expresar eficazmente el ADN diana y, si es necesario, se pueden insertar en el mismo codones de inicio de la traducción y codones de detención de la traducción.

El vector de virus adeno-asociado para uso según la presente invención se puede preparar mediante un procedimiento normalizado conocido en la técnica. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 5.858.351 y las referencias citadas en la misma describen diversos virus adeno-asociados recombinantes adecuados para el uso en la terapia génica y los procedimientos para construir y multiplicar estos vectores (por ejemplo, Kotin (1994) Human Gene Therapy 5: 793-801 o Berns “Parvoviridae and their Replication” Fundamental Virology, la segunda edición compilada por Fields y Knipe).

Según un procedimiento preferido para construir un vector de virus adeno-asociado, en primer lugar, se mantienen las ITR en ambos extremos del virus adeno-asociado natural y se inserta un gen de interés entre ellas para construir un plásmido (plásmido del vector del VAA). Por otra parte, se preparan un plásmido que expresa el gen Rap (un gen que codifica la proteína de iniciación de la replicación) y el gen Cap (un gen que codifica una proteína de la cápsida del virus) y un plásmido que expresa los genes E2A, E4 y VA del adenovirus. A continuación, estos tres tipos de plásmidos se transfectan simultáneamente en células empaquetadas que expresan el gen E1, tales como las células HEK293, y a continuación se cultivan las células resultantes. De esta manera, se pueden producir partículas de vector de virus adeno-asociado que tienen una elevada infectividad en células de mamíferos. Se puede llevar a cabo fácilmente este procedimiento usando un kit comercialmente disponible tal como el AAV-Helper-Free System (Stratagene).

El vector de virus adeno-asociado se puede usar para tratar la enfermedad de Alzheimer en mamíferos. Según esto, según la presente invención, se proporciona el uso de un vector de virus adeno-asociado para la fabricación de un agente terapéutico para la administración oral para expresar el péptido β amiloide en células intestinales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en el que el vector de virus adeno-asociado comprende un ADN que codifica dicho péptido β amiloide y un ADN que codifica un péptido señal capaz de segregar extracelularmente dicho péptido β amiloide, en forma operativa. Se proporciona además una composición farmacéutica que comprende el vector de virus adeno-asociado que se define en el presente documento, para la administración oral para expresar el péptido β amiloide en células intestinales par uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los sujetos que se van a tratar pueden ser mamíferos tales como roedores, caninos, gatos, ganado y primates, preferiblemente seres humanos.

Un procedimiento para administrar el vector de virus adeno-asociado puede ser un procedimiento que se puede usar en el campo de la terapia génica, tal como la inyección intraperitoneal, inyección intratraqueal, inyección intrabronquial e instilación intrabronquial directa, inyección subcutánea, administración transcutánea, infusión intraarterial, e inyección intravenosa (véase Flotte y Carter, *Gene Therapy* 2: 357-362 (1995)). Además, los virus adeno-asociados se administran ventajosamente oralmente debido a que no son atacados fácilmente por el jugo gástrico y debido a que los sujetos pueden llevar a cabo la administración por sí mismos.

La cantidad del vector de virus adeno-asociado que se va a administrar puede ser cualquier cantidad terapéuticamente eficaz y dicha cantidad se puede determinar fácilmente por las personas expertas en la técnica de la terapia génica. Además, la dosificación se ajusta preferiblemente según la gravedad de las dolencias patológicas, sexo, edad, peso corporal y hábitos del sujeto, y similares; sin embargo, dicha dosificación se ajusta apropiadamente por un médico o un veterinario. Por ejemplo, la cantidad del vector de virus adeno-asociado para la administración oral es normalmente de $0,5 \times 10^{11}$ a $2,0 \times 10^{12}$ del genoma vírico/kg de peso corporal, preferiblemente de $1,0 \times 10^{11}$ a $1,0 \times 10^{12}$ del genoma vírico/kg de peso corporal, más preferiblemente de $1,0 \times 10^{11}$ a $5,0 \times 10^{11}$ del genoma vírico/kg de peso corporal. El vector de virus adeno-asociado es farmacéuticamente seguro en intervalo comprendido por las dosificaciones anteriormente mencionadas. La unidad "genoma vírico" según se usa en el presente documento representa el número de moléculas del genoma del virus adeno-asociado (número de partículas víricas) y las personas expertas en la técnica saben que representa la cantidad de vectores de virus adeno-asociados. Se puede determinar el valor diluyendo una disolución de virus adeno-asociado purificado para llevar a cabo la hibridación por transferencia de mancha y comparar su intensidad de señal con la del ADN del plásmido que tiene un número especificado de moléculas.

El vector de virus adeno-asociado para uso según la presente invención mantiene su actividad terapéutica contra la enfermedad de Alzheimer durante un periodo relativamente largo de tiempo una vez administrado a un sujeto. En particular, cuando se administra oralmente en la cantidad anteriormente mencionada, el antígeno se presenta en las células epiteliales intestinales durante al menos 6 meses y se ha confirmado la inducción de la producción de anticuerpos dirigidos contra este antígeno. A la luz de estos hallazgos, cualquier persona experta en la técnica puede planificar un programa de dosificación apropiado.

El vector de virus adeno-asociado para uso según la presente invención se puede administrar a un sujeto en forma de una composición farmacéutica que lo contenga. Según esto, según la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer mediante administración oral que comprende el vector de virus asociado descrito en el presente documento.

La composición farmacéutica para uso según la presente invención se puede producir mediante un procedimiento conocido en la técnica dependiendo de su ruta de administración y la forma de dosificación. Se pueden usar, por ejemplo, formas de dosificación tales como cápsulas y disoluciones para una composición farmacéutica para administración oral. Según esto, la composición farmacéutica puede contener vehículos, agentes diluyentes, conservantes, y similares, farmacéuticamente aceptables en formas de dosificación individuales.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente en detalle mediante los siguientes ejemplos que no se pretende que limiten el alcance de la invención. Los ratones usados en los siguientes ejemplos de ensayo son ratones transgénicos APP, un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer (Tg2576, Taconic, Clínica Mayo).

ES 2 345 151 T3

Ejemplo 1

Construcción de vector de virus adeno-asociado que expresa la secuencia señal de APP + El ADNc de A β 1-43

Se amplificó el ADNc del amiloide- β 1-43 (A β 1-43) mediante la PCR usando el gen de la proteína del precursor amiloide humano (APP) como una plantilla y los siguientes cebadores. La disolución de la reacción de la PCR contenía tampón TAPS (25 mM, pH 9,3), KCl (50 mM), MgCl₂ (2 mM), 2-mercaptoetanol (1 mM), dNTP (100 μ M), plantilla de ADN (50-100 ng), y los cebadores (0,2 μ M cada uno). Se llevó a cabo la reacción térmica de la PCR durante 30 ciclos, consistiendo cada ciclo de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 68°C, y 3 minutos a 72°C.

Cebadores

Directo: 5'-GATGCAGAATTCCGACATGACTCAGGA-3' (SEQ ID NO: 11), e

Inverso: 5'-GTCTTAAGTCGCTATGACAACACCGCCC-3' (SEQ ID NO: 12, que tiene un emplazamiento AflII en el extremo 3').

El adaptador para la señal de secreción de APP, la primera secuencia señal en el término N (SEQ ID NO: 10), se construyó tratando los dos oligonucleótidos siguientes durante 3 minutos a 90°C seguido por hibridación a temperatura ambiente.

Oligonucleótidos

De sentido directo:

5' - GGTCTAGAATGCTGCCCCGGTTTGGCACTGCTCCTGCTGGCCGCTGGACGGCTCGGGCGCTT - 3' (SEQ ID NO: 13)

De sentido contrario:

5' - AGCGCCCGAGCCGTCCAGGCGGCCAGCAGGAGCAGTGCCAAACCGGGCAGCATTCTAGACC - 3' (SEQ ID NO: 14)

El adaptador de la señal de secreción de APP (que tiene un resto T que sobresale en el extremo 3' de la cadena de sentido directo) y el ADNc de A β 1-43 amplificado mediante la PCR (que tiene un resto A que sobresale en el extremo 3' de la cadena de sentido contrario) se unieron conjuntamente, y se llevó a cabo la PCR usando el ADN resultante como plantilla y los siguientes cebadores para construir un gen de fusión, la secuencia señal de APP + el ADNc de A β 1-43 (SEQ ID NO: 7, que tiene un emplazamiento de reconocimiento XbaI en los nucleótidos 3 a 8 en esta secuencia), en el que la secuencia señal de APP se une en el extremo 5' del ADNc de A β 1-43. La disolución de reacción de la PCR contenía tampón TAPS (25 mM, pH 9,3), KCl (50 mM), MgCl₂ (2 mM), 2-mercaptoetanol (1 mM), dNTP (100 μ M), plantilla de ADN (50-100 ng), y los cebadores (0,2 μ M cada uno). Se llevó a cabo la reacción térmica de la PCR durante 30 ciclos, consistiendo cada ciclo de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 68°C, y 3 minutos a 72°C.

Cebadores

Directo: 5'-GGTCTAGAATGCTGCCCCGGTTTGGCAC-3' (SEQ ID NO: 15, que tiene un emplazamiento XbaI en el extremo 5')

Inverso: 5'-GTCTTAAGTCGCTATGACAACACCGCCC-3' (SEQ ID NO: 12, que tiene un emplazamiento AflII en el extremo 5').

Debido a que se requiere ADN que tenga una longitud apropiada (4-4,5 kpb) para obtener eficazmente el empaquetamiento del ADN del virus adeno-asociado, el fragmento PvuII-SalI del ADN del plásmido pBR322 se unió a la secuencia señal de APP + el ADNc de A β 1-43 (XbaI-AflII/enromado) como un ADN "de relleno" no funcional y a continuación se unió en el vector de virus adeno-asociado estándar (pXXUF1) en el emplazamiento XbaI-SalI.

Además, de la misma manera que en el Ejemplo 1, se transfectaron génicamente en células HEK293 tres tipos de vectores, es decir, el pXXUF1 recombinante anteriormente mencionado, un plásmido Rep/Cap estándar y el plásmido E2A/E4/VA, mediante el procedimiento del fosfato de calcio y las células HEK293 resultantes se cultivaron en gran volumen, tras lo cual, las partículas de virus se purificaron a partir del lisado celular mediante ultracentrifugación con CsCl para obtener el vector de virus adeno-asociado que tiene la secuencia señal de APP + el ADNc de A β 1-43.

ES 2 345 151 T3

Ejemplo 2

Construcción de vector de virus adeno-asociado que expresa la secuencia señal de APP + El ADNc De A β 1-21

- 5 Se unieron la secuencia señal de APP + el ADNc de A β 1-43 (XbaI-AflII/enromado) en el plásmido pBluescript (XbaI-SmaI). Se llevó a cabo la PCR usando este como plantilla y los siguientes cebadores.

Cebadores

- 10 Directo: 5'-TGGCGGCCGCTCTAGAATG-3' (SEQ ID NO: 16, que tiene un emplazamiento NotI en el extremo 5')

- 15 Inverso: 5'-CACATCTTAAGCAAAGAACACC-3' (SEQ ID NO: 17)

- Los productos de la PCR de la secuencia señal de APP + el ADNc de A β 1-21 (SEQ ID NO:9) que tenían un emplazamiento de restricción NotI en los nucleótidos 3-10 y un emplazamiento de restricción XbaI en los nucleótidos 11-16 en esta secuencia) se sometieron al tratamiento de NotI-AflII/enromado y los productos resultantes se unieron en pXXUF1 (NotI-Sall) conjuntamente con el fragmento pBR322 PvuII-Sall "de relleno" anteriormente mencionado.

- Adicionalmente, de la misma manera que en el Ejemplo 1, se obtuvo el vector de virus adeno-asociado que tenía la secuencia señal de APP + el ADNc de A β 1-21.

- 25 Ejemplo comparativo 1

Como control, se construyó un virus adeno-asociado (GFP α AAV) que expresaba GFP (proteína fluorescente verde).

- 30 Ensayo 1

Ensayo de transferencia Western

- Se unieron la secuencia señal de APP + el ADNc de A β 1-43 en el vector de expresión pXXUF1 y el producto resultante se transfectó en células HEK293 usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) durante 48 horas, tras lo cual el sobrenadante del cultivo y el lisado celular se extrajeron y se sometieron individualmente a inmunoprecipitación con el anticuerpo dirigido contra A β (4G8) y a continuación a electroforesis mediante SDS-PAGE. A continuación, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y a continuación se intentó la detección de la proteína A β usando el anticuerpo dirigido contra A β . Como resultado, se confirmó que A β se segregaba extracelularmente formando oligómeros y que se producía una gran cantidad de proteína monomérica a partir del péptido A β de 4 kDa en el interior de las células.

- Ensayo 2

- 45 *Muestreo de suero de ratón*

- Se administró oralmente el vector de virus adeno-asociado del Ejemplo 1 (5×10^{11} del genoma vírico) solamente una vez a un ratón de 15 semanas de edad. Se tomaron muestras de suero procedentes de este ratón 1 mes, 4 meses, y 6 meses después de la administración.

Detección del anticuerpo dirigido contra A β en suero de ratón

- Se recubrió el péptido A β 1-42 (5 mg/ml) sobre cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc, MaxiSorp) y se bloqueó con leche desnatada/tampón TBS-T al 5%, tras lo cual, se añadió el suero de ratón muestreado anteriormente (a una dilución de 500 veces) y se llevó a cabo la detección con un anticuerpo dirigido contra la IgG de ratón marcado con peroxidasa. Se evaluó el título del anticuerpo midiendo la absorbancia óptica con un lector de ELISA.

- En la Figura 1 se muestran los resultados.

- El título del anticuerpo en el suero alcanzó principalmente un nivel punta un mes después de la administración oral y se observó la producción continua de anticuerpos hasta los 6 meses.

- 65

Ensayo 3

Ensayo de inhibición de la reacción de agregación de A β por el suero de ratón

Se ajustó la concentración del péptido A β 1-40 a 120 mM y se llevó a cabo la incubación a 37°C. Después de 24 horas, se observó el comienzo de la agregación de A β . Se añadió el suero de ratón a este agregado de A β a relaciones de 1:10 y 1.20 (vol:vol) y se llevó a cabo la incubación a 37°C durante una semana. Se midió si el suero de ratón inhibía la unión/agregación de A β 1-40 añadiendo tioflavina T 2 mM usando un espectrómetro de fluorescencia (excitación a 445 nm; emisión a 490 nm). En la Figura 2 se muestran los resultados.

El suero de ratón muestreado a los 6 meses después de la administración del vector de virus adeno-asociado como en el Ejemplo de Ensayo 1 inhibió significativamente la agregación/unión de A β 1-40 *in vitro* en comparación con el suero de ratón control.

Ensayo 4

Extracción del ADN procedente de tejidos, y la PCR

Se extrajeron el corazón, pulmón, bazo, hígado, tracto gastrointestinal superior, y riñón de un ratón de 28 semanas después de la administración oral del vector de virus adeno-asociado del Ejemplo 1, y se homogeneizó cada tejido en una disolución de Tris, tras lo cual, se sometieron los homogenados a proteólisis con proteinasa K y tratamiento con fenol/cloroformo para purificar el ADN. A continuación, se construyeron los siguientes cebadores a partir de una secuencia del nucleótido en el extremo 5' de la región del promotor del vector de virus adeno-asociado (pXXUF1) y una secuencia del nucleótido en el extremo 3' del vector para llevar a cabo la PCR. La disolución de la reacción de la PCR contenía tampón TAPS (25 mM, pH 9,3), KCl (50 mM), MgCl₂ (2 mM), 2-mercaptoetanol (1 mM), dNTP (100 μ M), plantilla de ADN (50-100 ng), y los cebadores (0,2 μ M cada uno). Se llevó a cabo la reacción térmica durante 30 ciclos, consistiendo cada ciclo de 1 minuto a 94°C, 20 segundos a 68°C, y 1 minuto a 72°C. Se sometieron los productos de la PCR a electroforesis en gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Cebadores

Directo: 5'-AGTGAACCGTCAGATCGC-3' (SEQ ID NO: 18)

Inverso: 5'-CGGTATCAGCTCACTCAA-3' (SEQ ID NO: 19)

La banda de 500 pb que representaba el producto de la PCR de interés se reconoció únicamente con el tejido procedente del tracto gastrointestinal superior.

Ensayo 5

Respuesta de proliferación celular en las células de bazo de ratón al péptido A β 1-42

Se aislaron células de bazo procedentes de un ratón de 28 semanas tras la administración oral del vector de virus adeno-asociado del Ejemplo 1, y se colocaron sobre una placa de 96 pocillos (5 x 10⁴ células por pocillo) y se incubaron durante 48 horas en disoluciones de cultivo con el péptido A β 1-42 añadido a diversas concentraciones. Tras la finalización del cultivo celular, se añadió una sal de tetrazolio (WST-1). Debido a que la sal de tetrazolio se transformó en un colorante de formazán mediante la succinato-tetrazolio reductasa mitocondrial, que es activa únicamente en células viables, se evaluó la respuesta a la proliferación celular midiendo la absorbancia óptica de la disolución de colorante usando un lector de ELISA. En la Figura 3 se muestran los resultados.

Las células de bazo del ratón al que se había proporcionado administración oral del vector de virus adeno-asociado del Ejemplo 1 mostraron una baja respuesta de proliferación celular independientemente de la concentración del péptido A β 1-42.

Ensayo 6

Ensayo 1 de tinción del tejido

Se obtuvieron muestras de tejido procedentes de ratones a los que se había proporcionado mediante administración oral el virus adeno-asociado del Ejemplo 1 (denominados a partir de ahora en el presente documento como "grupo de tratamiento") y procedente de ratones no tratados emparejados por edad (denominados a partir de ahora en el presente documento como "grupo control") 6 meses después de la administración (a los 10 meses de edad) y se llevó a cabo el siguiente experimento usando secciones congeladas del tejido. Con el fin de detectar la proteína A β , las placas seniles

ES 2 345 151 T3

y las del mismo tipo en el tejido, se trató el tejido con ácido fórmico al 70% y se inactivó la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 5%. Tras reaccionar con el anticuerpo dirigido contra A β (4G8 a una dilución de 1000 veces) o el anticuerpo de conejo dirigido contra A β 40 (a una dilución de 1000 veces), se añadió el segundo anticuerpo marcado con peroxidasa y se llevó a cabo la tinción DAB.

En el grupo control, se desarrolló la deposición amiloide con la edad; se observó deposición ligera en el cerebro a los 6 meses de edad, mientras que la deposición amiloide llegó a ser prominente, también se reconoció la formación de placa senil, y se observó también deposición amiloide ocasionalmente en células neurales a los 10 meses de edad.

Por otra parte, en el grupo de tratamiento, se reconoció la expresión de la proteína A β en las células epiteliales del tracto gastrointestinal superior tras la disección 6 meses después de la administración (a los 10 meses de edad). La disección del cerebro 6 meses después de la administración mostró que la deposición amiloide se redujo aparentemente y las placas seniles se redujeron drásticamente en comparación con el grupo control. En la Tabla 1 se muestra el resultado del recuento de placas amiloides en la sección sagital del cerebro 6 meses después de la administración.

TABLA 1

Comparación de la deposición amiloide en el cerebro en ratones en el grupo control y el grupo de tratamiento

Grupo	Placas amiloides extracelulares	Placas amiloides intracelulares
Grupo control	76	++
Grupo de tratamiento	8	±

* Ratones: a los 10 meses de edad.

El número promedio de placas amiloides fue de 76 en el grupo control, mientras que fue de 8 en el grupo tratado reduciéndose en aproximadamente un 90%. La deposición amiloide en el interior de las células neurales observada ocasionalmente en el grupo control se reconoció con fuerza en el grupo tratado.

Ensayo 7

Ensayo 2 de tinción de tejido

De la misma manera que en el Ejemplo de Ensayo 6, se obtuvieron muestras de tejido procedentes del grupo de tratamiento y del grupo control 6 meses después de la administración (a los 10 meses de edad) y se llevó a cabo el siguiente experimento usando secciones congeladas del tejido. Las secciones congeladas se tiñeron usando anticuerpos tales como el anticuerpo dirigido contra CD4, anticuerpo dirigido contra CD86, anticuerpo dirigido contra CD11b, anticuerpo dirigido contra GFAP (astrocitos), y anticuerpo dirigido contra Iba-1 (microglia) mediante el procedimiento ABC para confirmar la presencia o ausencia de infiltración de linfocitos en el sistema nervioso central. En la Tabla 2 se muestran los resultados.

TABLA 2

Inmunotinción del tejido

	Grupo control	Grupo de tratamiento
CD4	(-)	(-)
CD86	(-)	(-)
CD11b	(-)	(-)
GFAP	(+++)	(+)
Iba-1 (microglia)	(+)	(++ a +++)

Se tiñó el tejido cerebral individualmente con el marcador CD4 de las células T y la molécula CD86 de activación de las células T, lo que dio como resultado reacciones negativas en el grupo control y el grupo de tratamiento. Fue también negativa para el marcador CD11b de macrófagos periféricos. Se reconoció una diferencia entre los dos grupos para el marcador GFAP de los astrocitos. Se reconoció un aumento en el número de microglías activadas (Iba-1 positivo) en el lóbulo frontal y el lóbulo temporal en el grupo de tratamiento.

Ensayo 8

10 *Ensayo 3 de tinción de tejido*

Se obtuvieron muestras de tejido procedentes de ratones que recibieron la administración oral del virus adeno-asociado del Ejemplo 2 (denominado a partir de ahora en el presente documento como “grupo 2 de tratamiento”) y el grupo control 6 meses después de la administración (a los 10 meses de edad) y se usaron secciones congeladas del tejido para llevar a cabo la tinción DAB de la misma manera que en el Ejemplo de Ensayo 6.

El análisis del cerebro 6 meses después de la administración (a los 10 meses de edad) desveló que la deposición amiloide había disminuido claramente y que se redujo drásticamente el número de placas seniles en el grupo 2 de tratamiento en comparación con el grupo control.

Ensayo 9

25 *Comparación de la relación del área de acumulación de A β -1*

Se dispusieron tres grupos constituidos cada uno por 4 ratones y se les proporcionó la administración oral del virus adeno-asociado del Ejemplo 1 ($5,0 \times 10^{11}$ del genoma vírico/ratón) una vez a las 15 semanas de edad (denominado a partir de ahora en el presente documento como “grupo A”), a las 30 semanas de edad (denominado a partir de ahora en el presente documento como “grupo B”) o a las 45 semanas de edad (denominado a partir de ahora en el presente documento como “grupo C”), respectivamente. Además, se dispuso el grupo control constituido por 6 ratones y se le proporcionó la administración oral de PBS (0,1 ml/ratón) a las 15 semanas de edad. A continuación, los animales de cada grupo se diseccionaron a los 12 y 13 meses de edad (52 a 56 semanas de edad) para obtener secciones de tejido cerebral individualmente procedentes de las regiones del córtex del lóbulo frontal, del lóbulo temporal, y del hipocampo. Estas secciones de tejido se tiñeron de la misma manera que en el Ejemplo de Ensayo 6 y se observaron usando una cámara 3CCD conectada a un microscopio para medir el área de acumulación de A β en las regiones individuales. Se calculó la relación del área de acumulación de A β en cada emplazamiento individual de medida. En la Figura 4 se muestran los resultados.

En el grupo control, la relación promedio del área de acumulación de A β anteriormente mencionada en las tres regiones de medida en el cerebro fue de $2,64 \pm 1,46\%$. Por otra parte, las relaciones fueron de $0,55 \pm 0,50\%$ en el grupo A administrado a las 15 semanas de edad, $0,48 \pm 0,35\%$ en el grupo B administrado a las 30 semanas de edad, y de $0,46 \pm 0,27\%$ en el grupo C administrado a las 45 semanas de edad, respectivamente, y todas fueron significativamente inferiores en comparación con la del grupo control (análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el test de la t de Student, $p < 0,001$).

Ensayo 10

50 *Comparación del área de acumulación de A β -2*

Se dispusieron tres grupos constituidos cada uno por 4 ratones y se les proporcionó la administración oral del virus adeno-asociado del Ejemplo 2 ($5,0 \times 10^{11}$ del genoma vírico/ratón) una vez a las 15 semanas de edad (denominado en el presente documento como “grupo D”), a las 30 semanas de edad (denominado en el presente documento como “grupo E”) o a las 45 semanas de edad (denominado en el presente documento como “grupo F”). A continuación, se trataron los grupos individuales de la misma manera que en el Ejemplo de Ensayo 9 y se calculó la relación del área de acumulación de A β con el emplazamiento de medida individual. En la Figura 5 se muestran los resultados.

Las relaciones del área de acumulación de A β anteriormente mencionadas fueron de $0,39 \pm 0,27\%$ en el grupo D administrado a las 15 semanas de edad, $0,45 \pm 0,20\%$ en el grupo E administrado a las 30 semanas de edad, y de $0,37 \pm 0,20\%$ en el grupo F administrado a las 45 semanas de edad, respectivamente, y todas fueron significativamente inferiores en comparación con la del grupo control que se muestra en el Ejemplo de Ensayo 9 (análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el test de la t de Student, $p < 0,001$).

ES 2 345 151 T3

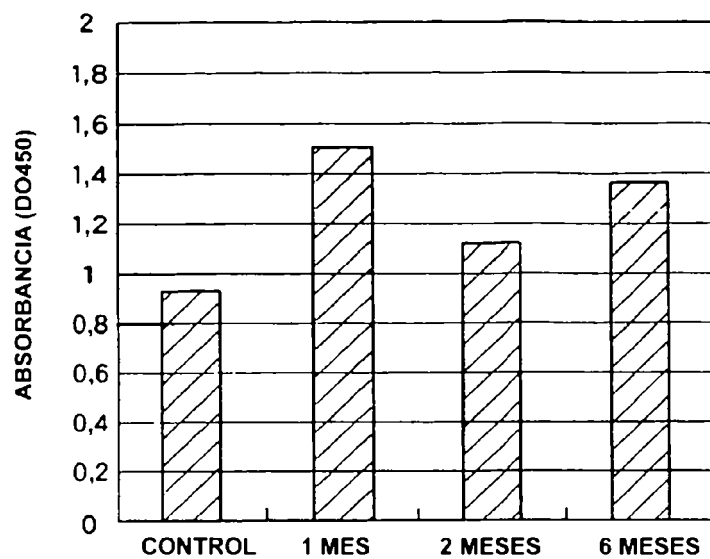
Ensayo 11

Medida de TGF- β 1

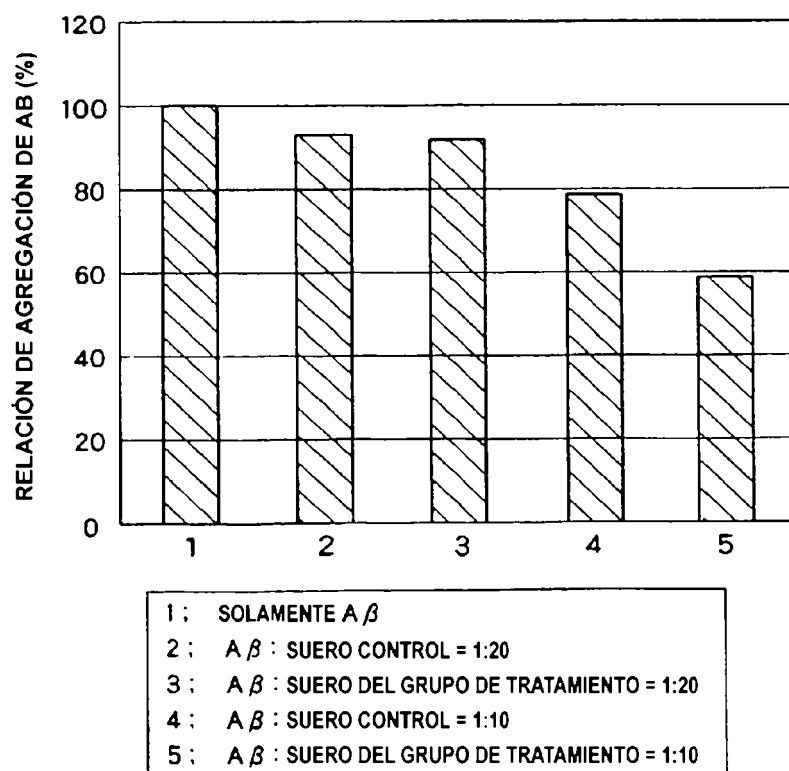
- 5 Se tomaron muestras de sangre procedentes de los ratones de cada grupo tras la disección en los Ejemplos de Ensayo 9 y 10 para obtener el suero. Se midió la concentración de TGF- β 1 en el suero de ratón mediante el procedimiento ELISA usando un kit de inmunoensayo de TGF- β 1 Quantikine de Ratón/Rata/Porcino (R & D Systems). En la Figura 6 se muestran los resultados.
- 10 La concentración de TGF- β en el suero de ratón fue de $111,6 \pm 40,0$ pg/ml en el grupo control. Por otra parte, la concentración fue de $80,5 \pm 12,9$ pg/ml en el grupo A, $76,0 \pm 6,3$ pg/ml en el grupo B, y de $74,3 \pm 21,0$ pg/ml en el grupo C, respectivamente, en el Ejemplo de Ensayo 9; los valores en todos los grupos fueron significativamente inferiores en comparación con el del grupo control (análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el test de la t de Student, $p < 0,001$).
- 15 Adicionalmente, la concentración fue de $99,4 \pm 21,2$ pg/ml en el grupo C, $80,2 \pm 17,2$ pg/ml en el grupo D, y $72,9 \pm 15,8$ pg/ml en el grupo E, respectivamente, en el Ejemplo de Ensayo 10; los valores en todos los grupos fueron significativamente inferiores en comparación con el del grupo control (análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el test de la t de Student, $p < 0,001$).
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un vector de virus adeno-asociado en la fabricación de un agente terapéutico para administración oral para expresar el péptido β -amiloide en células intestinales para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en el que el vector de virus adeno-asociado comprende ADN que codifica dicho péptido β -amiloide y ADN que codifica un péptido señal capaz de segregar extracelularmente dicho péptido β -amiloide, en una forma operativa.
- 10 2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho péptido β -amiloide comprende los aminoácidos 4 a 10 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2.
- 15 3. El uso según la reivindicación 1, en el que el ADN que codifica dicho péptido β -amiloide comprende los nucleótidos 10 a 30 de la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 1.
- 20 4. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho péptido β -amiloide comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2.
- 25 5. El uso según la reivindicación 1, en el que el ADN que codifica dicho péptido β -amiloide comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 1.
- 30 6. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho péptido β -amiloide comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4.
- 35 7. El uso según la reivindicación 1, en el que el ADN que codifica dicho péptido β -amiloide comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 3.
- 40 8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho péptido señal es un péptido señal de la proteína del precursor amiloide.
- 45 9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho péptido señal comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 6.
- 50 10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el ADN que codifica dicho péptido señal comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 5.
- 55 11. Una composición farmacéutica que comprende el vector de virus adeno-asociado que se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la administración oral para expresar el péptido β -amiloide en células intestinales para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.



F I G. 1



F I G. 2

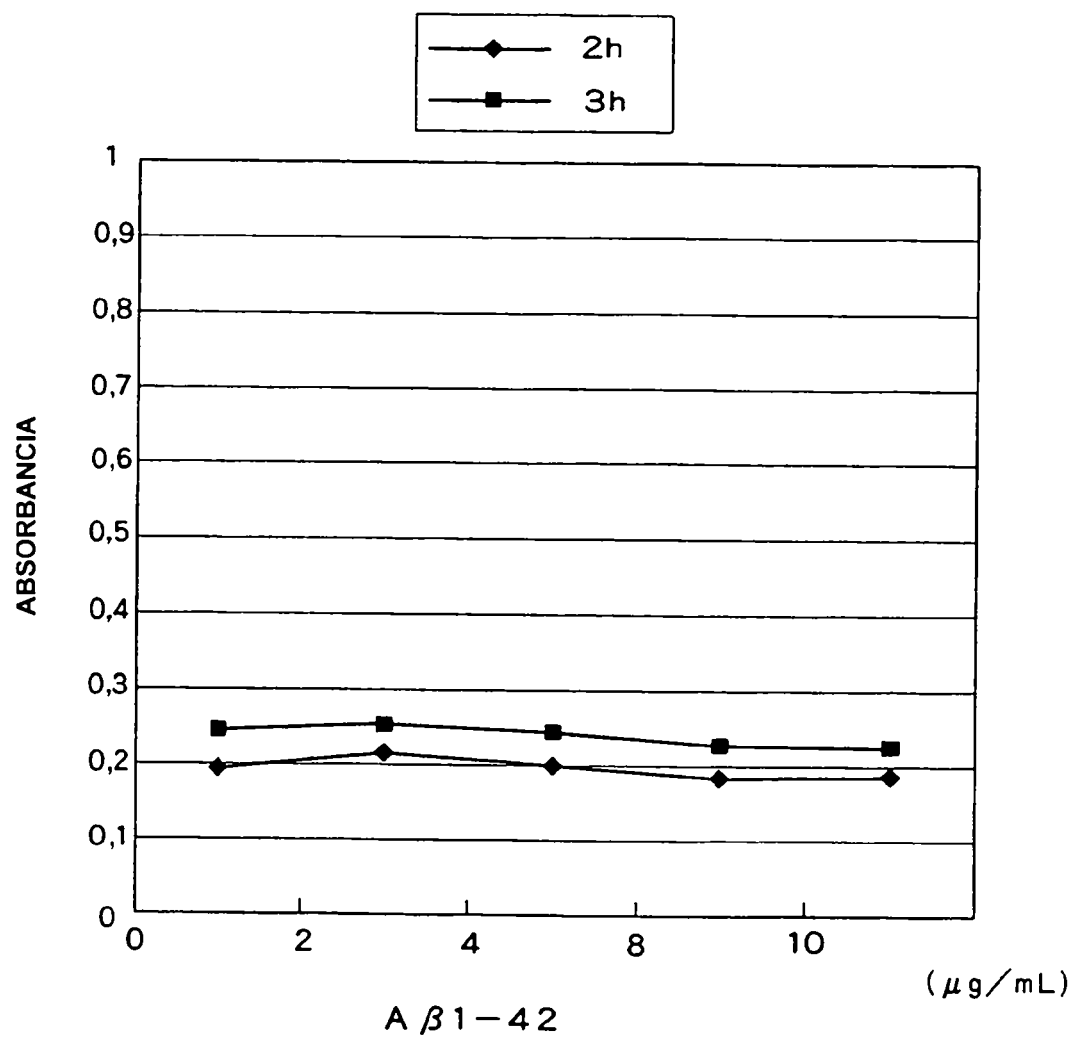


FIG. 3

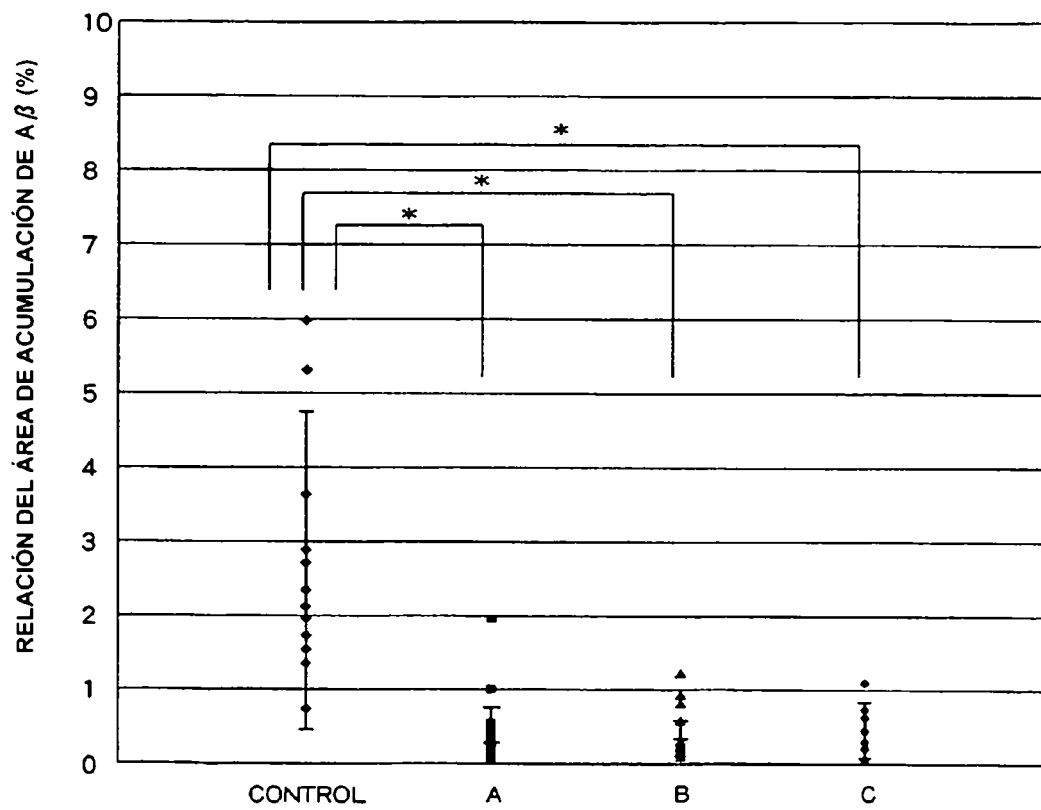


FIG. 4

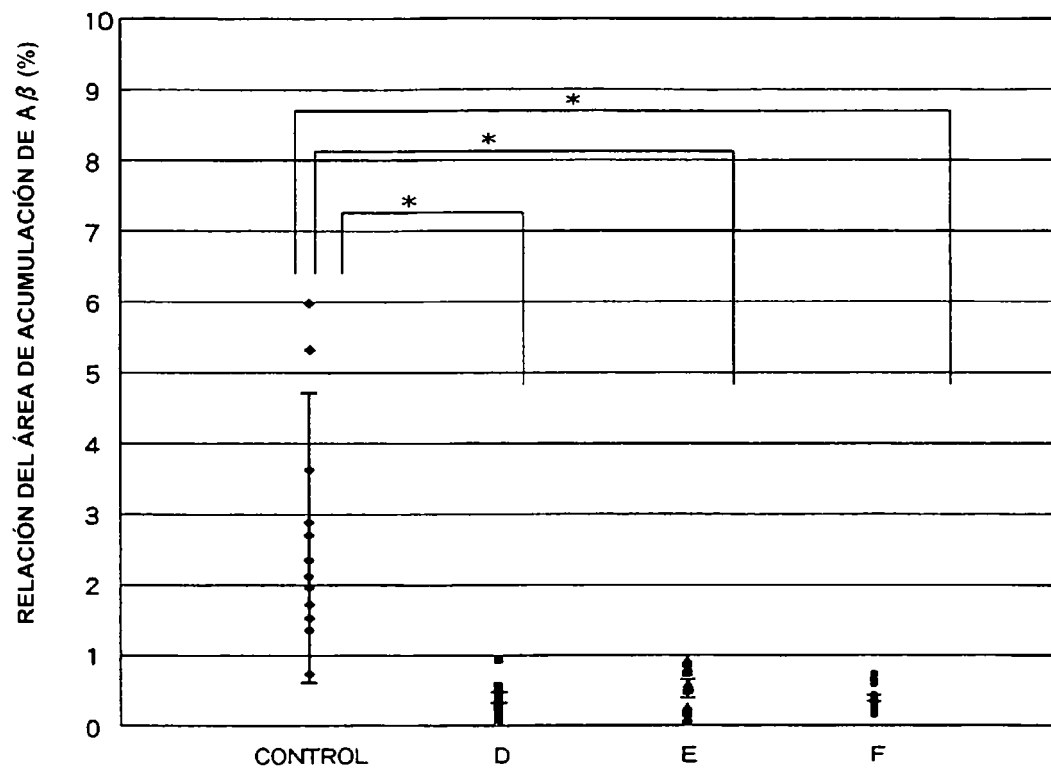


FIG. 5

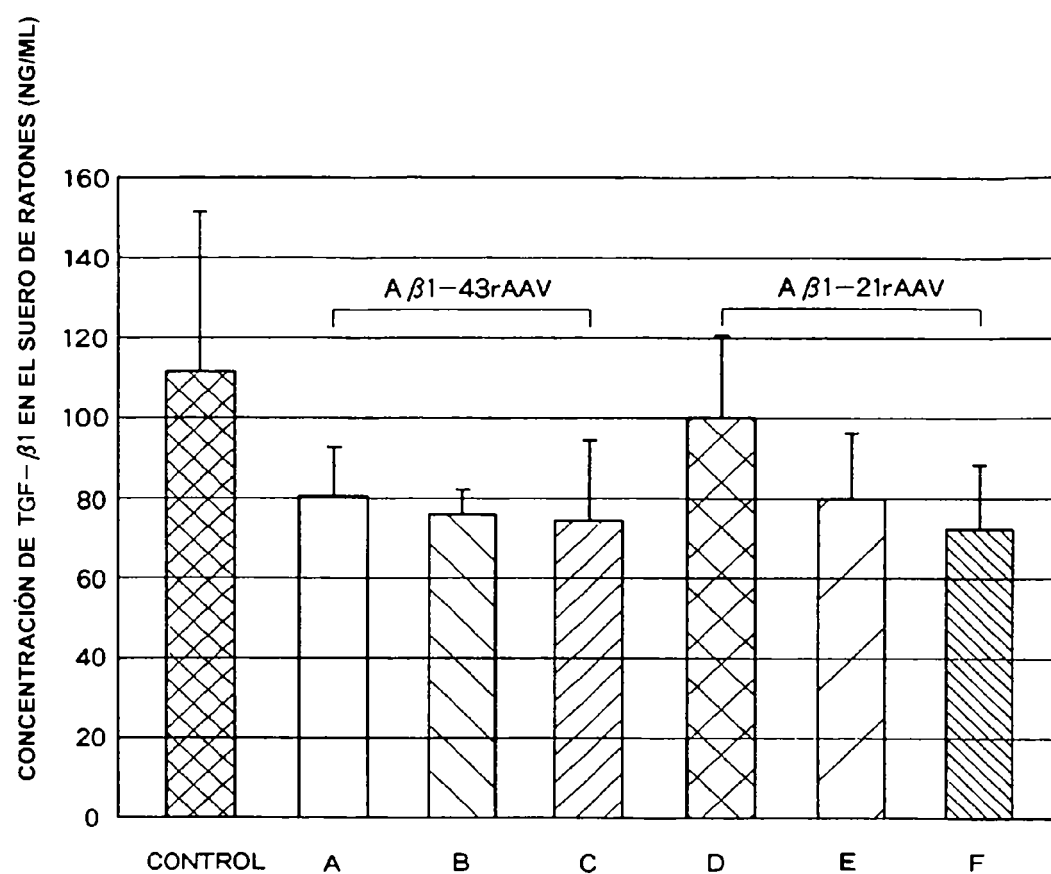


FIG. 6

ES 2 345 151 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> National Center for Geriatrics and Gerontology National Institute of Biomedical Innovation

5 <120> Vector de virus adeno-asociado recombinante para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer

<130> REG/G27266EP

10 <150> JP 2003/169714
<151> 13-06-2003

<150> JP 2003-371103

15 <151> 30-10-2003

<160> 19

20 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 129

25 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
30 <221> CDS
<222> (1)..(129)

<400> 1

35 gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa 48
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

40 ttg gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att 96
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

 gga ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca 129
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
 35 40

45 <210> 2
 <211> 43
 <212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

55 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu val His His Gln Lys
 1 5 10 15

60 Leu val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
 35 40

65 <210> 3
 <211> 63

ES 2 345 151 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(63)

10 <400> 3

gat	gca	gaa	ttc	cga	cat	gac	tca	gga	tat	gaa	gtt	cat	cat	caa	aaa	48
Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys	
1				5					10					15		

ttg	gtg	ttc	ttt	gca												63
Leu	Val	Phe	Phe	Ala												
			20													

<210> 4

20 <211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 4

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
1				5					10					15	

Leu	Val	Phe	Phe	Ala											
			20												

<210> 5

35 <211> 54

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(54)

45 <400> 5

atg	ctg	ccc	ggt	ttg	gca	ctg	ctc	ctg	ctg	gcc	gcc	tgg	acg	gct	cgg	48
Met	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Trp	Thr	Ala	Arg	
1				5					10					15		

gcg	ctt															54
Ala	Leu															

<210> 6

55 <211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60 <400> 6

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

Ala	Leu														
-----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

<210> 7

ES 2 345 151 T3

<211> 197
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Construcción de ADN
 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(8)
 <223> emplazamiento de reconocimiento Xba I
 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (9)..(191)
 20 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (9)..(62)
 25 <400> 7
 30 ggtctaga atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc tgg acg 50
 Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr
 1 5 10
 35 gct cgg gcg ctt gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt 98
 Ala Arg Ala Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
 15 20 25 30
 cat cat caa aaa ttg gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa 146
 His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 35 40 45
 40 ggt gca atc att gga ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg act 191
 Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
 50 55 60
 45 taagac 197
 <210> 8
 <211> 61
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Construcción Sintética
 60
 65

ES 2 345 151 T3

<400> 8

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

Ala Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
20 25 30

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

Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
50 55 60

<210> 9

<211> 137

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> construcción de ADN

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(10)

<223> emplazamiento de reconocimiento Not I

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(16)

<223> emplazamiento de reconocimiento Xba I

<220>

<221> CDS

<222> (17)..(133)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (17)..(70)

<400> 9

tggcggccgc tctaga atg ctg ccc ggt ttg gca ctg ctc ctg ctg gcc gcc 52
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala
1 5 10

tgg acg gct cgg gcg ctt gat gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat 100
Trp Thr Ala Arg Ala Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
15 20 25

gaa gtt cat cat caa aaa ttg gtg ttc ttt gct taag 137
Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
30 35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 345 151 T3

<220>
 <223> Construcción Sintética

5 <400> 10
 Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 1 5 10 15

10 Ala Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His
 20 25 30

15 Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
 35

<210> 11
 <211> 27

20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Cebador

<400> 11

30 gatgcagaat tccgacatga ctcagga 27

<210> 12
 <211> 28

35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> cebador

<400> 12

45 gtcttaagtc gctatgacaa caccgccc 28

<210> 13
 <211> 62

50 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 55 <223> Adaptador de la Secuencia Señal

<400> 13

60 ggtctagaat gctgcccggg ttggcactgc tctgctggc cgcttgagc gctcgggcgc 60
 tt 62

<210> 14
 <211> 61

65 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 345 151 T3

<220>

<223> Adaptador de la Secuencia Señal

5 <400> 14

agcgccccgag ccgtccaggc ggccagcagg agcagtgccca aaccgggcag cattctagac 60

c 61

10 <210> 15

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Cebador

20 <400> 15

ggtctagaat gctgcccggt ttggcac 27

25 <210> 16

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Cebador

35 <400> 16

tgcgggccgc tctagaatg 19

40 <210> 17

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

45

<220>

<223> Cebador

50 <400> 17

cacatcttaa gcaaagaaca cc 22

55 <210> 18

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

60

<220>

<223> Cebador

65

ES 2 345 151 T3

	<400> 18	
	agtgaccgt cagatcgc	18
5	<210> 19	
	<211> 18	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 19	
	cggtatcagc tcactcaa	18
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		