(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 830 350**

(51) Int. CI.:

C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2009 E 17182845 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3272773**

(54) Título: **Péptidos de dirección lisosómica y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

07.05.2008 US 51336 P
12.01.2009 US 144106 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2021

(73) Titular/es:

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
105 Digital Drive
Novato, CA 94949, US

(72) Inventor/es:

LEBOWITZ, JONATHAN y
MAGA, JOHN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Péptidos de dirección lisosómica y usos de los mismos

Referencia a las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N.º 61/051.336, presentada el 7 de mayo de 2008 y la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N.º 61/144.106, presentada el 12 de enero de 2009.

Antecedentes

Normalmente, las enzimas lisosómicas de mamífero se sintetizan en el citosol y atraviesan el RE donde se glucosilan con un carbohidrato ligado a N de tipo manosa elevado. En el Golgi, el carbohidrato de alto contenido de manosa se modifica en proteínas lisosómicas por la adición de manosa-6-fosfato (M6P) que dirige estas proteínas al lisosoma. Las proteínas modificadas con M6P se suministran al lisosoma a través de la interacción con cualquiera de los dos receptores de M6P. La forma más favorable de modificación es cuando se añaden dos M6P a un carbohidrato de alto contenido de manosa.

Más de 40 enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD) están causadas, directa o indirectamente, por la ausencia de una o más enzimas lisosómicas en el lisosoma. La terapia de remplazo enzimático para LSD se está persiguiendo activamente. La terapia generalmente requiere que se capten proteínas LSD y se suministren a los lisosomas de una diversidad de tipos celulares de un modo dependiente de M6P. Una estrategia posible implica purificar una proteína LSD y modificarla para que incorpore un resto de carbohidrato con M6P. Este material modificado puede captarse por las células de forma más eficaz que las proteínas LSD sin modificar debido a la interacción con receptores de M6P sobre la superficie celular.

Los inventores de la presente solicitud han desarrollado previamente una tecnología de dirección basada en péptidos que permite un suministro más eficaz de enzimas terapéuticas a los lisosomas. Esta tecnología patentada se llama Dirección Lisosómica Independiente de Glucosilación (GILT) porque una etiqueta peptídica remplaza M6P como el resto de dirección a los lisosomas. Los detalles de la tecnología GILT se describen en las Publicaciones de Solicitud de Estados Unidos n.º 2003-0082176, 2004-0006008, 2003-0072761, 2005-0281805, 2005-0244400 y las publicaciones internacionales WO 03/032913, WO 03/032727, WO 02/087510, WO 03/102583, WO 2005/078077.

El documento EP 1 436 316 desvela medios para administrar específicamente proteínas a un compartimento subcelular diana de una célula de mamífero.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a la alfa-glucosidasa ácida (GAA) humana de tipo silvestre; un resto de dirección lisosómica, en donde el resto de dirección lisosómica es una muteína IGF-II que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 1), con una mutación dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 de la SEQ ID NO: 1 de modo que dicha mutación anula al menos un sitio de escisión por proteasa furina, donde la muteína IGF-II es (a) resistente a la escisión con furina, (b) tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de insulina respecto a la afinidad de IGF-II humana de origen natural por el receptor de insulina y (c) se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes humano de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

La muteína IGF-II puede comprender una deleción de los aminoácidos 30-40 de la SEQ ID NO: 1.

La mutación puede ser una sustitución de aminoácidos en una posición que corresponde a Arg37 de SEQ ID NO:1. La sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución Lys o Ala.

La muteína IGF-II puede tener afinidad de unión disminuida por el receptor IGF-I relacionada con la afinidad del receptor IGF-II humano de origen natural por el receptor IGF-I.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el ácido nucleico del primer aspecto en donde la proteína de fusión comprende además los aminoácidos 70-952 de GAA humana. La proteína de fusión puede comprender además un espaciador entre los aminoácidos 70-952 de GAA humana y la muteína IGF-II. El espaciador puede comprender una secuencia de aminoácidos Gly-Ala-Pro.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula aislada que contiene el ácido nucleico del primer aspecto.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una célula aislada que contiene el ácido nucleico del segundo aspecto.

La presente invención proporciona composiciones mejoradas adicionales para la dirección lisosómica eficaz basada en la tecnología GILT. Entre otras cosas, la presente invención proporciona composiciones para dirigir enzimas lisosómicas a los lisosomas usando péptidos de dirección lisosómica resistentes a furina. La presente invención también proporciona composiciones para dirigir enzimas lisosómicas a los lisosomas usando un péptido de dirección lisosómica que tiene afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina. La presente invención abarca el descubrimiento inesperado de que péptidos de dirección lisosómica resistentes a furina tienen afinidad de unión reducida por el receptor de insulina.

Se desvela en el presente documento una muteína IGF-II resistente a furina. Se desvela en el presente documento una muteína IGF-II resistente a furina que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 1) y una mutación que anula al menos un sitio de escisión por proteasa furina.

Se desvela en el presente documento una muteína IGF-II que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 1) y una mutación que reduce o disminuye la afinidad de unión por el receptor de insulina en comparación con la IGF-II humana de tipo silvestre.

La muteína IGF-II resistente a furina puede tener afinidad de unión disminuida por el receptor IGF-I con respecto a la afinidad de la IGF-II humana de origen natural por el receptor IGF-I.

Se desvela en el presente documento una proteína de fusión terapéutica dirigida que contiene una enzima lisosómica; y una muteína IGF-II que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 1), donde la muteína IGF-II es resistente a la escisión por furina y se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes humano de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

Se desvela en el presente documento una proteína de fusión terapéutica dirigida que contiene una enzima lisosómica; y una muteína IGF-II que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 1) que tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de insulina respecto a la afinidad de IGF-II humana de origen natural por el receptor de insulina; donde la muteína IGF-II se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes humano de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

Se desvela en el presente documento una proteína de fusión terapéutica dirigida que contiene una enzima lisosómica; y una muteína IGF-II que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 1) que tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de insulina respecto a la afinidad de IGF-II humana de origen natural por el receptor de insulina; donde la muteína IGF-II es resistente a la escisión por furina y se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes humano de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

El ácido nucleico de la invención incluye una mutación dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 de la SEQ ID NO: 1 de modo que la mutación anula al menos un sitio de escisión por proteasa furina. En algunas realizaciones, una mutación adecuada es una sustitución, deleción y/o inserción de aminoácido. En algunas realizaciones, la mutación es una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a Arg37 o Arg40 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es una sustitución de Lys o Ala.

Una mutación adecuada puede ser una deleción o remplazo de restos de aminoácido correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40, 34-40 de la SEQ ID NO: 1 y combinaciones de las mismas.

La muteína IGF-II puede contener adicionalmente una deleción o un remplazo de aminoácidos correspondientes a las posiciones 2-7 de la SEQ ID NO: 1. La muteína IGF-II puede incluir adicionalmente una deleción o un remplazo de aminoácidos correspondientes a las posiciones 1-7 de la SEQ ID NO: 1. La muteína IGF-II puede contener adicionalmente una deleción o un remplazo de aminoácidos correspondientes a las posiciones 62-67 de la SEQ ID NO: 1. La muteína IGF-II puede contener adicionalmente una sustitución de aminoácidos en una posición correspondiente a Tyr27, Leu43, o Ser26 de la SEQ ID NO: 1. La muteína IGF-II puede contener al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Tyr27Leu, Leu43Val, Ser26Phe y combinaciones de las mismas. La muteína IGF-II puede contener aminoácidos correspondientes a las posiciones 48-55 de la SEQ ID NO: 1. La muteína IGF-II puede contener al menos tres aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los aminoácidos correspondientes a las posiciones 8, 48, 49, 50, 54 y 55 de la SEQ ID NO: 1. La muteína IGF-II puede contener, en las posiciones correspondientes a las posiciones 54 y 55 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos cada uno de los cuales está sin cargar a cargado negativamente a pH 7,4. En algunas realizaciones, la muteína IGF-II tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de IGF-I respecto a la afinidad de IGF-II humana de origen natural por el receptor de IGF-I.

La enzima lisosómica puede ser alfa-glucosidasa ácida (GAA) humana o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, una enzima lisosómica adecuada para la invención incluye los aminoácidos 70-952 de GAA humana.

En algunas realizaciones, una proteína de fusión terapéutica dirigida adecuada para la invención incluye adicionalmente un espaciador entre la enzima lisosómica y la muteína IGF-II resistente a furina. En algunas realizaciones, el espaciador contiene una secuencia de aminoácidos Gly-Ala-Pro.

La presente invención proporciona adicionalmente diversas células que contienen el ácido nucleico de la invención.

Se desvelan en el presente documento composiciones farmacéuticas adecuadas para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico, que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión terapéutica dirigida de la invención. Se desvelan en el presente documento métodos de tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico, que comprenden administrar a un sujeto que necesita tratamiento una proteína de fusión terapéutica dirigida de acuerdo con la invención. La enfermedad de almacenamiento lisosómico puede ser enfermedad de Pompe. La enfermedad de almacenamiento lisosómico puede ser enfermedad de Fabry. La enfermedad de almacenamiento lisosómico puede ser enfermedad de Gaucher.

Se desvela en el presente documento un método de producción de una proteína de fusión terapéutica dirigida, que incluye una etapa de cultivo de células de mamífero en un medio de cultivo celular, donde las células de mamífero portan el ácido nucleico de la invención, en particular, como se describe en diversas realizaciones en el presente documento; y el cultivo se realiza en condiciones que permitan la expresión de la proteína de fusión terapéutica dirigida.

Se desvela en el presente documento un método de producción de una proteína de fusión terapéutica dirigida, que incluye una etapa de cultivo de células deficientes de furina (por ejemplo, células de mamífero deficientes de furina) en un medio de cultivo celular, donde las células deficientes de furina portan un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una enzima lisosómica y una muteína IGF-II que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 1), donde la muteína IGF-II se une al receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes de una manera independiente de manosa-6-fosfato; y donde el cultivo se realiza en condiciones que permiten la expresión de la proteína de fusión terapéutica dirigida.

Otras características, objetos y ventajas de la presente invención serán evidentes en la descripción detallada a continuación. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, aunque indica realizaciones de la presente invención, se da a modo de ilustración solamente, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención llegarán a ser evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos son con fines de ilustración solamente, no para limitación.

La Fig. 1 ilustra un mapa del extremo N-terminal de ZC-701. Dos restos de aminoácido en recuadro son sitios de eventos de escisión. El primero es el sitio de la escisión del péptido señal, el segundo es el sitio de escisión con furina.

La Fig. 2 ilustra un análisis SDS-PAGE ejemplar de ZC-701 después de tratamiento con PNGasa F. El carril en la derecha se ha tratado adicionalmente con furina.

Fig. 3 Izquierda: Ilustración esquemática de mutantes ZC-701 ejemplares en que el sitio de escisión con furina está modificado. Centro: Análisis SDS-PAGE ejemplar de mutantes tratados con PNGasa después de 3-7 días de cultivo celular. Derecha: Análisis SDS-PAGE ejemplar de mutantes tratados con PNGasa tratados con furina.

La Fig. 4 ilustra los resultados de unión al receptor de IGF-II competitivo ejemplar.

La Fig. 5 ilustra los resultados de unión al receptor de IGF-II competitivo ejemplar adicionales.

La Fig. 6 ilustra los resultados del ensayo de competición con el receptor de insulina ejemplar.

La Fig. 7 ilustra los resultados del ensayo de competición con el receptor de IGF-I ejemplar.

La Fig. 8 ilustra los resultados ejemplares de cierto ensayo de unión al receptor de insulina.

La Fig. 9 ilustra los resultados ejemplares de cierto ensayo de unión al receptor de insulina.

La Fig. 10 ilustra el análisis ejemplar de GAA etiquetada con GILT parcialmente purificada de transfecciones transitorias. Se transfectaron células HEK293 con las construcciones 1479, 1487 o ZC-701. Después de la recolección, los sobrenadantes de cultivo se purificaron parcialmente por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Todas las muestras se trataron con PNGasa antes de la electroforesis. Paneles de la izquierda: SDS-PAGE de proteínas purificadas parcialmente. ZC-701 B12 purificada se muestra como control. Paneles de la derecha: Análisis de inmunotransferencia de las proteínas purificadas parcialmente. Se usó el anticuerpo primario indicado.

Los paneles inferiores se trataron adicionalmente con furina exógena. La proteína codificada por la construcción 1487 es idéntica en secuencia a la codificada por la construcción 1461 (R37A). La proteína codificada por la construcción 1479 es idéntica a la codificada por la construcción 1459 (R37K).

La Fig. 11 ilustra los resultados ejemplares de captación de la GAA etiquetada con GILT resistente a furina ejemplar en mioblastos de rata L6. Las $K_{captación}$ para la proteína 1479, 1487, ZC-701 y ZC-701 purificada con 4,5 nM, 4,4 nM, 5.0 nM y 2,6 nM, respectivamente. La proteína codificada por la construcción 1487 es idéntica en secuencia a la codificada por la construcción 1461 en la figura 3 (R37A). La proteína codificada por la construcción 1479 es idéntica a la codificada por la construcción 1459 en la figura 3 (R37K).

Definiciones

Mejora: Como se usa en el presente documento, el término "mejora" significa la prevención, reducción o paliación de un estado, o la mejora del estado de un sujeto. Mejora incluye, aunque no requiere, recuperación completa o prevención completa de una afección patológica. La mejora puede incluir la reducción de materiales acumulados dentro de los lisosomas de tejidos enfermos relevantes.

Muteína IGF-II resistente a furina: Como se usa en el presente documento, la expresión "muteína IGF-II resistente a furina" se refiere a un péptido basado en IGF-II que contiene una secuencia alterada de aminoácidos que anula al menos un sitio de escisión proteasa furina nativo o cambia una secuencia cerca o adyacente de un sitio de escisión con proteasa furina nativo de modo que se evita, inhibe, reduce o ralentiza la escisión con furina en comparación con un péptido IGF-II humano de tipo silvestre. Como se usa en el presente documento, una muteína IGF-II resistente a furina también se denomina una muteína IGF-II que es resistente a furina.

Sitio de escisión con proteasa furina: Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de escisión con proteasa furina" (también denominado "sitio de escisión con furina" o "secuencia de escisión con furina") se refiere a la secuencia de aminoácidos de un péptido o proteína que sirve como secuencia de reconocimiento para la escisión con proteasa enzimática por furina o proteasas de tipo furina. Típicamente, un sitio de escisión con proteasa furina tiene una secuencia consenso Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 2), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión está situado después del resto de arginina (Arg) carboxiterminal en la secuencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión con furina puede tener una secuencia consenso Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 3), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión está situado después del resto de arginina (Arg) carboxiterminal en la secuencia.

Furina: Como se usa en el presente documento, el término "furina" se refiere a cualquier proteasa que puede reconocer y escindir el sitio de escisión con proteasa furina como se define en el presente documento, incluyendo furina o proteasa de tipo furina. Furina también se conoce como enzima de escisión de aminoácido básico emparejado (PACE). La furina pertenece a la familia de proproteína convertasa de tipo subtilisina. El gen que codifica la furina se conoció como FUR (región en dirección 5' de FES).

Células deficientes de furina: Como se usa en el presente documento, la expresión "células deficientes de furina" se refiere a cualquier célula cuya actividad proteasa furina está inhibida, reducida o eliminada. Las células deficientes de furina incluyen tanto células de mamífero como células que no son de mamífero que no producen furina o producen una cantidad reducida de furina o proteasa furina defectuosa.

Dirección lisosómica independiente de glucosilación: Como se usa en el presente documento, la expresión "dirección lisosómica independiente de glucosilación" (también denominada "GILT") se refiere a dirección lisosómica que es independiente de manosa-6-fosfato.

Alfa-glucosidasa ácida humana: Como se usa en el presente documento, la expresión "alfa-glucosidasa ácida humana" (también denominada "GAA") se refiere a la forma de tipo silvestre precursora de GAA humana o una variante funcional que es capaz de reducir los niveles de glucógeno en lisosomas de mamífero o que puede reducir o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de Pompe.

Mejorar, aumentar o reducir: Como se usan en el presente documento, los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", o equivalentes gramaticales, indican valores que son relativos a una medición basal, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en el presente documento, o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un "individuo de control" es un individuo afectado con la misma forma de enfermedad de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, la enfermedad de Pompe) que el individuo que se está tratando, que es aproximadamente de la misma edad que el individuo que se está tratando (para asegurar que las fases de la enfermedad en el individuo tratado y el individuo o individuos de control son comparables).

Individuo, sujeto, paciente: Como se usan en el presente documento, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" se refieren a un sujeto ser humano o un mamífero no humano. El individuo (también denominado "paciente" o "sujeto") que se está tratando es un individuo (feto, lactante, niño, adolescente o ser humano adulto) que padece una enfermedad de almacenamiento lisosómico, por ejemplo, enfermedad de Pompe (es decir, enfermedad de Pompe de

aparición infantil, juvenil o en el adulto) o que tiene el potencial de desarrollar una enfermedad de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, enfermedad de Pompe).

Enfermedades de almacenamiento lisosómico: Como se usa en el presente documento, "enfermedades de almacenamiento lisosómico" se refiere a un grupo de trastornos genéticos que resultan de la deficiencia de al menos una de las enzimas (por ejemplo, hidrolasas ácidas) que son necesarias para descomponer las macromoléculas en péptidos, aminoácidos, monosacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos en los lisosomas. Como resultado, los individuos que padecen enfermedades de almacenamiento lisosómico tienen materiales acumulados en los lisosomas. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico ejemplares se enumeran en la tabla 1.

Enzima lisosómica: Como se usa en el presente documento, la expresión "enzima lisosómica" se refiere a cualquier enzima que es capaz de reducir los materiales acumulados en lisosomas de mamífero o que puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enzimas lisosómicas adecuadas para la invención incluyen enzimas lisosómicas tanto de tipo silvestre como modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes y sintéticos o purificarse de fuentes naturales. Las enzimas lisosómicas ejemplares se enumeran en la Tabla 1.

Espaciador: Como se usa en el presente documento, el término "espaciador" (también denominado "enlazador") se refiere a una secuencia peptídica entre dos restos de proteína en una proteína de fusión. Un espaciador generalmente se diseña para que sea flexible o para interponer una estructura, tal como una hélice alfa, entre los dos restos de proteína. Un espaciador puede ser relativamente corto tal como la secuencia Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 4) o Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 5), o puede ser más largo tal como, por ejemplo, 10-25 aminoácidos de longitud.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína de fusión terapéutica dirigida que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado, a una relación razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por algún ensayo o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). En particular, la "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una proteína de fusión terapéutica o composición eficaz para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para mostrar un efecto terapéutico o preventivo detectable, tal como mejorando los síntomas asociados a la enfermedad, previniendo o retardando la aparición de la enfermedad y/o también disminuyendo la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz habitualmente se administra en un régimen de dosificación que puede comprender múltiples dosis unitarias. Para cualquier proteína de fusión terapéutica particular, una cantidad terapéuticamente eficaz (y/o una dosis unitaria apropiada en un régimen de dosificación eficaz) puede variar, por ejemplo, dependiendo de la vía de administración, en combinación con otros agentes farmacéuticos. También, la cantidad terapéuticamente eficaz específica (y/o dosis unitaria) para cualquier paciente particular puede depender de una diversidad de factores, incluyendo el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del agente farmacéutico específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, género y dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración y/o la tasa de excreción o metabolismo de la proteína de fusión específica empleada; la duración del tratamiento; y factores similares que son bien conocidos en las técnicas médicas.

Tratamiento: Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" (también "tratar" o "tratando") se refiere a cualquier administración de una proteína de fusión terapéutica que alivia, mejora, mitiga, inhibe, retrasa la aparición de, reduce la gravedad de y/o reduce la incidencia parcial o completamente de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. Dicho tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o de un sujeto que muestra solamente signos prematuros de la enfermedad, trastorno y/o afección. Como alternativa o adicionalmente, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que muestra uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. Por ejemplo, el tratamiento puede referirse a mejora del estado cardíaco (por ejemplo, aumento del volumen final diastólico y/o el volumen final sistólico, o reducción, mejora o prevención de la cardiomiopatía progresiva que se encuentra típicamente en enfermedad de Pompe) o de la función pulmonar (por ejemplo, aumento en la capacidad vital de llorar sobre la capacidad basal, y/o normalización de la desaturación de oxígeno durante el llanto); mejora en el neurodesarrollo y/o las habilidades motoras (por ejemplo, aumento en el valor AIMS); reducción de los niveles de glucógeno en tejido del individuo afectado por la enfermedad; o cualquier combinación de estos efectos. El tratamiento puede incluir mejora de la eliminación de glucógeno, particularmente en la reducción o prevención de la cardiomiopatía asociada con la enfermedad de Pompe.

Los términos "alrededor de" y "aproximadamente" se usan como equivalentes. Cualquier número usado en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente se entiende cubriendo cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la materia relevante.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona composiciones mejoradas para dirigir enzimas lisosómicas basándose en la tecnología de dirección lisosómica independiente de glucosilación (GILT). Se desvelan en el presente documento

muteínas IGF-II que son resistentes a furina y/o tienen afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina y proteínas de fusión terapéuticas dirigidas que contienen una muteína IGF-II de la invención. También se desvelan métodos de preparación y uso de las mismas.

Se describen en detalle diversos aspectos de la invención en las siguientes secciones. El uso de las secciones no pretende limitar la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" salvo que se indique lo contrario.

Enzimas lisosómicas

Una enzima lisosómica desvelada en el presente documento incluye cualquier enzima que sea capaz de reducir los materiales acumulados en lisosomas de mamífero o que pueda rescatar o mejorar uno o más síntomas de enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enzimas lisosómicas adecuadas incluyen enzimas lisosómicas tanto de tipo silvestre como modificadas y pueden producirse usando métodos recombinantes o sintéticos o pueden purificarse de fuentes naturales. Las enzimas lisosómicas ejemplares se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1. Enfermedades de almacenamiento lisosómico y defectos enzimáticos asociados

A. Trastornos de glucogenosis		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Enfermedad de Pompe	Ácido-a1,4-glucosidasa	Oligosacáridos enlazados a glucógeno α 1-4
B. Trastornos de glucolipidosis		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Gangliosidosis GM1	β-galactosidasa	Gangliósidos GM_1
Enfermedad de Tay-Sachs	β-hexosaminidasa A	Gangliósidos GM_2
Gangliosidosis GM2: variante AB	Proteína activadora GM_2	Gangliósidos GM_2
Enfermedad de Sandhoff	β-hexosaminidasa A y B	Gangliósidos GM_2
Enfermedad de Fabry	α-galactosidasa A	Globósidos
Enfermedad Gaucher	Glucocerebrosidasa	Glucosilceramida
Leucodistrofia metacromática	Arilsulfatasa A	Sulfátidos
Enfermedad de Krabbe	Galactosilceramidasa	Galactocerebrósido
Niemann-Pick, tipos A y B	Ácido esfingomielinasa	Esfingomielina
Niemann-Pick, tipo C	Defecto de esterificación del colesterol	Esfingomielina
Niemann-Pick, tipo D	Desconocido	Esfingomielina
Enfermedad de Farber	Ácido ceramidasa	Ceramida
Enfermedad de Wolman	Ácido lipasa	Ésteres de colesterilo
C. Trastornos de mucopolisacárido		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Sindroma de Hurler (MPS IH)	α-L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Síndrome de Scheie (MPS IS)	α-L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Hurler-Scheie (MPS IH/S)	α-L-iduronidasa	Heparán y dermatán sulfatos
Síndrome de Hunter (MPS II)	Iduronato sulfatasa	Heparán y dermatán sulfatos
Sanfilippo A (MPS IIIA)	Heparán N-sulfatasa	Heparán sulfato
Sanfilippo B (MPS IIIB)	α-N-acetilglucosaminidasa	Heparán sulfato
Sanfilippo C (MPS IIIC)	Acetil-CoA-glucosamínido acetiltransferasa	Heparán sulfato
Sanfilippo D (MPS IIID)	N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparán sulfato
Morquio A (MPS IVA)	Galactosamina-6-sulfatasa	Queratán sulfato
Morquio B (MPS IVB)	β-galactosidasa	Queratán sulfato
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arilsulfatasa B	Dermatán sulfato
Síndrome de Sly (MPS VII)	β-glucuronidasa	
D. Trastornos de oligosacárido/glucoproteína		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
α-manosidosis	α-manosidasa	Manosa/oligosacáridos
β-manosidosis	β-manosidasa	Manosa/oligosacáridos
Fucosidosis	α-L-fucosidasa	Oligosacáridos de fucosilo
Aspartilglucosaminuria	N-aspartil-β-glucosaminidasa	Aspartilglucosamina asparaginas

(continuación)

D. Trastornos de oligosacárido/glucoproteína		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
http://www.mannosidosis.org/disorders.htm Sialidosis (Mucolipidosis I)	α-neuraminidasa	Sialiloligosacáridos
Galactosialidosis (Síndrome de Goldberg)	Deficiencia de proteína protectora lisosómica	Sialiloligosacáridos
Enfermedad de Schindler	α-N-acetil-galactosaminidasa	
E. Trastornos de transporte de enzimas lisosómicas		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Mucolipidosis II (Enfermedad de células I)	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa	Heparán sulfato
Mucolipidosis III (Pseudopolidistrofia de Hurler)	Igual que ML II	
F. Trastornos del transporte de membrana lisosómica		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Cistinosis	Proteína de transporte de cistina	Cistina libre
Enfermedad de Salla	Proteína de transporte de ácido siálico	Ácido siálico y ácido glucurónico libre
Enfermedad infantil de almacenamiento de ácido siálico	Proteína de transporte de ácido siálico	Ácido siálico y ácido glucurónico libre
G. Otros		
Nombre de la enfermedad	Defecto enzimático	Sustancia almacenada
Enfermedad de Batten (Lipofuscinosis ceroide neuronal juvenil)	Desconocido	Lipofuscinas
Lipofuscinosis ceroide neuronal infantil	Palmitoil-proteína tioesterasa	Lipofuscinas
Mucolipidosis IV	desconocido	Gangliósidos y ácido hialurónico
Prosaposina	Saposinas A, B, C o D	

Se desvelan en el presente documento enzimas lisosómicas con una secuencia polipeptídica que tiene un 50-100 %, incluyendo un 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia polinucleotídica de origen natural de una enzima humana mostrada en la Tabla 1, que codifica aún al mismo tiempo una proteína que es capaz de reducir los materiales acumulados en lisosomas de mamífero o que puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de enfermedad de almacenamiento lisosómico.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de la enzima lisosómica se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácido en la secuencia de la enzima humana de origen natural, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que pertenecen a las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando un software informático disponible al público tal como el software BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se está comparando. Preferentemente, se usa el software WU-BLAST-2 para determinar la identidad de secuencia de aminoácidos (Altschul *et al*., Methods in Enzymology 266, 460-480 (1996); http://blast.wustl/edulblast/README.html). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se configuran a los valores por defecto. Los parámetros ajustables se configuran con los siguientes valores: tramo de solapamiento=1, fracción de solapamiento=0,125, umbral mundial (T)=11. La puntuación HSP (S) y los parámetros HSP S2 son valores dinámicos y se establecen por el propio programa, dependiendo de la composición de la secuencia particular, sin embargo, los valores mínimos pueden ajustarse y se configuran como se indica anteriormente.

Enfermedad de Pompe

Una enfermedad de almacenamiento lisosómico ejemplar es la enfermedad de Pompe. La enfermedad de Pompe es un trastorno genético poco común causado por una deficiencia en la enzima alfa-glucosidasa ácida (GAA), que es necesaria para descomponer el glucógeno, una forma almacenada de azúcar usada para la energía. La enfermedad de Pompe también se conoce como enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II, GSD II, enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II, glucogenosis de tipo II, deficiencia de maltasa ácida, deficiencia de alfa-1,4-glucosidasa, cardiomegalia glucogénica difusa y forma cardíaca de glucogenosis generalizada. La acumulación del

glucógeno causa debilidad muscular progresiva (miopatía) en todo el organismo y afecta a diversos tejidos corporales, particularmente en el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado, el sistema respiratorio y nervioso.

Las manifestaciones clínicas que se presentan de la enfermedad de Pompe pueden variar ampliamente dependiendo de la edad de aparición de la enfermedad y la actividad GAA residual. La actividad GAA residual se correlaciona tanto con la cantidad como con la distribución tisular de la acumulación de glucógeno, así como la gravedad de la enfermedad. La enfermedad de Pompe de aparición infantil menos del 1 % de la actividad GAA normal) es la forma más grave y se caracteriza por hipotonía, debilidad muscular generalizada y cardiomiopatía hipertrófica, y acumulación masiva de glucógeno en el tejido cardíaco y otros tejidos musculares. Habitualmente se produce muerte al año del nacimiento debido a insuficiencia cardiorrespiratoria. Hirschhorn *et al*. (2001) "Glycogen Storage Disease Type II: Acid Alpha-glucosidase (Acid Maltase) Deficiency," en Scriver *et al*., eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8.ª ed., Nueva York: McGraw-Hill, 3389-3420. La enfermedad de Pompe de aparición juvenil (un 1-10 % de actividad GAA normal) y de aparición en el adulto (un 10-40 % de actividad GAA normal) es clínicamente más heterogénea, con una variación mayor en la edad de aparición, la presentación clínica y la progresión de la enfermedad. La enfermedad de Pompe de aparición juvenil y en el adulto generalmente se caracteriza por ausencia de afectación cardíaca grave, edad tardía de aparición y progresión más lenta de la enfermedad, pero la afectación final de músculos respiratorios o de las extremidades provoca morbilidad y mortalidad significativas. Aunque la esperanza de vida puede variar, la muerte generalmente se produce debido a insuficiencia respiratoria. Hirschhorn *et al*. (2001) "Glycogen Storage Disease Type II: Acid Alpha-glucosidase (Acid Maltase) Deficiency," en Scriver *et al*., eds., The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8.ª ed., Nueva York: McGraw-Hill, 3389-3420.

Una enzima GAA adecuada para tratar la enfermedad de Pompe incluye una GAA humana de tipo silvestre o un fragmento o variante de secuencia de la misma que retiene la capacidad de escindir los enlaces α1-4 en oligosacáridos lineales.

Terapia de remplazo enzimático

La terapia de remplazo enzimático (ERT) es una estrategia terapéutica para corregir una deficiencia enzimática infundiendo la enzima ausente en el torrente sanguíneo. Según la sangre perfunde los tejidos del paciente, la enzima se capta por las células y se transporta al lisosoma, donde la enzima actúa eliminando el material que se ha acumulado en los lisosomas debido a la deficiencia enzimática. Para que la terapia de remplazo de enzimas lisosómicas sea eficaz, la enzima terapéutica debe suministrarse a los lisosomas en las células apropiadas en los tejidos donde se manifiesta el defecto de almacenamiento. Los agentes terapéuticos convencionales de remplazo de enzimas lisosómicas se suministran usando carbohidratos unidos de forma natural a la proteína para acoplarse con receptores específicos en la superficie de las células diana. Un receptor, el receptor de M6P independiente de cationes (CI-MPR), es particularmente útil para dirigir enzimas lisosómicas de remplazo porque el CI-MPR está presente en la superficie de la mayoría de tipos celulares.

Las expresiones "receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR)", "receptor de M6P/IGF-II", "receptor de CI-MPR/IGF-II", "receptor de IGF-II " o "receptor de IGF2", o abreviaturas de las mismas se usan de forma intercambiable en el presente documento, que hacen referencia al receptor celular que se une a M6P e IGF-II.

Dirección lisosómica independiente de glucosilación

Se ha desarrollado una tecnología de dirección lisosómica independiente de glucosilación (GILT) para dirigir enzimas terapéuticas a los lisosomas. Específicamente, la tecnología GILT usa una etiqueta peptídica en lugar de M6P para acoplarse con el CI-MPR para dirección lisosómica. Típicamente, una etiqueta GILT es una proteína, péptido u otro resto que se une al CI-MPR de una manera independiente de manosa-6-fosfato. De forma ventajosa, esta tecnología imita el mecanismo biológico normal para captar enzimas lisosómicas, aunque haciéndolo de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

Una etiqueta GILT preferida deriva del factor II de crecimiento de tipo insulina humano (IGF-II). El IGF-II humano es un ligando de afinidad para el CI-MPR, que también se menciona como receptor de IGF-II. La unión de las enzimas terapéuticas etiquetadas con GILT al receptor de M6P/IGF-II dirige la proteína al lisosoma a través de la ruta endocítica. Este método tiene numerosas ventajas sobre los métodos que implican la glucosilación, incluyendo simplicidad y rentabilidad, porque una vez la proteína se ha aislado no es necesario hace modificaciones adicionales.

Puede encontrarse una descripción detallada de la tecnología GILT y la etiquetar GILT en las publicaciones de Estados Unidos n.º 20030082176, 20040006008, 20040005309, y 20050281805.

Etiqueta GILT resistente a furina

Durante el curso del desarrollo de enzimas lisosómicas etiquetadas con GILT para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico, ha llegado a ser evidente que la etiqueta GILT derivada de IGF-II puede someterse a escisión proteolítica por furina durante la producción en células de mamífero (véase la sección de ejemplos). La proteasa furina típicamente reconoce y escinde un sitio de escisión que tiene una secuencia consenso Arg-X-X-Arg

(SEQ ID NO: 2), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión está colocado después del resto de arginina (Arg) carboxiterminal en la secuencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión por furina tiene una secuencia consenso Lys/Arg-X-X-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO: 3), X es cualquier aminoácido. El sitio de escisión está colocado después del resto de arginina (Arg) carboxiterminal en la secuencia. Como se usa en el presente documento, el término "furina" se refiere a cualquier proteasa que pueda reconocer y escindir el sitio de escisión por proteasa furina como se define en el presente documento, incluyendo furina o proteasa de tipo furina. La furina también se conoce como enzima de escisión de aminoácido básico emparejado (PACE). La furina pertenece a la familia de proproteína convertasa de tipo subtilisina que incluye PC3, una proteasa responsable de la maduración de la proinsulina en células de los islotes pancreáticos. El gen que codifica la furina se conoce como FUR (región en dirección 5' de FES).

La secuencia peptídica de IGF-II humana madura se muestra a continuación.

↓ ↓

AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPAS**RVSRRSR**GIVEECCFRSCDLALLETYC

ATPAKSE (SEQ ID NO:1)

Como puede observarse, el IGF-II humano maduro contiene dos sitios potenciales de escisión con furina solapantes entre los restos 30-40 (en negrita y subrayados). Las fechas indican dos posiciones potenciales de escisión con furina.

Los presentes inventores han desarrollado etiquetas GILT modificadas que son resistentes a escisión por furina y aún retienen la capacidad de unirse al CI-MPR de una manera independiente de manosa-6-fosfato. Específicamente, las etiquetas GILT resistentes a furina pueden diseñarse por mutación de la secuencia de aminoácidos en uno o más sitios de escisión con furina de modo que la mutación anule al menos un sitio de escisión con furina. Por tanto, una etiqueta GILT resistente a furina puede ser una muteína IGF-II resistente a furina que contiene una mutación que anula al menos un sitio de escisión con proteasa furina o cambia una secuencia adyacente al sitio de escisión con proteasa furina de modo que se evite, inhiba, reduzca o ralentice la escisión con furina en comparación con un péptido IGF-II de tipo silvestre (por ejemplo, IGF-II maduro humano de tipo silvestre). Típicamente, una mutación adecuada no influye en la capacidad de la maca GILT resistente a furina de unirse al receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes. En particular, una muteína IGF-II resistente a furina adecuada para la invención se une al receptor humano de manosa-6-fosfato independiente de cationes de una manera independiente de manosa-6-fosfato con una constante de disociación de 10^{-7} M o menos (por ejemplo, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, o menos) a pH 7,4. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II resistente a furina contiene una mutación dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 (por ejemplo, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40, 34-40) de la SEQ ID NO: 1. Una mutación adecuada anula al menos un sitio de escisión con proteasa furina. Una mutación puede ser sustituciones, deleciones, inserciones de aminoácidos. Por ejemplo, un aminoácido cualquiera dentro de la región correspondiente a los restos 30-40 (por ejemplo, 31-40, 32-40, 33-40, 34-40, 30-39, 31-39, 32-39, 34-37, 32-39, 33-39, 34-39, 35-39, 36-39, 37-40, 34-40) de la SEQ ID NO: 1 puede sustituirse con cualquier otro aminoácido o delecionarse. Por ejemplo, sustituciones en la posición 34 pueden afectar al reconocimiento por furina el primer sitio de escisión. La inserción de uno o más aminoácidos adicionales dentro de cada sitio de reconocimiento puede anular uno o ambos sitios de escisión con furina. La deleción de uno o más de los restos en las posiciones degeneradas también puede anular ambos sitios de escisión con furina.

La muteína IGF-II resistente a furina puede contener sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a Arg37 o Arg40 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una muteína IGF-II resistente a furina contiene una sustitución de Lys o Ala en la posición Arg37 o Arg40. Otras sustituciones son posibles, incluyendo combinaciones de mutaciones de Lys y/o Ala en ambas posiciones 37 y 40, o sustituciones de aminoácidos diferentes de Lys o Ala.

En algunas realizaciones, la muteína IGF-II resistente a furina adecuada para la invención puede codificar mutaciones adicionales. Por ejemplo, hasta un 30 % o más de los restos de la SEQ ID NO: 1 puede cambiarse (por ejemplo, hasta un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 % o más restos puede cambiarse). Por tanto, una muteína IGF-II resistente a furina adecuada para la invención puede tener una secuencia de aminoácidos al menos un 70 %, incluyendo al menos un 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

Una muteína IGF-II resistente a furina adecuada para la invención puede dirigirse específicamente al CI-MPR. Son particularmente útiles mutaciones en el polipéptido de IGF-II que producen una proteína que se une al CI-MPR con alta afinidad (por ejemplo, con una constante de disociación de 10^{-7} M o menos a pH 7,4) mientras que se unen a otros receptores que se sabe que están unidos a IGF-II con afinidad reducida respecto a IGF-II nativo. Por ejemplo, una muteína IGF-II resistente a furina adecuada para la invención puede modificarse para que tenga afinidad de unión disminuida por el receptor de IGF-I respecto a la afinidad del IGF-II humano de origen natural por el receptor de IGF-I. Por ejemplo, la sustitución en IGF-II de los restos Tyr 27 con Leu, Leu 43 con Val o Ser 26 con Phe disminuye la afinidad de IGF-II por el receptor de IGF-I en 94, 56, y 4 veces respectivamente (Torres *et al*. (1995) J. Mol. Biol.

248(2):385-401). La deleción de los restos 1-7 de IGF-II humano produjo una disminución de 30 veces en la afinidad por el receptor de IGF-I humano y un aumento concomitante de 12 veces en la afinidad por el receptor de IGF-II de rata (Hashimoto *et al*. (1995) J. Biol. Chem. 270(30):18013-8). La estructura por RMN de IGF-II muestra que Thr 7 está localizada cerca de los restos 48 Phe y 50 Ser, así como cerca del puente disulfuro 9 Cys-47 Cys. Se cree que la interacción de Thr 7 con estos restos puede estabilizar el hexapéptido N-terminal flexible necesario para la unión al receptor de IGF-I (Terasawa *et al*. (1994) EMBO J. 13(23)5590-7). Al mismo tiempo, esta interacción puede modular la unión al receptor de IGF-II. El truncamiento del extremo C-terminal de IGF-II (restos 62-67) también parece disminuir la afinidad de IGF-II por el receptor de IGF-I en 5 veces (Roth *et al*. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181(2):907-14).

Las superficies de unión para los receptores de IGF-I y M6P independiente de cationes están en caras diferentes de IGF-II. Basándose en los datos estructurales y mutacionales, pueden construirse dominios de unión a M6P independiente de cationes funcionales que son sustancialmente más pequeños que IGF-II humano. Por ejemplo, los aminoácidos amino terminales (por ejemplo, 1-7 o 2-7) y/o los restos carboxiterminales 62-67 pueden delecionarse o remplazarse. Adicionalmente, los aminoácidos 29-40 pueden eliminarse o remplazarse probablemente sin alterar el plegamiento del resto del polipéptido o la unión al receptor de M6P independiente de cationes. Por tanto, puede construirse un resto de dirección que incluya los aminoácidos 8-28 y 41-61. Estos tramos de aminoácidos quizás podrían unirse directamente o separados por un conector. Como alternativa, los aminoácidos 8-28 y 41-61 pueden proporcionarse en cadenas polipeptídicas diferentes. Los dominios comparables de insulina, que es homologa a IGF-II y tiene una estructura terciaria muy relacionada con la estructura de IGF-II, tienen suficiente información estructural para permitir un replegamiento apropiado en la estructura terciaria apropiada, incluso cuando están presentes en cadenas polipeptídicas diferentes (Wang *et al*. (1991) Trends Biochem. Sci. 279-281). Por tanto, por ejemplo, los aminoácidos 8-28, o una variante de sustitución conservativa de los mismos, podría fusionarse a una enzima lisosómica; la proteína de fusión resultante podría mezclarse con los aminoácidos 41-61, o una variante de sustitución conservativa de los mismos, y administrarse a un paciente.

IGF-II también puede modificarse para minimizar la unión a proteínas de unión a IGF-II del suero (Baxter (2000) Am. J. Physiol Endocrinol Metab. 278(6):967-76) para evitar el secuestro de construcciones IGF-II/GILT. Varios estudios han localizado los restos en IGF-II necesarios para la unión a proteínas de unión a IGF. Las construcciones con mutaciones en estos restos pueden explorarse para la retención de la unión de alta afinidad al receptor de M6P/IGF-II y para una afinidad reducida por proteínas de unión a IGF. Por ejemplo, se informa que el remplazo de Phe 26 de IGF-II con Ser reduce la afinidad de IGF-II por IGFBP-1 y 6 sin efecto sobre la unión al receptor de M6P/IGF-II (Bach *et al*. (1993) J. Biol. Chem. 268(13):9246-54). Otras sustituciones, tales como Lys por Glu 9, también pueden ser ventajosas. Las mutaciones análogas, por separado o en combinación, en una región de IGF-I que esté altamente conservada con IGF-II producen disminuciones grandes en la unión a IGF-BP (Magee *et al*. (1999) Biochemistry 38(48):15863-70).

Una estrategia alternativa es identificar regiones mínimas de IGF-II que puedan unirse con alta afinidad al receptor de M6P/IGF-II. Los restos que se han implicado en la unión de IGF-II al receptor de M6P/IGF-II se agrupan principalmente en una cara de IGF-II (Terasawa *et al*. (1994) EMBO J. 13(23):5590-7). Aunque la estructura terciaria de IGF-II normalmente se mantiene por tres enlaces disulfuro intramoleculares, puede diseñarse un péptido que incorpora la secuencia de aminoácidos en la superficie de unión al receptor de M6P/IGF-II de IGF-II para plegarse apropiadamente y tener actividad de unión. Dicho péptido mínimo de unión es un dominio de dirección lisosómica altamente preferido. Por ejemplo, un dominio de dirección lisosómica preferido es los aminoácidos 8-67 de IGF-II humano. Los péptidos diseñados, basados en la región alrededor de los aminoácidos 48-55, que se une al receptor de M6P/IGF-II, también son dominios de dirección lisosómica deseables. Como alternativa, puede explorarse una biblioteca aleatoria de péptidos para la capacidad de unirse al receptor de M6P/IGF-II a través de un ensayo de doble híbrido de levaduras o a través de un ensayo de tipo presentación en fagos.

Afinidad de unión por el receptor de insulina

Los inventores de la presente solicitud descubrieron inesperadamente que muchas muteínas IGF-II resistentes a furina descritas en el presente documento tienen afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina. Por tanto, en algunas realizaciones, una etiqueta peptídica adecuada para la invención tiene afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina respecto a la afinidad del IGF-II humano de origen natural por el receptor de insulina. En algunas realizaciones, las etiquetas peptídicas con afinidad de unión reducida o disminuida por el receptor de insulina adecuadas para la invención incluyen etiquetas peptídicas que tienen una afinidad de unión por el receptor de insulina que es más de 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 12 veces, 14 veces, 16 veces, 18 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces menor que la del IGF-II humano maduro de tipo silvestre. La afinidad de unión por el receptor de insulina puede medirse usando diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica. Los ensayos de unión ejemplares se describen en la sección de Ejemplos.

Mutagénesis

Las muteínas IGF-II pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de IGF-II o por síntesis del polipéptido IGF-II deseado. Pueden hacerse variaciones en la secuencia de IGF-II, por ejemplo, usando

cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, deleción o inserción de uno o más codones que codifican IGF-II que provoca un cambio en la secuencia de aminoácidos de IGF-II en comparación con una secuencia de origen natural de IGF-II humano maduro. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de remplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como el remplazo de una leucina con una serina, es decir, remplazos conservativos de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos también pueden ser el resultado de remplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas distintas, es decir, remplazos no conservativos de aminoácidos. Las inserciones o deleciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo sistémicamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y ensayando las variantes resultantes para la actividad en los ensayos *in vivo* o *in vitro* conocidos en la técnica (tales como ensayos de unión al CI-MPR o ensayos de escisión con furina).

También puede emplearse análisis de aminoácidos por exploración para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de exploración preferidos están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de exploración preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono-β y es menos probable que altere la conformación de cadena principal de la variante. La alanina también se prefiere típicamente porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto enterradas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución con alanina no produce cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido esotérico.

Las variaciones pueden hacerse usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótido (dirigida al sitio), exploración con alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter *et al*., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al*., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis por casete [Wells *et al*., Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis por selección de restricción [Wells *et al*., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse sobre el ADN clonado para producir muteínas IGF-II.

Espaciador

Una etiqueta GILT resistente a furina puede fusionarse al extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido que codifica una enzima lisosómica. La etiqueta GILT puede fusionarse directamente al polipéptido enzimático lisosómico o puede separarse del polipéptido enzimático lisosómico por un conector o un espaciador. Un conector o espaciador de aminoácidos generalmente se diseña para que sea flexible o para interponer una estructura, tal como una hélice-alfa, entre los dos restos proteicos. Un conector o espaciador puede ser relativamente corto, tal como la secuencia Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 4) o Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Pro (SEQ ID NO: 5), o puede ser más largo, tal como, por ejemplo, de 10-25 aminoácidos de longitud. El sitio de una unión de fusión debe seleccionarse con cuidado para promover el plegamiento apropiado y la actividad de ambos compañeros de fusión y para evitar la separación prematura de una etiqueta peptídica de un polipéptido GAA. En una realización preferida, la secuencia conectora es Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 4).

Se describieron en detalle construcciones adicionales de proteínas GAA etiquetadas con GILT que pueden usarse en los métodos y composiciones de la presente invención en la publicación de Estados Unidos n.º 2005 0244400.

Células

Puede utilizarse cualquier célula o tipo celular de mamífero susceptible a cultivo celular, y a expresión de polipéptidos, de acuerdo con la presente invención, tales como, por ejemplo, células de riñón embrionario humano (HEK) 293, células de ovario de hámster chino (CHO), células renales de mono (COS), células HT1080, células C10, células HeLa, células renales de cría de hámster (BHK), células 3T3, células C127, células CV-1, células HaK, células NS/O y células L-929. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen, aunque sin limitación, la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, ECACC n.º: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al*., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células renales de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino +/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al*., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). La proteína de fusión puede producirse a partir de líneas celulares CHO.

La proteína de fusión también puede expresarse en una diversidad de células hospedadoras que no son de mamífero tales como, por ejemplo, de insecto ((por ejemplo, Sf-9, Sf-21, Hi5), de plantas (por ejemplo, *Leguminosa*, cereal, o tabaco), de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae, P. pastoris*), procariotas (por ejemplo, *E. Coli, B. subtilis* u otros *Bacillus spp.*, *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp), o de hongos.

Una proteína de fusión con o sin una etiqueta GILT resistente a furina puede producirse en células deficientes de furina. Como se usa en el presente documento, la expresión "células deficientes de furina" se refiere a cualquier célula cuya actividad proteasa furina está inhibida, reducida o eliminada. Las células deficientes de furina incluyen tanto células de mamífero como células que no son de mamífero que no producen furina o producen una cantidad reducida o proteasa furina defectuosa. Las células deficientes de furina ejemplares que son conocidas y están disponibles para los expertos en la materia incluyen, aunque sin limitación, células FD11 (Gordon *et al.* (1997) Infection and Immunity 65(8):3370 3375), y aquellas células mutantes descritas en Moebring y Moehring (1983) Infection and Immunity 41(3):998 1009. Como alternativa, una célula deficiente de furina puede obtenerse exponiendo las células de mamífero y que no son de mamífero descritas anteriormente a tratamiento de mutagénesis, por ejemplo, irradiación, bromuro de etidio, uridina bromada (BrdU) y otros, preferentemente mutagénesis química, y más preferentemente mutagénesis con sulfonato de etilmetano, recuperando las células que sobreviven al tratamiento y seleccionando aquellas células que se encuentra que son resistentes a la toxicidad de la exotoxina A de *Pseudomonas* (véase, Moehring y Moehrin (1983) Infection and Immunity 41(3):998 1009).

Hipoglucosilación

Las proteínas terapéuticas dirigidas pueden estar hipoglucosiladas es decir, una o más estructuras de carbohidrato que estarían normalmente presentes en una proteína humana de origen natural, preferentemente se omite, elimina o modifica u oculta. Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se contempla que una proteína hipoglucosilada puede prolongar la semivida de la proteína en un mamífero. La hipoglucosilación puede conseguirse de muchas maneras. Una proteína de fusión dirigida desvelada en el presente documento puede producirse usando un péptido señal de secreción para facilitar la secreción de la proteína de fusión. Por ejemplo, la proteína de fusión puede producirse usando una péptida señal de IGF-II. En general, la proteína de fusión producida usando un péptido señal de IGF-II tiene un nivel reducido de manosa-6-fosfato (M6P) sobre la superficie de la proteína en comparación con la enzima de tipo silvestre. En algunas realizaciones, una proteína puede estar completamente hipoglucosilada (como cuando se sintetiza en *E. coli*), parcialmente no glucosilada (como cuando se sintetiza en un sistema de mamífero después de la alteración de uno o más sitios de glucosilación por mutagénesis dirigida al sitio) o puede tener un patrón de glucosilación que no es de mamífero. Por ejemplo, las proteínas de fusión hipoglucosiladas pueden generarse modificando, sustituyendo o eliminando uno o más sitios de glucosilación por mutagénesis dirigida al sitio. Por ejemplo, la GAA de tipo silvestre típicamente tiene siete sitios que coinciden con la secuencia de reconocimiento canónica para la glucosilación ligada a N, Asn-Xaa-Thr/Ser (SEQ ID NO: 7) (Xaa puede ser cualquier resto excepto Pro), concretamente, Asn-140, -233, -390, -470, -652, -882 y -925 (Hoefsloot *et al*., 1988; Martiniuk *et al*., 1990b). Puede cambiarse una o más Asn en las posiciones descritas anteriores o puede eliminarse para generar GAA hipoglucosilada. En algunas realizaciones, puede cambiar Asn a Gln.

Una proteína de fusión terapéutica puede desglucosilarse después de la síntesis. Por ejemplo, la desglucosilación puede ser a través de tratamientos químicos o enzimáticos, y puede dar lugar a desglucosilación completa o, si se elimina solamente una parte de la estructura de carbohidrato, desglucosilación parcial.

Una glucosilación de una enzima lisosómica puede modificarse, por ejemplo, por oxidación y reducción, para reducir la eliminación de la proteína terapéutica de la sangre. Por ejemplo, puede desglucosilarse una enzima lisosómica por tratamiento con peryodato. En particular, el tratamiento con peryodato y un agente reductor tal como borohidruro sódico es eficaz para modificar la estructura de carbohidrato de la mayoría de las glucoproteínas. El tratamiento con peryodato oxida dioles vecinales, escindiendo el enlace carbono-carbono y remplazando los grupos hidroxilo con grupos aldehído; el borohidruro reduce los aldehídos en hidroxilos. Por ejemplo, a concentración 1 mM, el peryodato oxida exclusivamente los grupos de ácido siálico y a o por encima de 10 mM todos los dioles vecinales disponibles se convierten en aldehídos (Hermanson, G.T. 1996, Bioconjugate techniques. Academic press). Una vez formados, los grupos aldehídos son altamente reactivos y pueden formar enlaces de bases de Schiff con grupos amino primarios en la proteína, produciendo enlaces intramoleculares. Por lo tanto, los grupos aldehído formados tienen que reducirse en grupos alcohol. Un agente reductor habitualmente usado es $NaBH_4$ y la reacción se ejecuta mejor en condiciones alcalinas. Muchos restos de azúcar, incluyendo dioles vecinales, por lo tanto, se escinden por este tratamiento. No obstante, aunque este tratamiento convierte los carbohidratos cíclicos en carbohidratos lineales, no elimina completamente el carbohidrato, minimizando los riesgos de exposición de sitios polipeptídicos potencialmente sensibles a proteasa o antigénicos.

Grubb, J.H., *et al*. (Grubb *et al*., 2008, PNAS 105:2616) informan del tratamiento de β-glucuronidasa humana con metaperyodato sódico seguido por reducción con borohidruro sódico. La beta-glucuronidasa modificada retenía un 90 % de la actividad, pero perdía la actividad de captación del receptor tanto dependiente de manosa como dependiente de manosa-6-fosfato. La condición de pH alcalino usada en la reducción debido al reactivo de borohidruro sódico como se describe por Grubb *et al*., no es adecuada para todas las enzimas lisosómicas, muchas de las cuales son inestables en condiciones alcalinas.

Por lo tanto, puede usarse cianoborohidruro sódico como agente reductor. Aunque la tasa de reducción de los aldehídos por cianoborohidruro es insignificante a pH neutro, y superiores, la tasa de reacción llega a ser rápida a pH ácido (Borch, *et al*. 1971, JACS 93:2897). Por ejemplo, pueden usarse regímenes que usan metaperyodato sódico y cianoborohidruro a pH 3,5-4.

Por ejemplo, el tratamiento de GAA o alfa-galactosidasa A, las enzimas deficientes en las enfermedades de Pompe y Fabry respectivamente, con peryodato y cianoborohidruro a pH 5,6 produjo una buena recuperación de la actividad enzimática. La enzima se incubó con una mezcla de volumen igual que contenía metaperyodato sódico 20 mM y cianoborohidruro sódico 40 mM en acetato de Na 0,1 M, pH 5,6 durante 60 min en hielo. El peryodato sin reaccionar se inactivó con glicerol (concentración final al 10 %) durante 15 min en hielo. Las proteínas se intercambiaron finalmente en solución salina tamponada con fosfato, pH 6,2 por diafiltración usando dispositivos de filtro de centrifugación Amicon. Otros agentes reductores, por ejemplo, borano de dimetilamina, también pueden ser útiles para reducir los aldehídos generados por oxidación con metaperyodato sódico de glucoproteínas tales como GAA en condiciones ácidas.

Por tanto, la reducción de GAA tratada con metaperyodato sódico puede implicar el uso de cianoborohidruro sódico a pH ácido de pH 3,0 a pH 6. Las condiciones óptimas para la modificación química pueden determinarse fácilmente usando dos ensayos: pérdida de unión a ConA sepharose y captación disminuida en macrófagos J774E.

Por ejemplo, la capacidad de la β-glucuronidasa modificada con peryodato/borohidruro de unirse a ConA sepharose se comparó con la de β-glucuronidasa no tratada. Las enzimas se incubaron con 50 ml de perlas ConA en Tris-HCl 20 mM, pH 6,8, NaCl 0,5 M durante 15 min a temperatura ambiente. Las perlas se centrifugaron a velocidad máxima durante 15 s. El sobrenadante (flujo directo) se extrajo cuidadosamente, se ensayó para la actividad GUS y se analizó por SDS/PAGE. Cuando se trató GUS exactamente como se presenta en Grubb *et al*., se perdió un 60 % de la actividad de unión a ConA y estaba presente GUS sin unir solamente en el flujo directo de la muestra tratada con peryodato y posteriormente reducida con borohidruro sódico.

Administración de proteínas terapéuticas

Una proteína terapéutica descrita en el presente documento puede administrarse al individuo en solitario, o en composiciones y medicamentos que comprenden la proteína terapéutica (por ejemplo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad), como se describe en el presente documento. Las composiciones pueden formularse con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable para preparar una composición farmacéutica. El vehículo y la composición pueden ser estériles. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, aunque sin limitación, agua, soluciones salinas (por ejemplo, NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles , gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, azúcares tales como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite esencial, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Las preparaciones farmacéuticas pueden mezclase, si se desea, con agentes auxiliares (por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectante, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares) que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos o impiden su actividad. Puede usarse un vehículo soluble en agua adecuado para administración intravenosa.

La composición o medicamento, si se desea, también puede contener cantidades mínimas de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. La composición también puede formularse como un supositorio, con aglutinantes tradicionales y vehículos tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

La composición o medicamento puede formularse de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para su administración a seres humanos. Por ejemplo, una composición para administración intravenosa típicamente es una solución en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es necesario, la composición también puede incluir una agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados juntos en una forma monodosis, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente cerrado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito, que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición tiene que administrarse por infusión, puede distribuirse con un frasco de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica, solución salina o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

La proteína terapéutica puede formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Una proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene una proteína terapéutica) se administra por cualquier vía apropiada. Una proteína terapéutica puede administrarse por vía intravenosa. Una proteína terapéutica puede administrarse por administración directa a un tejido diana, tal como el corazón o el músculo (por ejemplo, intramuscular) o sistema nervioso (por ejemplo, inyección directa en el cerebro; por vía intraventricular; por vía intratecal). Como alternativa, una proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene una proteína terapéutica) puede administrarse por vía parenteral, por vía transdérmica o por vía transmucosa (por ejemplo, por vía oral o por vía nasal). Puede usarse de forma simultánea más de una vía, si se desea.

Una proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene una proteína terapéutica) puede administrarse en solitario o junto con otros agentes, tales como antihistaminas (por ejemplo, difenhidramina) o inmunosupresores u otros agentes inmunoterapéuticos que contrarrestan los anticuerpos antienzima lisosómica etiquetada con GILT. La expresión "junto con" indica que el agente se administra antes de, o aproximadamente al mismo tiempo que o después de la proteína terapéutica (o una composición o medicamento que contiene la proteína terapéutica). Por ejemplo, el agente puede mezclarse en una composición que contiene la proteína terapéutica y de ese modo se administra de forma contemporánea con la proteína terapéutica; como alternativa, el agente puede administrase de forma contemporánea, sin mezcla (por ejemplo, por suministro "combinado" del agente en la vía intravenosa por la cual también se administra la proteína terapéutica, o viceversa). En otro ejemplo, el agente puede administrarse por separado (por ejemplo, sin mezclarse), pero en un corto marco de tiempo (por ejemplo, en 24 horas) de administración de la proteína terapéutica.

La proteína terapéutica (o composición o medicamento que contiene la proteína terapéutica) se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz (es decir, una cantidad de dosificación que, cuando se administra a intervalos regulares, es suficiente para tratar la enfermedad, tal como mejorando los síntomas asociados a la enfermedad, previniendo o retardando la aparición de la enfermedad y/o también disminuyendo la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad, como se describe anteriormente). La dosis que será terapéuticamente eficaz para el tratamiento de la enfermedad dependerá de la naturaleza y grado de los efectos de la enfermedad, y se puede determinar por técnicas clínicas convencionales. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos usando métodos conocidos en la técnica. La dosis precisa a emplear también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad, y debe decidirse de acuerdo con los criterios de un facultativo y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelo animal. La cantidad de dosificación terapéuticamente eficaz puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,1-1 mg/kg, aproximadamente 1-5 mg/kg, aproximadamente 5-20 mg/kg, aproximadamente 20-50 mg/kg, o 20-100 mg/kg. La dosis eficaz para un individuo particular puede variarse (por ejemplo, aumentarse o disminuirse) en el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad física o estrés, o si empeora los síntomas de la enfermedad, la cantidad de dosificación puede aumentarse.

La cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína terapéutica (o composición o medicamente que contiene la proteína terapéutica) se administra a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza y grado de los efectos de la enfermedad, y en una base continua. La administración a un "intervalo", como se usa en el presente documento, indica que la cantidad terapéuticamente eficaz se administra periódicamente (que se distingue de una dosis de una vez). El intervalo puede determinarse por técnicas clínicas convencionales. La proteína terapéutica puede administrarse bimensualmente, mensualmente, dos veces al mes, cada tres semanas, bisemanalmente, semanalmente, dos veces a la semana, tres veces a la semana o diariamente. El intervalo de administración para un único individuo no tiene que ser un intervalo fijo, sino que puede variarse en el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad física o estrés, o si empeoran los síntomas de la enfermedad, el intervalo entre dosis puede disminuirse.

Como se usa en el presente documento el término "bimensualmente" significa administración una vez en dos meses (es decir, una vez cada dos meses); el término "mensualmente" significa administración una vez al mes; el término "cada tres semanas" significa administración una vez en tres semanas (es decir, una vez cada tres semana); el término "bisemanalmente" significa administración una vez en dos semanas (es decir, una vez cada dos semanas); el término "semanalmente" significa administración una vez a la semana; y el término "diariamente" significa administración una vez al día.

Se desvela en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una proteína terapéutica, como se describe en el presente documento en un recipiente (por ejemplo, un vial, frasco, bolsa para administración intravenosa, jeringa, etc.) con una etiqueta que contiene instrucciones para la administración de la composición para el tratamiento de la enfermedad de Pompe, tal como por los métodos descritos en el presente documento.

La invención se describirá adicionalmente y más específicamente por los siguientes ejemplos. Los ejemplos, sin embargo, se incluyen con fines de ilustración, no de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Escisión con furina de etiqueta GILT basada en IGF-II

ZC-701 se ha desarrollado para el tratamiento de la enfermedad de Pompe. ZC-701 es una proteína quimérica que contiene una etiqueta GILT basada en IGF-II N-terminal fusionada con un espaciador de tres aminoácidos a los restos 70-952 de la α-glucosidasa ácida humana (hGAA). Específicamente, ZC-701 incluye los aminoácidos 1 y 8-67 de IGF-II humano (es decir, Δ2-7 de IGF-II humano maduro), la secuencia espaciadora Gly-Ala-Pro, y los aminoácidos 70-952 de GAA humana. La secuencia de aminoácidos de longitud completa se muestra a continuación. La secuencia espaciadora está en negrita. La secuencia N-terminal a la secuencia espaciadora refleja los aminoácidos 1 y 8-67 de IGF-II humano y la secuencia C-terminal a la secuencia espaciadora refleja los aminoácidos 70-952 de GAA humana. Los dos sitios potenciales de escisión con furina solapantes dentro de la secuencia de etiqueta IGF-II está en negrita, y subrayada. Las flechas indican las dos posiciones potenciales de escisión con furina.

AALCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPAS**RVSRRSR**GIVEECCFRSCDLALLETYCATPA
KSE**GAP**AHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQ
MGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHF
TIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLNTTVAPLFFA
DQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLALE
DGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGY
PFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFN
KDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPL
IGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCP
NNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGT
RPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLG
NTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLY
TLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPL
GTWYDLQTVPIEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPG
LTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNEL
VRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFL
VSWC (SEQ ID NO: 8)

Durante el curso de desarrollo de ZC-701, ha llegado a ser evidente que la etiqueta GILT derivada de IGF-II en una fracción de las moléculas ZC-701 está sometida a escisión proteolítica por furina durante la producción en células CHO. El análisis N-terminal del lote de ZC-701 10-2-F45-54 reveló la presencia de dos secuencias N-terminal. Una se conformó al extremo N-terminal predicho de ZC-701 que indica la presencia de la proteína ZC-701 predicha. La otra secuencia N-terminal se alineaba con la secuencia dentro de la parte de etiqueta de ZC-701, que indica la presencia de un derivado de ZC-701 coherente con una escisión endoproteolítica en el resto del aminoácido 34 de ZC-701. Basándose en las relaciones molares estimadas de los dos extremos N-terminales, se descubrió que este lote de ZC-701 tenía una relación de aproximadamente 1:1 de especies intactas y escindidas.

Tras recibir este resultado, cada uno de los otros lotes de ZC-701 se sometió a secuenciación N-terminal. Todos los lotes presentaban los mismos extremos N-terminales con las especies escindidas variando de un 20-50 % del compuesto total. Un lote, que previamente ha demostrado tener baja actividad de captación, presentaba un conjunto de extremos N-terminales indicativos de proteólisis adicional. Se concluyó que el evento proteolítico responsable de la segunda especie en todos los lotes de ZC-701 se perpetraba por furina o una proteasa de tipo furina.

La Figura 1 muestra un mapa del extremo amino terminal de ZC-701. Los dos restos de aminoácidos en un recuadro son los sitios de los extremos N-terminales identificados en todos los lotes de ZC-701. El primero de los extremos N-terminales es el sitio de escisión del péptido señal, que produce el extremo N-terminal predicho de ZC-701. El segundo resto en un recuadro es el sitio de un evento de escisión proteolítica indeseado. La secuencia de aminoácidos proximal al sitio de escisión es Arg-Arg-Ser-Arg (SEQ ID NO: 9). Esto coincide con el sitio de escisión canónico de una proteasa presente en células CHO llamada furina, que escinde después de Arg-X-X-Arg (SEQ ID NO: 10). La furina es un miembro de una familia de convertasas de prohormonas que incluye PC3, una proteasa responsable de la maduración de proinsulina en células de los islotes pancreáticos. De hecho, el sitio de escisión de PC3 en la proinsulina está conservado y es idéntico al sitio en que la furina escinde la etiqueta IGF-II.

ZC-701 escindido con furina difiere en su peso molecular de ZC-701 intacto en aproximadamente 3000 Dalton, que representa menos de un 3 % de diferencia en el peso molecular. Debido a la heterogeneidad del oligosacárido en la proteína, la presencia de ZC-701 escindido no se detectó previamente por SDS-PAGE. Sin embargo, si ZC-701 se desglucosila primero por tratamiento con péptido N-glucosidasa F (PNGasa F), entonces la proteína escindida puede resolverse de ZC-701 intacto por SDS-PAGE.

Como se muestra en la Figura 2, el carril 1 del gel de SDS-PAGE muestra el patrón electroforético de ZC-701 purificado desglucosilado. Son evidentes dos bandas. Se cree que la banda superior es ZC-701 intacto y se cree que la banda inferior es ZC-701 escindido con furina. Para demostrar que la banda inferior es de hecho ZC-701 escindido con furina, primero se trataron las mismas proteínas cargadas en el carril 1 con furina y después se cargaron en el carril 2. Como se muestra en la Figura 2, todas las proteínas en el carril 1 comigran con la banda inferior en el carril 1, lo que indica que la banda inferior es de hecho ZC-701 escindido con furina.

Se ha estimado la proporción de ZC-701 que se ha escindido con furina en varios lotes de ZC-701 por cuantificación de la intensidad de banda en SDS-PAGE y por cuantificación de aminoácidos liberados en experimentos de secuenciación N-terminal. Como se analiza anteriormente, la fracción de ZC-701 escindido ha variado de un 20 % a un 50 % en diferentes lotes.

Ejemplo 2: Proteínas de fusión dirigidas que contienen una etiqueta GILT basada en IGF-II resistente a furina

Se puede hacer un diseño respecto al problema de escisión con furina alterando la secuencia de aminoácidos de IGF-II de modo que la alteración de aminoácidos anule al menos un sitio de escisión con furina. Se generó una serie de versiones mutantes de ZC-701 y se ensayó para la resistencia a escisión por furina. Las versiones mutantes ejemplares de ZC-701 se generaron como se describe a continuación.

ZC-701

El casete GILTΔ2-7-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7-GAA70-952 (plásmido p701). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGAGCCGTCGCAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgca
caccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcaccca
ggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcc
cacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttctt
ccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcg
ctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggt
gatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacc
tcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaacc
gggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccctttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtg
ttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacat
cttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttc
cacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaa
tggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctg
caccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagg
gtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttca
ccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacg
agccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggga
ccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatc
gcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggc
cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgc
ggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccct

gcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagtt
ccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctg
cagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggc
tgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagg
gtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcct
ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg
tggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc
tcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO: 11)**

Construcción 1459

El casete GILTΔ2-7/K37-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7/K37-GAA70-952 (plásmido p1459). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7/K37 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7/K37 contiene una sustitución de Arg a Lys en el aminoácido 37 de la secuencia de IGF-II humano (mayúscula negrita).

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGAGC**AAG**CGCAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGGCGCGCCGgca
caccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcaccca
ggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcc
cacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttctt
ccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcg
ctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggt
gatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacc
tcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaacc
gggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccctttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtg
ttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacat
cttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttc
cacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccccctggacgtccaa
tggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctg
caccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagg
gtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttca
ccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacg
agccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccacccctacgtgcctggggtggttgggggga
ccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatc
gcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggc

cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgc
ggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccct
gcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggccccctcttcctggagtt
ccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctg
cagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggc
tgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagg
gtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcct
ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg
tggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc
tcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO: 12)**

Construcción 1460

El casete GILTΔ2-7/K40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7/K40-GAA70-952 (plásmido p1460). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7/K40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7/K40 contiene una sustitución de Arg a Lys en el aminoácido 40 de la secuencia de IGF-II humano (mayúscula negrita).

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGAGCCGTCGCAGC**AAG**GGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgca
caccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcaccca
ggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcc
cacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttctt
ccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcg
ctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggt
gatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacc
tcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaacc
gggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccctttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtg
ttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacat
cttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttc
cacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccccctggacgtccaa
tggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctg
caccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagg
gtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttca
ccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacg

agccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggga
ccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatc
gcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggc
cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgc
ggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccct
gcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggccccctcttcctggagtt
ccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctg
cagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggc
tgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagg
gtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcct
ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg
tggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc
tcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO: 13)**

Construcción 1461

El casete GILTΔ2-7/A37-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7/A37-GAA70-952 (plásmido p1461). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7/A37 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7/A37 contiene una sustitución de Arg a Ala en el aminoácido 37 de la secuencia de IGF-II humano (mayúscula negrita).

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGAGC**GCT**CGCAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgca
caccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcaccca
ggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcc
cacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttctt
ccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcg
ctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggt
gatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacc
tcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaacc
gggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccctttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtg
ttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacat
cttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttc
cacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaa
tggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctg

caccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagg
gtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttca
ccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacg
agccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggga
ccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatc
gcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggc
cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgc
ggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccct
gcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagtt
ccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctg
cagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggc
tgggtacatcatcccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagg
gtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcct
ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg
tggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc
tcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO: 14)**

Construcción 1463

El casete GILTΔ2-7/A40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7/A40-GAA70-952 (plásmido p1463). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7/A40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7/A40 contiene una sustitución de Arg a Ala en el aminoácido 40 de la secuencia de IGF2 humano (mayúscula negrita).

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGAGCCGTCGCAGC**GCT**GGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGA
CCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgca
caccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcaccca
ggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcc
cacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttctt
ccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcg
ctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggt
gatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacc
tcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaacc
gggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtg
ttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacat

cttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttc
cacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaa
tggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctg
caccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagg
gtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttca
ccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacg
agccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggga
ccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatc
gcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggc
cactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctg
gtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccttcatgc
ggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccct
gcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggccctcttcctggagtt
ccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaagg
ccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctg
cagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggc
tgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagg
gtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcct
ggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcg
tggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtc
tcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO: 15)**

Construcción 1479

El casete GILTΔ2-7M1/K37-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7M1/K37-GAA70-952 (plásmido p1479). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7M1/K37 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7M1/K37 contiene una sustitución de Arg a Lys en el aminoácido 37 de la secuencia de IGF-II humano (mayúscula negrita).

ggtaccaagcttgccATGGGAATCCCAATGGGCAAGTCGATGCTGGTGCTGCTCACCTTCTT
GGCCTTTGCCTCGTGCTGCATTGCCGCTCTGTGCGGCGGGGAACTGGTGGACACCCT
CCAATTCGTCTGTGGGGACCGGGGCTTCTACTTCAGCAGACCCGCAAGCCGTGTGAG
T**AAG**CGCAGCCGTGGCATTGTTGAGGAGTGCTGTTTTCGCAGCTGTGACCTGGCTCT
CCTGGAGACGTACTGCGCTACCCCCGCCAAGTCTGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtc
ccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcga
ggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctacc
ccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacat
cctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcc
cttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccg
gcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcg

cagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcg
cccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccttttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaac
agcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggccc
agagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccg
ctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccccctggacgtccaatggaacgacct
ggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcg
gccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggagg
ggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccaca
gccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaact
tcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggaccctccaggcg
gcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacag
ggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgg
gggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccg
acgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgcggaaccacaa
cagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgca
ctcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggact
ctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgact
ggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgt
gagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatca
tccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggc
ccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaata
acacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcg
ccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatg
ggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO: 16)**

Construcción 1487

El casete GILTΔ2-7M1/A37-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7M1/A37-GAA70-952 (plásmido p1487). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7M1/A37 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7M1/A37 contiene una sustitución de Arg a Ala en el aminoácido 37 de la secuencia de IGF-II humano (mayúscula negrita).

ggtaccaagcttgccATGGGAATCCCAATGGGCAAGTCGATGCTGGTGCTGCTCACCTTCTT
GGCCTTTGCCTCGTGCTGCATTGCCGCTCTGTGCGGCGGGGAACTGGTGGACACCCT
CCAATTCGTCTGTGGGGACCGGGGCTTCTACTTCAGCAGACCCGCAAGCCGTGTGAG
T**GCT**CGCAGCCGTGGCATTGTTGAGGAGTGCTGTTTTCGCAGCTGTGACCTGGCTCT
CCTGGAGACGTACTGCGCTACCCCCGCCAAGTCTGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtc
ccagagcagtgcccacacagtgcgacgtcccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcga
ggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctacc
ccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacat

cctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcc
cttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccg
gcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcg
cagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcg
cccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccttttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaac
agcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggccc
agagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccg
ctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccccctggacgtccaatggaacgacct
ggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcg
gccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggagg
ggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccaca
gccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaact
tcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggaccctccaggcg
gcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacag
ggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgg
gggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccg
acgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgcggaaccacaa
cagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgca
ctcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggact
ctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgact
ggctacttcccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccaccccccacctgcagctccccgt
gagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatca
tccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggc
ccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaata
acacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcg
ccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatg
ggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:17)**

Como se muestra en la Figura 3, tres mutantes ejemplares (es decir, construcciones 1459, 1460 y 1461) en que la alanina o la lisina se ha sustituido por uno de los restos de arginina canónicos se expresaron sin escisión detectable por furina. También se muestra en la figura 3 (panel de la derecha), la construcción 1461 que contiene una sustitución R37A que es adicionalmente resistente a adición de furina exógena.

Construcción 1726

El casete GILTΔ2-7A30-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ30-39-GAA70-952 (plásmido p1726). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ30-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ30-39 contiene una deleción de los restos de aminoácido 30-39 (Arg-Pro-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCCGTGGCATCGT
TGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTAC
CCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtcccc
cccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagca
ggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctga
aatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagact
gagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgggcacc
gtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgac
ggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcc
cctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcaccc
tttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccct
gcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggac
gttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggt
ggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaa
caaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatca
gcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgct
gattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagtt
ccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaat
gagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttggggggaccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctcc
acacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatt
tgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctc
ctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggag
ctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccctcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagct
tcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcc
cacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgg
ggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccctgggcacatggtacgacctgca
gacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtg
acgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatcccctgcagggccctggcctcacaaccacaga
gtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagag
cctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccag
tgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctc
caacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctaga
gcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:18)**

Construcción 1749

El casete GILTΔ2-7Δ31-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ31-39-GAA70-952 (plásmido p1749). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ31-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ31-39 contiene una deleción de los restos de aminoácido 31-39 (Pro-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCGTGGCAT
CGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGC
TACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgt
ccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaa
agcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcc
tctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatgg
agactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgg
gcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaac
acgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacct
cagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggt
ctcacccttttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagcc
gagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagta
cctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcaccc
gccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggagggacttc
acgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcct
gccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggcc
agccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtgg
ctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgcccc
aacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagttt
ctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacg
cccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagct
cgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctca
gaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccg
tacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccac
caggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagct
cctgtgggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacga
cctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcag
tgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaacc
acagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatgga
gagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtg
accagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccc
tgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttag
tctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:19)**

Construcción 1746

El casete GILTΔ2-7Δ32-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ32-39-GAA70-952 (plásmido p1746). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ32-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ32-39 contiene una deleción de los restos de aminoácido 32-39 (Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCCGTGG
CATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTG
TGCTACCCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgc
gacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccc
tgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctga
gctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgat
gatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacag
ccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgct
gaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagc
acctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacg
ggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgca
gccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagca
gtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatca
cccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggaggga
cttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtgga
tcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccg
gccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatg
gtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctg
ccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccacc
agtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggа
cacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagc
agctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacac
ctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccttcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccccagga
gccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgtt
ccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccacc
agctcctgtgggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccttgggcacatggt
acgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccaccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggg
gcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatcccctgcagggccctggcctca
caaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacg
atggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtac
gtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggt

gtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggt
gttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:20)**

Construcción 1747

El casete GILTΔ2-7Δ33-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ33-39-GAA70-952 (plásmido p1747). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ33-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ33-39 contiene una deleción de los restos de aminoácido 33-39 (Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCACG
TGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTA
CTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacaca
gtgcgacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctaca
tccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaac
ctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccacctttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacg
tgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtcc
acagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtg
ctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgcc
gagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacct
ctacgggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtc
ctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtg
cagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccg
ctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccgga
gggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatc
gtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacga
gaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggagg
acatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggac
ggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacccctccaggcggcaaccatctgtgcctccag
ccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgg
gggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgg
gagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggca
acacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccctcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgcccca
ggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgc
tgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggccccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggacc
accagctcctgtgggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggcacat
ggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgag
gggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctggcct

cacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggac
gatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggt
acgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacg
gtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctg
gtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:21)**

Construcción 1758

El casete GILTΔ2-7Δ34-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ34-39-GAA70-952 (plásmido p1758). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ34-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ34-39 contiene una deleción de los restos de aminoácido 34-39 (Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGAC
GTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgccc
acacagtgcgacgtcccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgct
gctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctg
gagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgaccctgcggc
tggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgc
gtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggcc
gcgtgctgctgaacacgacggtggcgccccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcc
tcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcg
aacctctacgggtctcacccttttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatg
tggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgt
ggtgcagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctcca
ccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactccc
ggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatg
atcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaac
gagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtggga
ggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgagg
acggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacccctccaggcggcaaccatctgtgcctcc
agccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctc
gggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcct
gggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctggg
caacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccctcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccc
caggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacac

gctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtgga
ccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggca
catggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagc
gaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctgg
cctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgg
gacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagct
ggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctcca
acggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtca
gctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:22)**

Construcción 1750

El casete GILTΔ2-7Δ35-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ35-39-GAA70-952 (plásmido p1750). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ35-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ35-39 contiene una deleción de los restos de aminoácido 35-39 (Val-Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGA
GACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcag
tgcccacacagtgcgacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcgg
ctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaa
gctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgaccctg
cggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagacc
ccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggac
ggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcaca
ggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccgg
tgcgaacctctacgggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatg
gatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaaga
gcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactc
ctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccctggacgtccaatggaacgacctggactacatgga
ctcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctaca
tgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatca
ccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggt
gggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctct

gaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacccctccaggcggcaaccatctgtg
cctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaa
ggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtgga
gctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggctt
cctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgcggaaccacaacagcctgctcag
tctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacc
tctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctgga
ctgtggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccct
tgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatc
cacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagg
gccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagc
tgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtga
atgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtc
ctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttc
tcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:23)**

Construcción 1748

El casete GILTΔ2-7Δ36-39-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ36-39-GAA70-952 (plásmido p1748). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ36-39 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ36-39 contiene una deleción de los restos de aminoácido 36-39 (Ser-Arg-Arg-Ser) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CCGTGTGCGTGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCT
GGAGACGTACTGTGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccag
agcagtgcccacacagtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcc
cgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccag
ctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacatcctg
accctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttg
gagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggca
gctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagt
atatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgccca
cgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagca
atgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccaga
gcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctgg

ggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccctggacgtccaatggaacgacctggac
tacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccg
gcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggg
gttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccc
tggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatc
aggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacccctccaggcggcaa
ccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggc
gctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacggggg
acgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgt
ctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctaccccttcatgcggaaccacaacag
cctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcc
tccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactcta
gcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactgg
ctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgag
ccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccc
cctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccga
ggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacac
gatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgcccc
agcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggag
agcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:24)**

Construcción 1751

El casete GILTΔ2-7Δ29-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ29-40-GAA70-952 (plásmido p1751). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ29-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ29-40 contiene una deleción de los restos de aminoácido 29-40 (Ser-Arg-Pro-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCGGCATCGTTGAGGA
GTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCCCGC
CAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccaacagc
cgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgca
gggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggcta
cacggccaccctgacccgtaccacccccacctttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccg
cctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccact
ctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgc

ccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgct
cagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccttttctacct
ggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttа
gctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgg
gatacccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtgga
gaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaagga
tggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctc
gggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattggg
aaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgac
caggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctgg
agaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggggacccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacacta
caacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctc
ccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgc
cagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgt
gcgctggacccagctgggggccttctacccttcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcga
gccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcg
cgggggagaccgtggcccggccccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggggag
gccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtg
ccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgc
cggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatcccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgc
cagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaa
gtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgaggga
gctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttca
cctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta
gcggccgc (SEQ ID NO:25)

Construcción 1752

El casete GILTΔ2-7Δ30-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ30-40-GAA70-952 (plásmido p1752). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ30-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ30-40 contiene una deleción de los restos de aminoácido 30-40 (Arg-Pro-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCGGCATCGTTGA
GGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTACCCC
CGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtcccccccaa
cagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggc

tgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgg
gctacacggccaccctgacccgtaccacccccacctttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgaga
accgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtcc
ccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtg
gcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctg
atgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccttttct
acctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcc
cttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttg
tgggatacccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggt
ggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaa
ggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagca
gctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgatt
gggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccat
gaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgag
ctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacac
actacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtga
tctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccg
tgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtg
tgtgcgctggacccagctgggggccttctacccttcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagc
gagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgt
cgcgggggagaccgtggcccggccccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggg
aggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccctgggcacatggtacgacctgcagacgg
tgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctg
ccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccg
ccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctgga
agtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgaggg
agctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttc
acctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgct
agcggccgc (SEQ ID NO:26)

Construcción 1753

El casete GILTΔ2-7Δ31-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ31-40-GAA70-952 (plásmido p1753). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ31-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ31-40 contiene una deleción de los restos de aminoácido 31-40 (Pro-Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGGGCATCGT
TGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGCTAC
CCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtcccc
cccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagca
ggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctga
aatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagact
gagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgggcacc
gtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgac
ggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcc
cctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcaccc
tttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccct
gcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggac
gttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggt
ggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaa
caaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatca
gcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgct
gattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctgagtt
ccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaat
gagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctcc
acacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatt
tgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctc
ctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggag
ctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccttcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagct
tcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcc
cacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgg
ggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggtacgacctgca
gacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccaccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtg
acgctgccggccccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatcccccctgcagggccctggcctcacaaccacaga
gtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagag
cctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccag
tgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctc
caacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctaga
gcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:27)**

Construcción 1754

El casete GILTΔ2-7Δ32-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ32-40-GAA70-952 (plásmido p1754). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ32-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ32-40 contiene una deleción de los restos de aminoácido 32-40 (Ala-Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGGCAT
CGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTGTGC
TACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgt
ccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaa
agcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcc
tctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatgg
agactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacagccgg
gcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaac
acgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacct
cagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggt
ctcacccttttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagcc
gagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagta
cctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcaccc
gccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggagggacttc
acgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtggatcct
gccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccggcc
agccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatggtgg
ctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctgcccc
aacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttggggggaccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccaccagttt
ctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacg
cccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagct
cgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctca
gaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccg
tacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgttccac
caggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagct
cctgtgggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccccttgggcacatggtacga
cctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccaccccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcag
tgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatcccccctgcagggccctggcctcacaacc
acagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatgga
gagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtg
accagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccc
tgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttag
tctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:28)**

Construcción 1755

El casete GILTΔ2-7Δ33-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ33-40-GAA70-952 (plásmido p1755). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ33-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ33-40 contiene una deleción de los restos de aminoácido 33-40 (Ser-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAGG
CATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTACTG
TGCTACCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgc
gacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccc
tgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctga
gctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgat
gatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtccacag
ccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgct
gaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagc
acctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacg
ggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgca
gccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagca
gtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatca
cccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggaggga
cttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatcgtgga
tcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacgagaccg
gccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggaggacatg
gtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggacggctg
ccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggaccctccaggcggcaaccatctgtgcctccagccacc
agtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggа
cacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagc
agctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacac
ctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccccagga
gccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgctgtt
ccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccacc
agctcctgtgggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggcacatggt
acgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggg
gcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctggcctca
caaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacg
atggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtac
gtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggt

gtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggt
gttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:29)**

Construcción 1756

El casete GILTΔ2-7Δ34-40-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7Δ34-40-GAA70-952 (plásmido p1756). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7Δ34-40 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7Δ34-40 contiene una deleción de los restos de aminoácido 34-40 (Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Arg) de la secuencia IGF-II humano.

ggtaccagctgctagcaagctaattcacaccaATGGGAATCCCAATGGGGAAGTCGATGCTGGTGCTTC
TCACCTTCTTGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT
GGACACCCTCCAGTTCGTCTGTGGGGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCCGCAAG
CGGCATCGTTGAGGAGTGCTGTTTCCGCAGCTGTGACCTGGCCCTCCTGGAGACGTA
CTGTGCTACCCCCCGCCAAGTCCGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacaca
gtgcgacgtccccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctaca
tccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaac
ctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgaccctgcggctggacg
tgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgcgtgtcc
acagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtg
ctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgcc
gagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacct
ctacgggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtc
ctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtg
cagcagtacctggacgttgtgggataccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccgctggggctactcctccaccg
ctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccgga
gggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatc
gtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttcatcaccaacga
gaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccacagccctggcctggtgggagg
acatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcaggggctctgaggac
ggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacctccaggcggcaaccatctgtgcctccag
ccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgg
gggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgg
gagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttcctgggca
acacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgcccca
ggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctcccccacctctacacgc
tgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggacc
accagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttccccttgggcacat
ggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgag
gggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcagggccctggcct
cacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggcccgaggggagctgttctgggac
gatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggt
acgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacg
gtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagtttctcgtcagctg
gtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:30)**

Construcción 1763

El casete GILTΔ2-7M1/L27A37-GAA70-952 a continuación se clonó usando los sitios Asp718 y NotI del casete y el vector pCEP4 para producir pCEP-GILTΔ2-7M1/L27A37-GAA70-952 (plásmido p1763). Los sitios de restricción para la clonación están en minúscula y negrita. La secuencia de aminoácidos espaciadora Gly, Ala, Pro (secuencia subrayada) separa el gen GAA y la etiqueta GILTΔ2-7M1/L27A37 (secuencia en mayúscula). El espaciador y la etiqueta están situados en dirección 5' del resto Ala70 de GAA. El casete GILTΔ2-7M1/L27A37 contiene las sustituciones Y27L y R37A en la secuencia de IGF-II humano. La secuencia de ADN del casete GILT difiere de la secuencia de ADN humano en cada 6.º codón.

ggtaccaagcttgccATGGGAATCCCAATGGGCAAGTCGATGCTGGTGCTGCTCACCTTCTT
GGCCTTTGCCTCGTGCTGCATTGCCGCTCTGTGCGGCGGGGAACTGGTGGACACCCT
CCAATTCGTCTGTGGGGACCGGGGCTTCCTGTTCAGCAGACCCGCAAGCCGTGTGAG
TGCTCGCAGCCGTGGCATTGTTGAGGAGTGCTGTTTTCGCAGCTGTGACCTGGCTCT
CCTGGAGACGTACTGCGCTACCCCCGCCAAGTCTGAGGGCGCGCCGgcacaccccggccgtc
ccagagcagtgcccacacagtgcgacgtcccccccaacagccgcttcgattgcgcccctgacaaggccatcacccaggaacagtgcga
ggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctacc
ccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgacccgtaccacccccaccttcttccccaaggacat
cctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcc
cttggagaccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcgtggagttctctgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccg
gcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcg
cagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggaccttgcg
cccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggtcggcacacggggtgttcctgctaaac
agcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggatgtctacatcttcctgggccc
agagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatactggggcctgggcttccacctgtgccg
ctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccctggacgtccaatggaacgacct
ggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcg
gccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggagg
ggggttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttccccgacttcaccaaccccaca
gccctggcctggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaact
tcatcaggggctctgaggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacccctccaggcg
gcaaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacag
ggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggccgatacgccggccactggacgg
gggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccg
acgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccccttcatgcggaaccacaa
cagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgca
ctcctcccccacctctacacgctgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggcccctcttcctggagttccccaaggact
ctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggaggccctgctcatcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgact
ggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggcagcctcccaccccacctgcagctccccgt
gagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggcccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatca
tccccctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgaccaagggtggagaggc
ccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttcctggccaggaata
acacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacggcg
ccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatg
ggagagcagtttctcgtcagctggtgttagtctagagcttgcta**gcggccgc (SEQ ID NO:31)**

Ejemplo 3: Expresión y purificación de enzimas GAA etiquetadas con GILT

Cultivo tisular

Los plásmidos de GAA etiquetados con GILT se transfectaron cada uno en células FreeStyle 293-F en suspensión como se describe por el fabricante (Invitrogen). En resumen, las células se cultivaron en medio Opti-MEM I (Invitrogen) en matraces de agitación de policarbonato en un agitador orbital a 37 °C y CO_2 al 8 %. Las células se ajustaron hasta una concentración de $1x10^6$ células/ml, después se transfectaron con una relación 1:1:1 de ml de células:µg de ADN: µl de 293 fectina. Se recogieron alícuotas del cultivo 5-7 días después de la transfección y se centrifugaron a 5.000 x g durante 5 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron congelados a -80 ºC.

Purificación y concentración de proteínas

El material de partida fue sobrenadante de cultivo celular de mamífero, como se describe anteriormente, descongelado de su almacenamiento a -80 ºC. Se añadió ácido cítrico hasta alcanzar pH 6,0, después se añadió sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración final de 1 M. El material se pasó a través de un filtro Supor-Mach de 0,2 µm (Nalgene).

El material filtrado se cargó en una columna de fenil-Sepharose™ 6 Low-Sub Fast-Flow (GE Healthcare) preparada con tampón de carga HIC (citrato 50 mM pH 6,0, $AmSO_4$ 1 M). La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado HIC (citrato 50 mM pH 6,0, $AmSO_4$ 0,8 M), y se eluyó con 5 volúmenes de columna de tampón de elución HIC (citrato 50 mM pH 6,0). Las muestras de cada pico de elución se combinaron y se intercambió el tampón a solución salina tamponada con fosfato (NaCl 145,15 mM, KCl 2,33 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 6,2) usando concentradores de centrifugación centricon (Amicon) y columnas de desalado Bio-Spin-6 (Bio-Rad).

Actividad enzimática

La expresión de GAA se determinó por un ensayo enzimático de para-nitrofenol (PNP). La enzima GAA se incubó en 50 µl de mezcla de reacción que contenía acetato sódico 100 mM pH 4,2 y sustrato de α-glucósido de para-nitrofenol (PNP) 10 mM (Sigma N1377). Las reacciones se incubaron a 37 ºC durante 20 minutos y se detuvieron con 300 µl de carbonato sódico 100 mM. Se midió la absorbancia a 405 nm en placas de microtitulación de 96 pocillos y se compararon con curvas patrón derivadas de p-nitrofenol (Sigma N7660). 1 unidad PNP de GAA se define como 1 nM de PNP hidrolizado/hora.

Ejemplo 4: Ensayos competitivos de unión a receptor

Se examinó la afinidad de proteínas etiquetadas con GILT por el receptor de IGF2 (IGF2R), el receptor IGF1 (IGF1R) y el receptor de insulina (IR) en experimentos competitivos de unión realizados en un formato de placa de 96 pocillos. Los receptores se recubrieron a temperatura ambiente durante una noche sobre placas blancas Reacti-bind (Pierce, n.º Cat. 437111) en tampón de recubrimiento (tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6) a una concentración de 0,5 µg/pocillos (IGF2R) o 1 µg/pocillo (IGF1R, IR). Las placas se lavaron con tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato más Tween-20 al 0,05 %), después se bloquearon en tampón de bloqueo Super (Pierce, n.º Cat. 37516) durante 1 hora. Después de otro lavado de la placa, se añadieron ligandos biotinilados (Cell Sciences) a los pocillos; los pocillos de IGF2R recibieron IGF2-biotina 8 nM, los pocillos de IGF1R recibieron IGF1-biotina 30 mM y los pocillos de IR recibieron insulina-biotina 20 nM. Junto con los ligandos biotinilados, los pocillos también contenían diluciones en serie de las muestras de proteína GAA etiquetada con GILT o ligandos de control no biotinilados que actúan como inhibidores de unión para los ligandos biotinilados. Después de una incubación con balanceo de 2 horas, las placas se lavaron y los ligandos biotinilados unidos se detectaron con una incubación con estreptavidina-HRP (R&D, n.º Cat. 890803, dilución 1:200 en tampón de bloqueo, 30 minutos), seguido por una incubación con sustrato quimioluminiscente Super Elisa Pico (Pierce, n.º Cat. 37070, 5 minutos). La señal quimioluminiscente se midió a 425 nm.

El porcentaje de ligando biotinilado unido se calculó para cada concentración de competidor en el ensayo de competición de unión a IGF2R y se determinaron los valores de CI_{50} (Figura 4). La proteína 1752 con una deleción de los restos 30-40 de IGF2 presentaba un valor de CI_{50} similar a ZC-701 etiquetado con GILT (Figura 4), lo que indica que la deleción de estos restos en la región del bucle de IGF2 no parece afectar a la unión a IGF2R. La proteína 1751 con una deleción de los restos 29-40 de IGF2 presentaba un valor mayor de CI_{50} (Figura 4), lo que indica que no compite también por la unión al IGF2R.

En una placa de ensayo de IGF2R diferente, la comparación de ZC-701 y la proteína 1763 produjo valores de CI_{50} que diferían en un 35 % (véase la figura 5).

En un ensayo que mide la competición de la unión de insulina biotinilada a insulina unida a placa, las proteínas 1751 y 1752 no fueron tan eficaces como inhibidores en comparación con 701 o IGF-II (véase la figura 6). Esto indica que las proteínas 1751 y 1752, con deleciones en la región de bucle correspondiente a los aminoácidos 30-40 de la etiqueta GILT, tenían una afinidad reducida por el receptor de insulina en comparación con la etiqueta GILT intacta en 701 o IGF-II.

En un ensayo que mide la competición de la unión de IGF-I biotinilado a IGF1R unido a placa, la proteína 1763 no fue tan eficaz como inhibidor en comparación con 701, IGF-II o IGF-I (véase la figura 7). Esto indica que la proteína 1763, con las mutaciones Δ2-7, Y27L y R37A en la etiqueta GILT, tenía una afinidad reducida por el receptor de IGF1 en comparación con ZC-701 o IGF-II.

Ejemplo 4. Ensayo adicional de unión al receptor de insulina

La proteína ZC-1487 se ensayó para su afinidad de unión por el receptor de insulina. La proteína ZC-1487 contiene el casete GILTD2-7M1/A37 que contiene una sustitución de Arg a Ala en el aminoácido 37 de la secuencia de IGF2 humano y es resistente a proteólisis por furina. Se analizaron dos lotes diferentes de esta proteína purificada de células CHO, ZC-1487-B26 y ZC-1487-B28 en un ensayo que mide la competición de la unión de insulina biotinilada con insulina unida a placa.

Se realizó un ensayo de unión al receptor de insulina por competición de insulina, IGF-II, ZC710B20 y ZC1487B26 o ZC-1487-B28 con la unión de insulina biotinilada al receptor de insulina (insulina-R).

Específicamente, se recubrieron placas Reacti-Bind™ blancas con insulina-R a una concentración 1 ug/pocillo/100 ul (38,4 nM). Las placas recubiertas se incubaron durante una noche a temperatura ambiente, después se lavaron 3X con tampón de lavado (300 ul/pocillo). Las placas después se bloquearon con tampón de bloqueo (300 ul/pocillo) durante 1 hora. Las etapas de lavado se repitieron y se extrajo cualquier resto de solución en las placas.

La insulina biotinilada se mezcló a 20 nM con diferentes concentraciones de insulina, IGF-II, ZC701B20, B26 y B28 por diluciones en serie (las concentraciones finales se muestran en la tabla 2). Se añadieron 100 ul de insulina diluida, IGF-II, ZC710B20, ZC1487B26, y ZC1487B28 en insulina-biotina 20 nM en las placas recubiertas y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas después se lavaron 3 con tampón de lavado. Se añadieron 100 ul de solución de trabajo de estreptavidina-HRP (50 ul de estreptavidina-HRP en 10 ml de tampón de bloqueo) a las placas y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 ul de solución de trabajo Elisa-Pico que contenía sustrato quimioluminiscente Elisa-Pico y se midió la quimioluminiscencia a 425 nm. Los resultados ejemplares se muestran en la Tabla 2, Figura 8 y Figura 9. Ambos lotes de ZC-1487 no fueron tan eficaces como inhibidores en comparación con ZC-701 o el control de insulina. Como puede observarse a partir de la Tabla 2 y la Figura 8, el péptido resistente a furina ZC-1487B26 se une al receptor de insulina con una avidez más de 10 veces inferior que ZC-701 y más de 20 veces menor que IGF-II de tipo silvestre.

Esto indica que la proteína 1487 tenía una afinidad reducida por el receptor de insulina en comparación con la etiqueta GILT en ZC-701.

Tabla 2. Actividad de unión al receptor de insulina - intensidad de quimioluminiscencia

Insulina (nM)												
Insulina-B (nM)	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**	**7,8125**	**3,90625**	**1,95313**	**0**
20 nM	38,00	43,00	66,00	102,00	243,00	479,00	750,00	780,00	503	1175	1046	2180
20 nM	13,00	25,00	57,00	141,00	229,00	517,00	517,00	885,00	1003	1344	1462	1694
promedio	**25,5**	**34,0**	**61,5**	**121,5**	**236,0**	**498,0**	**633,5**	**832,5**	**753,0**	**1259,5**	**1254,0**	**1937,0**
IFG-II (nM)												
Insulina-B (nM)	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**	**7,8125**	**3,90625**	**1,95313**	**0**
20 nM	70,00	268,00	356,00	644,00	828,00	991,00	1189,00	1492,00	1478	1478	1410	1874
20 nM	140,00	176,00	379,00	566,00	919,00	1224,00	1447,00	1377,00	1483	1370	1249	1959
promedio	**105,0**	**222,0**	**367,5**	**605,0**	**873,5**	**1107,5**	**1318,0**	**1434,5**	**1480,5**	**1424,0**	**1329,5**	**1916,5**
ZC701B20 (nM)												
Insulina-B (nM)	**4000**	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**	**7,8125**	**3,90625**	**0**
20 nM	191,00	387,00	526,00	715,00	800,00	1284,00	1116,00	1248,00	1474	1241	1450	1790
20 nM	250,00	329,00	483,00	774,00	767,00	1071,00	1024,00	968,00	1471	1118	1234	1886
promedio	**220,5**	**358,0**	**504,5**	**744,5**	**783,5**	**1177,5**	**1070,0**	**1108,0**	**1472,5**	**1179,5**	**1342,0**	**1838,0**
ZC1487B26 (nM)												
Insulina-B (nM)	**4000**	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**	**7,8125**	**3,90625**	**0**
20 nM	967,00	1190,00	1334,00	1210,00	1294,00	1462,00	1402,00	1281,00	1323	1612	1173	1952
20 nM	962,00	1189,00	1395,00	1379,00	1612,00	1396,00	1221,00	1013,00	1326	1182	1102	2069
promedio	**964,5**	**1189,5**	**1364,5**	**1294,5**	**1453,0**	**1429,0**	**1311,5**	**1147,0**	**1324,5**	**1397,0**	**1137,5**	**2010,5**

ZC1487B26 (nM)											
Insulina-B (nM)	**4000**	**2000**	**1000**	**500**	**250**	**125**	**62,5**	**31,25**	**15,625**	**7,8125**	**3,90625**	**0**
	2000 (4000)	1000 (2000)	500 (1000)	250 (500)	125 (250)	62,5 (125)	31,25 (62,5)	5,625 (31,25)	7,8125 (15,625)	3,90625 (7,8125)	1,95313 (3,90625)	0

Ejemplo 5. Ensayos de captación

Algunos mutantes se ensayaron para la retención de la actividad de captación. Se transfectaron células HEK293 con las construcciones 1479 (R37K), 1487 (R37A) o ZC-701. Después de la recolección, los sobrenadantes de cultivo se purificaron parcialmente por cromatografía HIC. Todas las muestras se trataron con PNGasa antes de la electroforesis.

La Figura 10 muestra las preparaciones parcialmente purificadas de las proteínas de fusión etiquetadas que contenían una etiqueta de muteína IGF-II resistente a furina analizada por SDS-PAGE e inmunotransferencia. Como puede observarse, la proteína de fusión codificada por la construcción 1487 que contiene la mutación R37A es resistente a furina exógena.

La Figura 11 ilustra los resultados ejemplares de captación de GAA etiquetada con GILT resistente a furina en mioblastos L6 de rata. Como se muestra en la figura 11, la $K_{captación}$ ejemplar para las proteínas 1479, 1487, ZC-701, y ZC-701 purificado son 4,5 nM, 4,4 nM, 5,0 nM y 2,6 nM, respectivamente, que indica que las proteínas codificadas por las construcciones 1487 (R37A) y 1479 (R37K) retienen la capacidad de captación eficaz en mioblastos L6 de rata. La captación eficaz de las proteínas de fusión que contienen una etiqueta GILT resistente a furina también indica que la etiqueta GILT resistente a furina retiene alta afinidad por el CI-MPR.

Equivalentes

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de averiguar, usando no más de la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. El alcance de la presente invención no pretende estar limitado por la descripción anterior, sino en su lugar está expuesto en las reivindicaciones adjuntas. Los artículos "uno", "una", y "el", "la", como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, salvo que se indique claramente lo contrario, deben entenderse incluyendo los referentes plurales. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechos si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presenten en, empleados en o relevantes de otro modo para un producto o proceso dado salvo que se indique lo contrario o sea evidente de otra forma a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en que exactamente un miembro del grupo está presente en, empleado en o relevante de otro modo para un producto o proceso dado. La invención también incluye realizaciones en que más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en o relevantes de otro modo para un producto o proceso dado. Además, tiene que entenderse que la invención abarca variaciones, combinaciones y permutaciones en que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones se introduce en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base (o, según lo relevante, cualquier otra reivindicación) salvo que se indique de otro modo o salvo que fuera evidente para un experto en la materia que pudiera surgir una contradicción o inconsistencia. Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en grupo de Markush o formato similar, tiene que entenderse que cada subgrupo de los elementos está también descrito, y cualquier elemento o elementos pueden retirarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención o aspectos de la invención se mencionan como comprendiendo elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten o consisten esencialmente en dichos elementos, características, etc. Con fines de simplicidad, esas realizaciones no se han expuesto específicamente en cada caso en el presente documento. También debe entenderse que cualquier realización de la invención, por ejemplo, cualquier realización encontrada dentro de la técnica anterior, puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica está indicada en la memoria descriptiva.

También debe entenderse que, salvo que se indique claramente lo contrario, en cualquier método reivindicado en el presente documento que incluya más de un acto, el orden de los actos del método no está necesariamente limitado al orden en que se indican los actos del método, pero la invención incluye realizaciones en que el orden está así limitado. Además, cuando las reivindicaciones indican una composición, la invención abarca métodos de uso de la composición y métodos de preparación de la composición. Cuando las reivindicaciones indican una composición, debe entenderse que la invención abarca métodos de uso de la composición y métodos de preparación de la composición.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BioMarin Pharmaceutical Inc.

<120> Péptidos de dirección lisosómica y usos de los mismos

<130> P50890EP2/AC

<150> 09743707.3
<151> 07-05-2009

<150> US 61/144106
<151> 12-01-2009

<150> US 61/051336
<151> 07-05-2008

<160> 35

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 67
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr
1               5                   10                  15

Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala
            20                  25                  30

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe
        35                  40                  45

Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala
    50                  55                  60

Lys Ser Glu
65
```

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de reconocimiento de proteasa furina

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 2

```
Arg Xaa Xaa Arg
1
```

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de reconocimiento de proteasa furina

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)
<223> Xaa es Lys o Arg

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es Lys o Arg

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

<210> *4*
<*211*> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de enlazador sintética

<400> *4*

Gly Ala Pro
1

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de enlazador sintética

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Gly Pro
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de escisión de furina - p1463 A40

<400> 6

Arg Val Ser Arg Arg Ser Ala Gly
1 5

<210> 7
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de enlazador sintética

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa es Thr o Ser

<400> 7

```
Asn Xaa Xaa
1
```

<210> 8
<211> 948
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción ZC-701 sintética

<400> 8

```
Ala Ala Leu Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys
1               5                  10                  15

Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg
            20                  25                  30

Arg Ser Arg Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu
        35                  40                  45

Ala Leu Leu Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Lys Ser Glu Gly Ala
    50                  55                  60
```

```
Pro Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val
65                  70                  75                  80

Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln
                85                  90                  95

Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly
            100                 105                 110

Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser
        115                 120                 125

Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr
    130                 135                 140

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

Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His
                165                 170                 175

Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu
            180                 185                 190

Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu
        195                 200                 205

Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly
    210                 215                 220

Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln
225                 230                 235                 240

Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu
                245                 250                 255

Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile
            260                 265                 270

Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr
        275                 280                 285

Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His
    290                 295                 300

Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro
```

305 310 315 320

Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr
325 330 335

Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp
340 345 350

Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His
355 360 365

Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val
370 375 380

Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp
385 390 395 400

Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly
405 410 415

Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg
420 425 430

Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala
435 440 445

Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile
450 455 460

Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser
465 470 475 480

Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu
485 490 495

Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp
500 505 510

Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly
515 520 525

Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val
530 535 540

Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe
545 550 555 560

```
Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala
                565                 570                 575

Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe
            580                 585                 590

Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His
        595                 600                 605

Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val
    610                 615                 620

Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala
625                 630                 635                 640

Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg
                645                 650                 655

Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser
            660                 665                 670

Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln
        675                 680                 685

Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His
    690                 695                 700

Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala
705                 710                 715                 720

Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val
                725                 730                 735

Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu
            740                 745                 750

Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp
        755                 760                 765

Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro
    770                 775                 780

Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp
785                 790                 795                 800

Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala
                805                 810                 815
```

```
Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser
            820                 825                 830

Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu
        835                 840                 845

Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu
    850                 855                 860

Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr
865                 870                 875                 880

Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln
                885                 890                 895

Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val
            900                 905                 910

Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr
        915                 920                 925

Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu
    930                 935                 940

Val Ser Trp Cys
945
```

<210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia proximal al sitio de escisión ZC-701 sintética

<400> 9

```
Arg Arg Ser Arg
1
```

<210> 10
<211> *4*
<*212*> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de reconocimiento de proteasa furina

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 10

Arg Xaa Xaa Arg
1

<210> 11
<211> 2970
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7-GAA70-952

<400> 11

ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc 60

tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg 120

agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg 180

caagccgtgt gagccgtcgc agccgtggca tcgttgagga gtgctgtttc cgcagctgtg 240

acctggccct cctggagacg tactgtgcta cccccgccaa gtccgagggc gcgccggcac 300

accccggccg tcccagagca gtgcccacac agtgcgacgt ccccccccaac agccgcttcg 360

attgcgcccc tgacaaggcc atcacccagg aacagtgcga ggcccgcggc tgctgctaca 420

tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc agatggggca gccctggtgc ttcttcccac 480

ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc tgagctcctc tgaaatgggc tacacggcca 540

ccctgacccg taccaccccc accttcttcc ccaaggacat cctgaccctg cggctggacg 600

tgatgatgga gactgagaac cgcctccact tcacgatcaa agatccagct aacaggcgct 660

acgaggtgcc cttggagacc ccgcgtgtcc acagccgggc accgtcccca ctctacagcg 720

tggagttctc tgaggagccc ttcggggtga tcgtgcaccg gcagctggac ggccgcgtgc 780

tgctgaacac gacggtggcg cccctgttct ttgcggacca gttccttcag ctgtccacct 840

cgctgccctc gcagtatatc acaggcctcg ccgagcacct cagtcccctg atgctcagca 900

ccagctggac caggatcacc ctgtggaacc gggaccttgc gcccacgccc ggtgcgaacc 960

tctacgggtc tcaccctttc tacctggcgc tggaggacgg cgggtcggca cacggggtgt 1020

tcctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg tcctgcagcc gagccctgcc cttagctgga 1080

ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca tcttcctggg cccagagccc aagagcgtgg 1140

tgcagcagta cctggacgtt gtgggatacc cgttcatgcc gccatactgg ggcctgggct 1200

tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca ccgctatcac ccgccaggtg gtggagaaca 1260

tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc aatggaacga cctggactac atggactccc 1320

ggagggactt cacgttcaac aaggatggct tccgggactt cccggccatg gtgcaggagc 1380

```
tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga tcgtggatcc tgccatcagc agctcgggcc     1440

ctgccgggag ctacaggccc tacgacgagg gtctgcggag gggggttttc atcaccaacg     1500

agaccggcca gccgctgatt gggaaggtat ggcccgggtc cactgccttc cccgacttca     1560

ccaaccccac agccctggcc tggtgggagg acatggtggc tgagttccat gaccaggtgc     1620

ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg agccttccaa cttcatcagg ggctctgagg     1680

acggctgccc caacaatgag ctggagaacc caccctacgt gcctggggtg gttgggggga     1740

ccctccaggc ggcaaccatc tgtgcctcca gccaccagtt tctctccaca cactacaacc     1800

tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca tcgcctccca cagggcgctg gtgaaggctc     1860

gggggacacg cccatttgtg atctcccgct cgacctttgc tggccacggc cgatacgccg     1920

gccactggac gggggacgtg tggagctcct gggagcagct cgcctcctcc gtgccagaaa     1980

tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc tggtcggggc cgacgtctgc ggcttcctgg     2040

gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct ggacccagct gggggccttc tacccccttca     2100

tgcggaacca caacagcctg ctcagtctgc cccaggagcc gtacagcttc agcgagccgg     2160

cccagcaggc catgaggaag gccctcaccc tgcgctacgc actcctcccc cacctctaca     2220

cgctgttcca ccaggcccac gtcgcggggg agaccgtggc ccggcccctc ttcctggagt     2280

tccccaagga ctctagcacc tggactgtgg accaccagct cctgtggggg gaggccctgc     2340

tcatcacccc agtgctccag gccgggaagg ccgaagtgac tggctacttc cccttgggca     2400

catggtacga cctgcagacg gtgccaatag aggcccttgg cagcctccca cccccacctg     2460

cagctccccg tgagccagcc atccacagcg aggggcagtg ggtgacgctg ccggcccccc     2520

tggacaccat caacgtccac ctccgggctg ggtacatcat ccccctgcag ggccctggcc     2580

tcacaaccac agagtcccgc cagcagccca tggccctggc tgtggccctg accaagggtg     2640

gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg atggagagag cctggaagtg ctggagcgag     2700

gggcctacac acaggtcatc ttcctggcca ggaataacac gatcgtgaat gagctggtac     2760

gtgtgaccag tgagggagct ggcctgcagc tgcagaaggt gactgtcctg ggcgtggcca     2820

cggcgcccca gcaggtcctc tccaacggtg tccctgtctc caacttcacc tacagccccg     2880

acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc tgttgatggg agagcagttt ctcgtcagct     2940

ggtgttagtc tagagcttgc tagcggccgc                                      2970
```

<210> 12
<211> 2970
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7/K37-GAA70-952

<400> 12

ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc 60

tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg 120

agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg 180

caagccgtgt gagcaagcgc agccgtggca tcgttgagga gtgctgtttc cgcagctgtg 240

acctggccct cctggagacg tactgtgcta cccccgccaa gtccgagggc gcgccggcac 300

accccggccg tcccagagca gtgcccacac agtgcgacgt ccccccccaac agccgcttcg 360

attgcgcccc tgacaaggcc atcacccagg aacagtgcga ggcccgcggc tgctgctaca 420

tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc agatggggca gccctggtgc ttcttcccac 480

ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc tgagctcctc tgaaatgggc tacacggcca 540

ccctgacccg taccaccccc accttcttcc ccaaggacat cctgaccctg cggctggacg 600

tgatgatgga gactgagaac cgcctccact tcacgatcaa agatccagct aacaggcgct 660

acgaggtgcc cttggagacc ccgcgtgtcc acagccgggc accgtcccca ctctacagcg 720

tggagttctc tgaggagccc ttcggggtga tcgtgcaccg gcagctggac ggccgcgtgc 780

tgctgaacac gacggtggcg cccctgttct ttgcggacca gttccttcag ctgtccacct 840

cgctgccctc gcagtatatc acaggcctcg ccgagcacct cagtcccctg atgctcagca 900

ccagctggac caggatcacc ctgtggaacc gggaccttgc gcccacgccc ggtgcgaacc 960

tctacgggtc tcaccctttc tacctggcgc tggaggacgg cgggtcggca cacggggtgt 1020

tcctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg tcctgcagcc gagccctgcc cttagctgga 1080

ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca tcttcctggg cccagagccc aagagcgtgg 1140

tgcagcagta cctggacgtt gtgggatacc cgttcatgcc gccatactgg ggcctgggct 1200

tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca ccgctatcac ccgccaggtg gtggagaaca 1260

tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc aatggaacga cctggactac atggactccc 1320

ggagggactt cacgttcaac aaggatggct tccgggactt cccggccatg gtgcaggagc 1380

tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga tcgtggatcc tgccatcagc agctcgggcc 1440

ctgccgggag ctacaggccc tacgacgagg gtctgcggag gggggttttc atcaccaacg 1500

agaccggcca gccgctgatt gggaaggtat ggcccgggtc cactgccttc cccgacttca 1560

ccaaccccac agccctggcc tggtgggagg acatggtggc tgagttccat gaccaggtgc 1620

ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg agccttccaa cttcatcagg ggctctgagg 1680

acggctgccc caacaatgag ctggagaacc caccctacgt gcctggggtg gttgggggga 1740

ccctccaggc ggcaaccatc tgtgcctcca gccaccagtt tctctccaca cactacaacc 1800

tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca tcgcctccca cagggcgctg gtgaaggctc 1860

```
gggggacacg cccatttgtg atctcccgct cgacctttgc tggccacggc cgatacgccg     1920

gccactggac gggggacgtg tggagctcct gggagcagct cgcctcctcc gtgccagaaa     1980

tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc tggtcggggc cgacgtctgc ggcttcctgg     2040

gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct ggacccagct gggggccttc taccccttca     2100

tgcggaacca caacagcctg ctcagtctgc cccaggagcc gtacagcttc agcgagccgg     2160

cccagcaggc catgaggaag gccctcaccc tgcgctacgc actcctcccc cacctctaca     2220

cgctgttcca ccaggcccac gtcgcggggg agaccgtggc ccggcccctc ttcctggagt     2280

tccccaagga ctctagcacc tggactgtgg accaccagct cctgtggggg gaggccctgc     2340

tcatcacccc agtgctccag gccgggaagg ccgaagtgac tggctacttc cccttgggca     2400

catggtacga cctgcagacg gtgccaatag aggcccttgg cagcctccca cccccacctg     2460

cagctccccg tgagccagcc atccacagcg aggggcagtg ggtgacgctg ccggcccccc     2520

tggacaccat caacgtccac ctccgggctg ggtacatcat ccccctgcag ggccctggcc     2580

tcacaaccac agagtcccgc cagcagccca tggccctggc tgtggccctg accaagggtg     2640

gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg atggagagag cctggaagtg ctggagcgag     2700

gggcctacac acaggtcatc ttcctggcca ggaataacac gatcgtgaat gagctggtac     2760

gtgtgaccag tgagggagct ggcctgcagc tgcagaaggt gactgtcctg ggcgtggcca     2820

cggcgcccca gcaggtcctc tccaacggtg tccctgtctc caacttcacc tacagccccg     2880

acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc tgttgatggg agagcagttt ctcgtcagct     2940

ggtgttagtc tagagcttgc tagcggccgc                                      2970
```

<210> 13
<211> 2970
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7/K40-GAA70-952

<400> 13

```
ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc      60
tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg     120
agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg     180
caagccgtgt gagccgtcgc agcaagggca tcgttgagga gtgctgtttc cgcagctgtg     240
acctggccct cctggagacg tactgtgcta cccccgccaa gtccgagggc gcgccggcac     300
accccggccg tcccagagca gtgcccacac agtgcgacgt ccccccccaac agccgcttcg    360
attgcgcccc tgacaaggcc atcacccagg aacagtgcga ggcccgcggc tgctgctaca     420
tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc agatggggca gccctggtgc ttcttcccac     480
```

```
ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc tgagctcctc tgaaatgggc tacacggcca      540
ccctgacccg taccaccccc accttcttcc ccaaggacat cctgaccctg cggctggacg      600
tgatgatgga gactgagaac cgcctccact tcacgatcaa agatccagct aacaggcgct      660
acgaggtgcc cttggagacc ccgcgtgtcc acagccgggc accgtcccca ctctacagcg      720
tggagttctc tgaggagccc ttcggggtga tcgtgcaccg gcagctggac ggccgcgtgc      780
tgctgaacac gacggtggcg cccctgttct ttgcggacca gttccttcag ctgtccacct      840
cgctgccctc gcagtatatc acaggcctcg ccgagcacct cagtcccctg atgctcagca      900
ccagctggac caggatcacc ctgtggaacc gggaccttgc gcccacgccc ggtgcgaacc      960
tctacgggtc tcaccctttc tacctggcgc tggaggacgg cgggtcggca cacggggtgt     1020
tcctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg tcctgcagcc gagccctgcc cttagctgga     1080
ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca tcttcctggg cccagagccc aagagcgtgg     1140
tgcagcagta cctggacgtt gtgggatacc cgttcatgcc gccatactgg ggcctgggct     1200
tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca ccgctatcac ccgccaggtg gtggagaaca     1260
tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc aatggaacga cctggactac atggactccc     1320
ggagggactt cacgttcaac aaggatggct tccgggactt cccggccatg gtgcaggagc     1380
tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga tcgtggatcc tgccatcagc agctcgggcc     1440
ctgccgggag ctacaggccc tacgacgagg gtctgcggag gggggttttc atcaccaacg     1500
agaccggcca gccgctgatt gggaaggtat ggcccgggtc cactgccttc cccgacttca     1560
ccaaccccac agccctggcc tggtgggagg acatggtggc tgagttccat gaccaggtgc     1620
ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg agccttccaa cttcatcagg ggctctgagg     1680
acggctgccc caacaatgag ctggagaacc caccctacgt gcctggggtg gttgggggga     1740
ccctccaggc ggcaaccatc tgtgcctcca gccaccagtt tctctccaca cactacaacc     1800
tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca tcgcctccca cagggcgctg gtgaaggctc     1860
gggggacacg cccatttgtg atctcccgct cgacctttgc tggccacggc cgatacgccg     1920
gccactggac gggggacgtg tggagctcct gggagcagct cgcctcctcc gtgccagaaa     1980
tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc tggtcggggc cgacgtctgc ggcttcctgg     2040
gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct ggacccagct gggggccttc tacccccttca    2100
tgcggaacca caacagcctg ctcagtctgc cccaggagcc gtacagcttc agcgagccgg     2160
cccagcaggc catgaggaag gccctcaccc tgcgctacgc actcctcccc cacctctaca     2220
cgctgttcca ccaggcccac gtcgcggggg agaccgtggc ccggcccctc ttcctggagt     2280
tccccaagga ctctagcacc tggactgtgg accaccagct cctgtggggg gaggccctgc     2340
```

tcatcacccc agtgctccag gccgggaagg ccgaagtgac tggctacttc cccttgggca 2400

catggtacga cctgcagacg gtgccaatag aggcccttgg cagcctccca cccccacctg 2460

cagctccccg tgagccagcc atccacagcg aggggcagtg ggtgacgctg ccggcccccc 2520

tggacaccat caacgtccac ctccgggctg ggtacatcat ccccctgcag ggccctggcc 2580

tcacaaccac agagtcccgc cagcagccca tggccctggc tgtggccctg accaagggtg 2640

gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg atggagagag cctggaagtg ctggagcgag 2700

gggcctacac acaggtcatc ttcctggcca ggaataacac gatcgtgaat gagctggtac 2760

gtgtgaccag tgagggagct ggcctgcagc tgcagaaggt gactgtcctg ggcgtggcca 2820

cggcgcccca gcaggtcctc tccaacggtg tccctgtctc caacttcacc tacagccccg 2880

acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc tgttgatggg agagcagttt ctcgtcagct 2940

ggtgttagtc tagagcttgc tagcggccgc 2970

<210> 14
<211> 2970
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7/A37-GAA70-952

<400> 14

```
ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc       60
tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg      120
agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg      180
caagccgtgt gagcgctcgc agccgtggca tcgttgagga gtgctgtttc cgcagctgtg      240
acctggccct cctggagacg tactgtgcta cccccgccaa gtccgagggc gcgccggcac      300
accccggccg tcccagagca gtgcccacac agtgcgacgt ccccccccaac agccgcttcg     360
attgcgcccc tgacaaggcc atcacccagg aacagtgcga ggcccgcggc tgctgctaca      420
tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc agatggggca gccctggtgc ttcttcccac      480
ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc tgagctcctc tgaaatgggc tacacggcca      540
ccctgacccg taccaccccc accttcttcc ccaaggacat cctgaccctg cggctggacg      600
tgatgatgga gactgagaac cgcctccact tcacgatcaa agatccagct aacaggcgct      660
acgaggtgcc cttggagacc ccgcgtgtcc acagccgggc accgtcccca ctctacagcg      720
tggagttctc tgaggagccc ttcggggtga tcgtgcaccg gcagctggac ggccgcgtgc      780
tgctgaacac gacggtggcg cccctgttct ttgcggacca gttccttcag ctgtccacct      840
cgctgccctc gcagtatatc acaggcctcg ccgagcacct cagtcccctg atgctcagca      900
ccagctggac caggatcacc ctgtggaacc gggaccttgc gcccacgccc ggtgcgaacc      960
```

tctacgggtc tcacccttтc tacctggcgc tggaggacgg cgggtcggca cacggggtgt 1020

tcctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg tcctgcagcc gagccctgcc cttagctgga 1080

ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca tcttcctggg cccagagccc aagagcgtgg 1140

tgcagcagta cctggacgtt gtgggatacc cgttcatgcc gccatactgg ggcctgggct 1200

tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca ccgctatcac ccgccaggtg gtggagaaca 1260

tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc aatggaacga cctggactac atggactccc 1320

ggagggactt cacgttcaac aaggatggct tccgggactt cccggccatg gtgcaggagc 1380

tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga tcgtggatcc tgccatcagc agctcgggcc 1440

ctgccgggag ctacaggccc tacgacgagg gtctgcggag gggggttttc atcaccaacg 1500

agaccggcca gccgctgatt gggaaggtat ggcccgggtc cactgccttc cccgacttca 1560

ccaaccccac agccctggcc tggtgggagg acatggtggc tgagttccat gaccaggtgc 1620

ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg agccttccaa cttcatcagg ggctctgagg 1680

acggctgccc caacaatgag ctggagaacc caccctacgt gcctggggtg gttgggggga 1740

ccctccaggc ggcaaccatc tgtgcctcca gccaccagtt tctctccaca cactacaacc 1800

tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca tcgcctccca cagggcgctg gtgaaggctc 1860

gggggacacg cccatttgtg atctcccgct cgacctttgc tggccacggc cgatacgccg 1920

gccactggac gggggacgtg tggagctcct gggagcagct cgcctcctcc gtgccagaaa 1980

tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc tggtcggggc cgacgtctgc ggcttcctgg 2040

gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct ggacccagct gggggccttc tacccccttca 2100

tgcggaacca caacagcctg ctcagtctgc cccaggagcc gtacagcttc agcgagccgg 2160

cccagcaggc catgaggaag gccctcaccc tgcgctacgc actcctcccc cacctctaca 2220

cgctgttcca ccaggcccac gtcgcggggg agaccgtggc ccggcccctc ttcctggagt 2280

tccccaagga ctctagcacc tggactgtgg accaccagct cctgtggggg gaggccctgc 2340

tcatcacccc agtgctccag gccgggaagg ccgaagtgac tggctacttc cccttgggca 2400

catggtacga cctgcagacg gtgccaatag aggcccttgg cagcctccca cccccacctg 2460

cagctccccg tgagccagcc atccacagcg aggggcagtg ggtgacgctg ccggcccccc 2520

tggacaccat caacgtccac ctccgggctg ggtacatcat ccccctgcag ggccctggcc 2580

tcacaaccac agagtcccgc cagcagccca tggccctggc tgtggccctg accaagggtg 2640

gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg atggagagag cctggaagtg ctggagcgag 2700

gggcctacac acaggtcatc ttcctggcca ggaataacac gatcgtgaat gagctggtac 2760

gtgtgaccag tgagggagct ggcctgcagc tgcagaaggt gactgtcctg ggcgtggcca 2820

cggcgcccca gcaggtcctc tccaacggtg tccctgtctc caacttcacc tacagccccg 2880

acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc tgttgatggg agagcagttt ctcgtcagct 2940

ggtgttagtc tagagcttgc tagcggccgc 2970

<210> 15
<211> 2970
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7/A40-GAA70-952

<400> 15

```
ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc      60
tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg     120
agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg     180
caagccgtgt gagccgtcgc agcgctggca tcgttgagga gtgctgtttc cgcagctgtg     240
acctggccct cctggagacg tactgtgcta cccccgccaa gtccgagggc gcgccggcac     300
accccggccg tcccagagca gtgcccacac agtgcgacgt ccccccccaac agccgcttcg    360
attgcgcccc tgacaaggcc atcacccagg aacagtgcga ggcccgcggc tgctgctaca     420
tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc agatggggca gccctggtgc ttcttcccac     480
ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc tgagctcctc tgaaatgggc tacacggcca     540
ccctgacccg taccaccccc accttcttcc ccaaggacat cctgaccctg cggctggacg     600
tgatgatgga gactgagaac cgcctccact tcacgatcaa agatccagct aacaggcgct     660
acgaggtgcc cttggagacc ccgcgtgtcc acagccgggc accgtcccca ctctacagcg     720
tggagttctc tgaggagccc ttcggggtga tcgtgcaccg gcagctggac ggccgcgtgc     780
tgctgaacac gacggtggcg cccctgttct ttgcggacca gttccttcag ctgtccacct     840
cgctgccctc gcagtatatc acaggcctcg ccgagcacct cagtcccctg atgctcagca     900
ccagctggac caggatcacc ctgtggaacc gggaccttgc gcccacgccc ggtgcgaacc     960
tctacgggtc tcacccttтc tacctggcgc tggaggacgg cgggtcggca cacggggtgt    1020
tcctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg tcctgcagcc gagccctgcc cttagctgga    1080
ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca tcttcctggg cccagagccc aagagcgtgg    1140
tgcagcagta cctggacgtt gtgggatacc cgttcatgcc gccatactgg ggcctgggct    1200
tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca ccgctatcac ccgccaggtg gtggagaaca    1260
tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc aatggaacga cctggactac atggactccc    1320
ggagggactt cacgttcaac aaggatggct tccgggactt cccggccatg gtgcaggagc    1380
tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga tcgtggatcc tgccatcagc agctcgggcc    1440
```

```
ctgccgggag ctacaggccc tacgacgagg gtctgcggag gggggttttc atcaccaacg     1500
agaccggcca gccgctgatt gggaaggtat ggcccgggtc cactgccttc cccgacttca     1560
ccaaccccac agccctggcc tggtgggagg acatggtggc tgagttccat gaccaggtgc     1620
ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg agccttccaa cttcatcagg ggctctgagg     1680
acggctgccc caacaatgag ctggagaacc caccctacgt gcctggggtg gttgggggga     1740
ccctccaggc ggcaaccatc tgtgcctcca gccaccagtt tctctccaca cactacaacc     1800
tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca tcgcctccca cagggcgctg gtgaaggctc     1860
gggggacacg cccatttgtg atctcccgct cgacctttgc tggccacggc cgatacgccg     1920
gccactggac gggggacgtg tggagctcct gggagcagct cgcctcctcc gtgccagaaa     1980
tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc tggtcggggc cgacgtctgc ggcttcctgg     2040
gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct ggacccagct gggggccttc tacccccttca     2100
tgcggaacca caacagcctg ctcagtctgc cccaggagcc gtacagcttc agcgagccgg     2160
cccagcaggc catgaggaag gccctcaccc tgcgctacgc actcctcccc cacctctaca     2220
cgctgttcca ccaggcccac gtcgcggggg agaccgtggc ccggcccctc ttcctggagt     2280
tccccaagga ctctagcacc tggactgtgg accaccagct cctgtggggg gaggccctgc     2340
tcatcacccc agtgctccag gccgggaagg ccgaagtgac tggctacttc cccttgggca     2400
catggtacga cctgcagacg gtgccaatag aggcccttgg cagcctccca cccccacctg     2460
cagctccccg tgagccagcc atccacagcg aggggcagtg ggtgacgctg ccggcccccc     2520
tggacaccat caacgtccac ctccgggctg ggtacatcat ccccctgcag ggccctggcc     2580
tcacaaccac agagtcccgc cagcagccca tggccctggc tgtggccctg accaagggtg     2640
gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg atggagagag cctggaagtg ctggagcgag     2700
gggcctacac acaggtcatc ttcctggcca ggaataacac gatcgtgaat gagctggtac     2760
gtgtgaccag tgagggagct ggcctgcagc tgcagaaggt gactgtcctg ggcgtggcca     2820
cggcgcccca gcaggtcctc tccaacggtg tccctgtctc caacttcacc tacagccccg     2880
acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc tgttgatggg agagcagttt ctcgtcagct     2940
ggtgttagtc tagagcttgc tagcggccgc                                      2970
```

<210> 16
<211> 2953
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7M1/K37-GAA70-952

<400> 16

```
ggtaccaagc ttgccatggg aatcccaatg ggcaagtcga tgctggtgct gctcaccttc      60
ttggcctttg cctcgtgctg cattgccgct ctgtgcggcg gggaactggt ggacaccctc     120
caattcgtct gtggggaccg gggcttctac ttcagcagac ccgcaagccg tgtgagtaag     180
cgcagccgtg gcattgttga ggagtgctgt tttcgcagct gtgacctggc tctcctggag     240
acgtactgcg ctacccccgc caagtctgag ggcgcgccgg cacaccccgg ccgtcccaga     300
gcagtgccca cacagtgcga cgtccccccc aacagccgct tcgattgcgc ccctgacaag     360
gccatcaccc aggaacagtg cgaggcccgc ggctgctgct acatccctgc aaagcagggg     420
ctgcagggag cccagatggg gcagccctgg tgcttcttcc cacccagcta ccccagctac     480
aagctggaga acctgagctc ctctgaaatg ggctacacgg ccaccctgac ccgtaccacc     540
cccaccttct tccccaagga catcctgacc ctgcggctgg acgtgatgat ggagactgag     600
aaccgcctcc acttcacgat caaagatcca gctaacaggc gctacgaggt gcccttggag     660
accccgcgtg tccacagccg ggcaccgtcc ccactctaca gcgtggagtt ctctgaggag     720
cccttcgggg tgatcgtgca ccggcagctg gacggccgcg tgctgctgaa cacgacggtg     780
gcgcccctgt tctttgcgga ccagttcctt cagctgtcca cctcgctgcc ctcgcagtat     840
atcacaggcc tcgccgagca cctcagtccc ctgatgctca gcaccagctg gaccaggatc     900
accctgtgga accgggacct tgcgcccacg cccggtgcga acctctacgg gtctcaccct     960
ttctacctgg cgctggagga cggcgggtcg gcacacgggg tgttcctgct aaacagcaat    1020
gccatggatg tggtcctgca gccgagccct gcccttagct ggaggtcgac aggtgggatc    1080
ctggatgtct acatcttcct gggcccagag cccaagagcg tggtgcagca gtacctggac    1140
gttgtgggat acccgttcat gccgccatac tggggcctgg gcttccacct gtgccgctgg    1200
ggctactcct ccaccgctat cacccgccag gtggtggaga acatgaccag ggcccacttc    1260
cccctggacg tccaatggaa cgacctggac tacatggact cccggaggga cttcacgttc    1320
aacaaggatg gcttccggga cttcccggcc atggtgcagg agctgcacca gggcggccgg    1380
cgctacatga tgatcgtgga tcctgccatc agcagctcgg gccctgccgg gagctacagg    1440
ccctacgacg agggtctgcg gaggggggtt ttcatcacca acgagaccgg ccagccgctg    1500
attgggaagg tatggcccgg gtccactgcc ttccccgact tcaccaaccc cacagccctg    1560
gcctggtggg aggacatggt ggctgagttc catgaccagg tgcccttcga cggcatgtgg    1620
attgacatga acgagccttc caacttcatc aggggctctg aggacggctg ccccaacaat    1680
gagctggaga acccacccta cgtgcctggg gtggttgggg ggaccctcca ggcggcaacc    1740
atctgtgcct ccagccacca gtttctctcc acacactaca acctgcacaa cctctacggc    1800
ctgaccgaag ccatcgcctc ccacagggcg ctggtgaagg ctcgggggac acgcccattt    1860
gtgatctccc gctcgacctt tgctggccac ggccgatacg ccggccactg gacgggggac    1920
```

gtgtggagct cctgggagca gctcgcctcc tccgtgccag aaatcctgca gtttaacctg 1980

ctgggggtgc ctctggtcgg ggccgacgtc tgcggcttcc tgggcaacac ctcagaggag 2040

ctgtgtgtgc gctggaccca gctgggggcc ttctaccct tcatgcggaa ccacaacagc 2100

ctgctcagtc tgccccagga gccgtacagc ttcagcgagc cggcccagca ggccatgagg 2160

aaggccctca ccctgcgcta cgcactcctc ccccacctct acacgctgtt ccaccaggcc 2220

cacgtcgcgg gggagaccgt ggcccggccc ctcttcctgg agttccccaa ggactctagc 2280

acctggactg tggaccacca gctcctgtgg ggggaggccc tgctcatcac cccagtgctc 2340

caggccggga aggccgaagt gactggctac ttccccttgg gcacatggta cgacctgcag 2400

acggtgccaa tagaggccct tggcagcctc ccacccccac ctgcagctcc ccgtgagcca 2460

gccatccaca gcgaggggca gtgggtgacg ctgccggccc ccctggacac catcaacgtc 2520

cacctccggg ctgggtacat catccccctg cagggccctg gcctcacaac cacagagtcc 2580

cgccagcagc ccatggccct ggctgtggcc ctgaccaagg gtggagaggc ccgaggggag 2640

ctgttctggg acgatggaga gagcctggaa gtgctggagc gaggggccta cacacaggtc 2700

atcttcctgg ccaggaataa cacgatcgtg aatgagctgg tacgtgtgac cagtgaggga 2760

gctggcctgc agctgcagaa ggtgactgtc ctgggcgtgg ccacggcgcc ccagcaggtc 2820

ctctccaacg gtgtccctgt ctccaacttc acctacagcc ccgacaccaa ggtcctggac 2880

atctgtgtct cgctgttgat gggagagcag tttctcgtca gctggtgtta gtctagagct 2940

tgctagcggc cgc 2953

<210> 17
<211> 2953
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7M1/A37-GAA70-952

<400> 17

```
ggtaccaagc ttgccatggg aatcccaatg ggcaagtcga tgctggtgct gctcaccttc      60
ttggcctttg cctcgtgctg cattgccgct ctgtgcggcg gggaactggt ggacaccctc     120
caattcgtct gtggggaccg gggcttctac ttcagcagac ccgcaagccg tgtgagtgct     180
cgcagccgtg gcattgttga ggagtgctgt tttcgcagct gtgacctggc tctcctggag     240
acgtactgcg ctacccccgc caagtctgag ggcgcgccgg cacaccccgg ccgtcccaga     300
gcagtgccca cacagtgcga cgtccccccc aacagccgct tcgattgcgc ccctgacaag     360
gccatcaccc aggaacagtg cgaggcccgc ggctgctgct acatccctgc aaagcagggg     420
ctgcagggag cccagatggg gcagccctgg tgcttcttcc cacccagcta ccccagctac     480
```

aagctggaga acctgagctc ctctgaaatg ggctacacgg ccaccctgac ccgtaccacc 540

cccaccttct tccccaagga catcctgacc ctgcggctgg acgtgatgat ggagactgag 600

aaccgcctcc acttcacgat caaagatcca gctaacaggc gctacgaggt gcccttggag 660

accccgcgtg tccacagccg ggcaccgtcc ccactctaca gcgtggagtt ctctgaggag 720

cccttcgggg tgatcgtgca ccggcagctg gacggccgcg tgctgctgaa cacgacggtg 780

gcgcccctgt tctttgcgga ccagttcctt cagctgtcca cctcgctgcc ctcgcagtat 840

atcacaggcc tcgccgagca cctcagtccc ctgatgctca gcaccagctg gaccaggatc 900

accctgtgga accgggacct tgcgcccacg cccggtgcga acctctacgg gtctcaccct 960

ttctacctgg cgctggagga cggcgggtcg gcacacgggg tgttcctgct aaacagcaat 1020

gccatggatg tggtcctgca gccgagccct gcccttagct ggaggtcgac aggtgggatc 1080

ctggatgtct acatcttcct gggcccagag cccaagagcg tggtgcagca gtacctggac 1140

gttgtgggat acccgttcat gccgccatac tggggcctgg gcttccacct gtgccgctgg 1200

ggctactcct ccaccgctat cacccgccag gtggtggaga acatgaccag ggcccacttc 1260

cccctggacg tccaatggaa cgacctggac tacatggact cccggaggga cttcacgttc 1320

aacaaggatg gcttccggga cttcccggcc atggtgcagg agctgcacca gggcggccgg 1380

cgctacatga tgatcgtgga tcctgccatc agcagctcgg gccctgccgg gagctacagg 1440

ccctacgacg agggtctgcg gaggggggtt ttcatcacca acgagaccgg ccagccgctg 1500

attgggaagg tatggcccgg gtccactgcc ttccccgact tcaccaaccc cacagccctg 1560

gcctggtggg aggacatggt ggctgagttc catgaccagg tgcccttcga cggcatgtgg 1620

attgacatga acgagccttc caacttcatc aggggctctg aggacggctg ccccaacaat 1680

gagctggaga acccacccta cgtgcctggg gtggttgggg ggaccctcca ggcggcaacc 1740

atctgtgcct ccagccacca gtttctctcc acacactaca acctgcacaa cctctacggc 1800

ctgaccgaag ccatcgcctc ccacagggcg ctggtgaagg ctcgggggac acgcccattt 1860

gtgatctccc gctcgacctt tgctggccac ggccgatacg ccggccactg gacgggggac 1920

gtgtggagct cctgggagca gctcgcctcc tccgtgccag aaatcctgca gtttaacctg 1980

ctgggggtgc ctctggtcgg ggccgacgtc tgcggcttcc tgggcaacac ctcagaggag 2040

ctgtgtgtgc gctggaccca gctgggggcc ttctaccccc tcatgcggaa ccacaacagc 2100

ctgctcagtc tgccccagga gccgtacagc ttcagcgagc cggcccagca ggccatgagg 2160

aaggccctca ccctgcgcta cgcactcctc ccccacctct acacgctgtt ccaccaggcc 2220

cacgtcgcgg gggagaccgt ggcccggccc ctcttcctgg agttccccaa ggactctagc 2280

acctggactg tggaccacca gctcctgtgg ggggaggccc tgctcatcac cccagtgctc 2340

caggccggga aggccgaagt gactggctac ttccccttgg gcacatggta cgacctgcag 2400

acggtgccaa tagaggccct tggcagcctc ccacccccac ctgcagctcc ccgtgagcca 2460

gccatccaca gcgaggggca gtgggtgacg ctgccggccc ccctggacac catcaacgtc 2520

cacctccggg ctgggtacat catccccctg cagggccctg gcctcacaac cacagagtcc 2580

cgccagcagc ccatggccct ggctgtggcc ctgaccaagg gtggagaggc ccgaggggag 2640

ctgttctggg acgatggaga gagcctggaa gtgctggagc gaggggccta cacacaggtc 2700

atcttcctgg ccaggaataa cacgatcgtg aatgagctgg tacgtgtgac cagtgaggga 2760

gctggcctgc agctgcagaa ggtgactgtc ctgggcgtgg ccacggcgcc ccagcaggtc 2820

ctctccaacg gtgtccctgt ctccaacttc acctacagcc ccgacaccaa ggtcctggac 2880

atctgtgtct cgctgttgat gggagagcag tttctcgtca gctggtgtta gtctagagct 2940

tgctagcggc cgc 2953

<210> 18
<211> 2940
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d30-39-GAA70-952

<400> 18

ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc 60

tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg 120

agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agccgtggca 180

tcgttgagga gtgctgtttc cgcagctgtg acctggccct cctggagacg tactgtgcta 240

cccccgccaa gtccgagggc gcgccggcac accccggccg tcccagagca gtgcccacac 300

agtgcgacgt ccccccccaac agccgcttcg attgcgcccc tgacaaggcc atcacccagg 360

aacagtgcga ggcccgcggc tgctgctaca tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc 420

agatggggca gccctggtgc ttcttcccac ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc 480

tgagctcctc tgaaatgggc tacacggcca ccctgacccg taccaccccc accttcttcc 540

ccaaggacat cctgaccctg cggctggacg tgatgatgga gactgagaac cgcctccact 600

tcacgatcaa agatccagct aacaggcgct acgaggtgcc cttggagacc ccgcgtgtcc 660

acagccgggc accgtcccca ctctacagcg tggagttctc tgaggagccc ttcggggtga 720

tcgtgcaccg gcagctggac ggccgcgtgc tgctgaacac gacggtggcg cccctgttct 780

ttgcggacca gttccttcag ctgtccacct cgctgccctc gcagtatatc acaggcctcg 840

ccgagcacct cagtcccctg atgctcagca ccagctggac caggatcacc ctgtggaacc 900

gggaccttgc gcccacgccc ggtgcgaacc tctacgggtc tcacccttc tacctggcgc 960

```
tggaggacgg cgggtcggca cacggggtgt tcctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg     1020
tcctgcagcc gagccctgcc cttagctgga ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca     1080
tcttcctggg cccagagccc aagagcgtgg tgcagcagta cctggacgtt gtgggatacc     1140
cgttcatgcc gccatactgg ggcctgggct tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca     1200
ccgctatcac ccgccaggtg gtggagaaca tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc     1260
aatggaacga cctggactac atggactccc ggagggactt cacgttcaac aaggatggct     1320
tccgggactt cccggccatg gtgcaggagc tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga     1380
tcgtggatcc tgccatcagc agctcgggcc ctgccgggag ctacaggccc tacgacgagg     1440
gtctgcggag gggggttttc atcaccaacg agaccggcca gccgctgatt gggaaggtat     1500
ggcccgggtc cactgccttc cccgacttca ccaaccccac agccctggcc tggtgggagg     1560
acatggtggc tgagttccat gaccaggtgc ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg     1620
agccttccaa cttcatcagg ggctctgagg acggctgccc caacaatgag ctggagaacc     1680
caccctacgt gcctggggtg gttgggggga ccctccaggc ggcaaccatc tgtgcctcca     1740
gccaccagtt tctctccaca cactacaacc tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca     1800
tcgcctccca cagggcgctg gtgaaggctc gggggacacg cccatttgtg atctcccgct     1860
cgacctttgc tggccacggc cgatacgccg gccactggac gggggacgtg tggagctcct     1920
gggagcagct cgcctcctcc gtgccagaaa tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc     1980
tggtcggggc cgacgtctgc ggcttcctgg gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct     2040
ggacccagct gggggccttc taccccttca tgcggaacca caacagcctg ctcagtctgc     2100
cccaggagcc gtacagcttc agcgagccgg cccagcaggc catgaggaag gccctcaccc     2160
tgcgctacgc actcctcccc cacctctaca cgctgttcca ccaggcccac gtcgcggggg     2220
agaccgtggc ccggcccctc ttcctggagt tccccaagga ctctagcacc tggactgtgg     2280
accaccagct cctgtggggg gaggccctgc tcatcacccc agtgctccag gccgggaagg     2340
ccgaagtgac tggctacttc cccttgggca catggtacga cctgcagacg gtgccaatag     2400
aggcccttgg cagcctccca cccccacctg cagctccccg tgagccagcc atccacagcg     2460
aggggcagtg ggtgacgctg ccggcccccc tggacaccat caacgtccac ctccgggctg     2520
ggtacatcat ccccctgcag ggccctggcc tcacaaccac agagtcccgc cagcagccca     2580
tggccctggc tgtggccctg accaagggtg gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg     2640
atggagagag cctggaagtg ctggagcgag gggcctacac acaggtcatc ttcctggcca     2700
ggaataacac gatcgtgaat gagctggtac gtgtgaccag tgagggagct ggcctgcagc     2760
tgcagaaggt gactgtcctg ggcgtggcca cggcgcccca gcaggtcctc tccaacggtg     2820
tccctgtctc caacttcacc tacagccccg acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc     2880
```

tgttgatggg agagcagttt ctcgtcagct ggtgttagtc tagagcttgc tagcggccgc 2940

<210> 19
<211> 2943
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d31-39-GAA70-952

<400> 19

```
ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc      60
tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg     120
agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcgtg     180
gcatcgttga ggagtgctgt ttccgcagct gtgacctggc cctcctggag acgtactgtg     240
ctacccccgc caagtccgag ggcgcgccgg cacaccccgg ccgtcccaga gcagtgccca     300
cacagtgcga cgtccccccc aacagccgct tcgattgcgc ccctgacaag gccatcaccc     360
aggaacagtg cgaggcccgc ggctgctgct acatccctgc aaagcagggg ctgcagggag     420
cccagatggg gcagccctgg tgcttcttcc cacccagcta ccccagctac aagctggaga     480
acctgagctc ctctgaaatg ggctacacgg ccaccctgac ccgtaccacc cccaccttct     540
tccccaagga catcctgacc ctgcggctgg acgtgatgat ggagactgag aaccgcctcc     600
acttcacgat caaagatcca gctaacaggc gctacgaggt gcccttggag accccgcgtg     660
tccacagccg ggcaccgtcc ccactctaca gcgtggagtt ctctgaggag cccttcgggg     720
tgatcgtgca ccggcagctg gacggccgcg tgctgctgaa cacgacggtg gcgcccctgt     780
tctttgcgga ccagttcctt cagctgtcca cctcgctgcc ctcgcagtat atcacaggcc     840
tcgccgagca cctcagtccc ctgatgctca gcaccagctg gaccaggatc accctgtgga     900
accgggacct tgcgcccacg cccggtgcga acctctacgg gtctcaccct ttctacctgg     960
cgctggagga cggcgggtcg gcacacgggg tgttcctgct aaacagcaat gccatggatg    1020
tggtcctgca gccgagccct gcccttagct ggaggtcgac aggtgggatc ctggatgtct    1080
acatcttcct gggcccagag cccaagagcg tggtgcagca gtacctggac gttgtgggat    1140
acccgttcat gccgccatac tggggcctgg gcttccacct gtgccgctgg ggctactcct    1200
ccaccgctat cacccgccag gtggtggaga acatgaccag ggcccacttc cccctggacg    1260
tccaatggaa cgacctggac tacatggact cccggaggga cttcacgttc aacaaggatg    1320
gcttccggga cttcccggcc atggtgcagg agctgcacca gggcggccgg cgctacatga    1380
tgatcgtgga tcctgccatc agcagctcgg gccctgccgg gagctacagg ccctacgacg    1440
agggtctgcg gagggggttt ttcatcacca acgagaccgg ccagccgctg attgggaagg    1500
```

tatggcccgg gtccactgcc ttccccgact tcaccaaccc cacagccctg gcctggtggg 1560

aggacatggt ggctgagttc catgaccagg tgcccttcga cggcatgtgg attgacatga 1620

acgagccttc caacttcatc aggggctctg aggacggctg ccccaacaat gagctggaga 1680

acccacccta cgtgcctggg gtggttgggg ggaccctcca ggcggcaacc atctgtgcct 1740

ccagccacca gtttctctcc acacactaca acctgcacaa cctctacggc ctgaccgaag 1800

ccatcgcctc ccacagggcg ctggtgaagg ctcgggggac acgcccattt gtgatctccc 1860

gctcgacctt tgctggccac ggccgatacg ccggccactg gacgggggac gtgtggagct 1920

cctgggagca gctcgcctcc tccgtgccag aaatcctgca gtttaacctg ctgggggtgc 1980

ctctggtcgg ggccgacgtc tgcggcttcc tgggcaacac ctcagaggag ctgtgtgtgc 2040

gctggaccca gctgggggcc ttctaccct tcatgcggaa ccacaacagc ctgctcagtc 2100

tgccccagga gccgtacagc ttcagcgagc cggcccagca ggccatgagg aaggccctca 2160

ccctgcgcta cgcactcctc ccccacctct acacgctgtt ccaccaggcc cacgtcgcgg 2220

gggagaccgt ggcccggccc ctcttcctgg agttccccaa ggactctagc acctggactg 2280

tggaccacca gctcctgtgg ggggaggccc tgctcatcac cccagtgctc caggccggga 2340

aggccgaagt gactggctac ttccccttgg gcacatggta cgacctgcag acggtgccaa 2400

tagaggccct tggcagcctc ccacccccac ctgcagctcc ccgtgagcca gccatccaca 2460

gcgaggggca gtgggtgacg ctgccggccc ccctggacac catcaacgtc cacctccggg 2520

ctgggtacat catccccctg cagggccctg gcctcacaac cacagagtcc cgccagcagc 2580

ccatggccct ggctgtggcc ctgaccaagg gtggagaggc ccgaggggag ctgttctggg 2640

acgatggaga gagcctggaa gtgctggagc gaggggccta cacacaggtc atcttcctgg 2700

ccaggaataa cacgatcgtg aatgagctgg tacgtgtgac cagtgaggga gctggcctgc 2760

agctgcagaa ggtgactgtc ctgggcgtgg ccacggcgcc ccagcaggtc ctctccaacg 2820

gtgtccctgt ctccaacttc acctacagcc ccgacaccaa ggtcctggac atctgtgtct 2880

cgctgttgat gggagagcag tttctcgtca gctggtgtta gtctagagct tgctagcggc 2940

cgc 2943

<210> 20
<211> 2946
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d32-39-GAA70-952

<400> 20

ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc 60

tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg 120

agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccc 180

gtggcatcgt tgaggagtgc tgtttccgca gctgtgacct ggccctcctg gagacgtact 240

gtgctacccc cgccaagtcc gagggcgcgc cggcacaccc cggccgtccc agagcagtgc 300

ccacacagtg cgacgtcccc cccaacagcc gcttcgattg cgcccctgac aaggccatca 360

cccaggaaca gtgcgaggcc cgcggctgct gctacatccc tgcaaagcag gggctgcagg 420

gagcccagat ggggcagccc tggtgcttct tcccacccag ctaccccagc tacaagctgg 480

agaacctgag ctcctctgaa atgggctaca cggccaccct gacccgtacc acccccacct 540

tcttccccaa ggacatcctg accctgcggc tggacgtgat gatggagact gagaaccgcc 600

tccacttcac gatcaaagat ccagctaaca ggcgctacga ggtgcccttg gagaccccgc 660

gtgtccacag ccgggcaccg tccccactct acagcgtgga gttctctgag gagcccttcg 720

gggtgatcgt gcaccggcag ctggacggcc gcgtgctgct gaacacgacg gtggcgcccc 780

tgttctttgc ggaccagttc cttcagctgt ccacctcgct gccctcgcag tatatcacag 840

gcctcgccga gcacctcagt cccctgatgc tcagcaccag ctggaccagg atcaccctgt 900

ggaaccggga ccttgcgccc acgcccggtg cgaacctcta cgggtctcac cctttctacc 960

tggcgctgga ggacggcggg tcggcacacg gggtgttcct gctaaacagc aatgccatgg 1020

atgtggtcct gcagccgagc cctgccctta gctggaggtc gacaggtggg atcctggatg 1080

tctacatctt cctgggccca gagcccaaga gcgtggtgca gcagtacctg gacgttgtgg 1140

gatacccgtt catgccgcca tactggggcc tgggcttcca cctgtgccgc tggggctact 1200

cctccaccgc tatcacccgc caggtggtgg agaacatgac cagggcccac ttccccctgg 1260

acgtccaatg gaacgacctg gactacatgg actcccggag ggacttcacg ttcaacaagg 1320

atggcttccg ggacttcccg gccatggtgc aggagctgca ccagggcggc cggcgctaca 1380

tgatgatcgt ggatcctgcc atcagcagct cgggccctgc cgggagctac aggccctacg 1440

acgagggtct gcggaggggg gttttcatca ccaacgagac cggccagccg ctgattggga 1500

aggtatggcc cgggtccact gccttccccg acttcaccaa ccccacagcc ctggcctggt 1560

gggaggacat ggtggctgag ttccatgacc aggtgccctt cgacggcatg tggattgaca 1620

tgaacgagcc ttccaacttc atcaggggct ctgaggacgg ctgccccaac aatgagctgg 1680

agaacccacc ctacgtgcct ggggtggttg gggggaccct ccaggcggca accatctgtg 1740

cctccagcca ccagtttctc tccacacact acaacctgca caacctctac ggcctgaccg 1800

aagccatcgc ctcccacagg gcgctggtga aggctcgggg gacacgccca tttgtgatct 1860

cccgctcgac ctttgctggc cacggccgat acgccggcca ctggacgggg gacgtgtgga 1920

gctcctggga gcagctcgcc tcctccgtgc cagaaatcct gcagtttaac ctgctggggg 1980

tgcctctggt cggggccgac gtctgcggct tcctgggcaa cacctcagag gagctgtgtg 2040

tgcgctggac ccagctgggg gccttctacc ccttcatgcg gaaccacaac agcctgctca 2100

gtctgcccca ggagccgtac agcttcagcg agccggccca gcaggccatg aggaaggccc 2160

tcaccctgcg ctacgcactc ctcccccacc tctacacgct gttccaccag gcccacgtcg 2220

cgggggagac cgtggcccgg cccctcttcc tggagttccc caaggactct agcacctgga 2280

ctgtggacca ccagctcctg tgggggggagg ccctgctcat caccccagtg ctccaggccg 2340

ggaaggccga agtgactggc tacttccccct tgggcacatg gtacgacctg cagacggtgc 2400

caatagaggc ccttggcagc ctcccacccc cacctgcagc tccccgtgag ccagccatcc 2460

acagcgaggg gcagtgggtg acgctgccgg ccccccctgga caccatcaac gtccacctcc 2520

gggctgggta catcatcccc ctgcagggcc ctggcctcac aaccacagag tcccgccagc 2580

agcccatggc cctggctgtg gccctgacca agggtggaga ggcccgaggg gagctgttct 2640

gggacgatgg agagagcctg gaagtgctgg agcgaggggc ctacacacag gtcatcttcc 2700

tggccaggaa taacacgatc gtgaatgagc tggtacgtgt gaccagtgag ggagctggcc 2760

tgcagctgca gaaggtgact gtcctgggcg tggccacggc gccccagcag gtcctctcca 2820

acggtgtccc tgtctccaac ttcacctaca gccccgacac caaggtcctg gacatctgtg 2880

tctcgctgtt gatgggagag cagtttctcg tcagctggtg ttagtctaga gcttgctagc 2940

ggccgc 2946

<210> 21
<211> 2949
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d33-39-GAA70-952

<400> 21

```
ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc       60
tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg      120
agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg      180
cacgtggcat cgttgaggag tgctgtttcc gcagctgtga cctggccctc ctggagacgt      240
actgtgctac ccccgccaag tccgagggcg cgccggcaca ccccggccgt cccagagcag      300
tgcccacaca gtgcgacgtc ccccccaaca gccgcttcga ttgcgccccc gacaaggcca      360
tcacccagga acagtgcgag gcccgcggct gctgctacat ccctgcaaag caggggctgc      420
agggagccca gatggggcag ccctggtgct tcttcccacc cagctacccc agctacaagc      480
tggagaacct gagctcctct gaaatgggct acacggccac cctgacccgt accacccccа      540
ccttcttccc caaggacatc ctgaccctgc ggctggacgt gatgatggag actgagaacc      600
```

gcctccactt cacgatcaaa gatccagcta acaggcgcta cgaggtgccc ttggagaccc 660

cgcgtgtcca cagccgggca ccgtccccac tctacagcgt ggagttctct gaggagccct 720

tcggggtgat cgtgcaccgg cagctggacg gccgcgtgct gctgaacacg acggtggcgc 780

ccctgttctt tgcggaccag ttccttcagc tgtccacctc gctgccctcg cagtatatca 840

caggcctcgc cgagcacctc agtcccctga tgctcagcac cagctggacc aggatcaccc 900

tgtggaaccg ggaccttgcg cccacgcccg gtgcgaacct ctacgggtct cacccctttct 960

acctggcgct ggaggacggc gggtcggcac acggggtgtt cctgctaaac agcaatgcca 1020

tggatgtggt cctgcagccg agccctgccc ttagctggag gtcgacaggt gggatcctgg 1080

atgtctacat cttcctgggc ccagagccca agagcgtggt gcagcagtac ctggacgttg 1140

tgggataccc gttcatgccg ccatactggg gcctgggctt ccacctgtgc cgctggggct 1200

actcctccac cgctatcacc cgccaggtgg tggagaacat gaccagggcc cacttccccc 1260

tggacgtcca atggaacgac ctggactaca tggactcccg gagggacttc acgttcaaca 1320

aggatggctt ccgggacttc ccggccatgg tgcaggagct gcaccagggc ggccggcgct 1380

acatgatgat cgtggatcct gccatcagca gctcgggccc tgccgggagc tacaggccct 1440

acgacgaggg tctgcggagg ggggttttca tcaccaacga gaccggccag ccgctgattg 1500

ggaaggtatg gcccgggtcc actgccttcc ccgacttcac caaccccaca gccctggcct 1560

ggtgggagga catggtggct gagttccatg accaggtgcc cttcgacggc atgtggattg 1620

acatgaacga gccttccaac ttcatcaggg gctctgagga cggctgcccc aacaatgagc 1680

tggagaaccc accctacgtg cctggggtgg ttgggggggac cctccaggcg gcaaccatct 1740

gtgcctccag ccaccagttt ctctccacac actacaacct gcacaacctc tacggcctga 1800

ccgaagccat cgcctcccac agggcgctgg tgaaggctcg ggggacacgc ccatttgtga 1860

tctcccgctc gacctttgct ggccacggcc gatacgccgg ccactggacg ggggacgtgt 1920

ggagctcctg ggagcagctc gcctcctccg tgccagaaat cctgcagttt aacctgctgg 1980

gggtgcctct ggtcggggcc gacgtctgcg gcttcctggg caacacctca gaggagctgt 2040

gtgtgcgctg gacccagctg ggggccttct acccccttcat gcggaaccac aacagcctgc 2100

tcagtctgcc ccaggagccg tacagcttca gcgagccggc ccagcaggcc atgaggaagg 2160

ccctcaccct gcgctacgca ctcctccccc acctctacac gctgttccac caggcccacg 2220

tcgcgggggа gaccgtggcc cggcccctct tcctggagtt ccccaaggac tctagcacct 2280

ggactgtgga ccaccagctc ctgtgggggg aggccctgct catcacccca gtgctccagg 2340

ccgggaaggc cgaagtgact ggctacttcc ccttgggcac atggtacgac ctgcagacgg 2400

tgccaataga ggcccttggc agcctcccac ccccacctgc agctccccgt gagccagcca 2460

```
tccacagcga ggggcagtgg gtgacgctgc cggcccccct ggacaccatc aacgtccacc     2520

tccgggctgg gtacatcatc cccctgcagg gccctggcct cacaaccaca gagtcccgcc     2580

agcagcccat ggccctggct gtggccctga ccaagggtgg agaggcccga ggggagctgt     2640

tctgggacga tggagagagc ctggaagtgc tggagcgagg ggcctacaca caggtcatct     2700

tcctggccag gaataacacg atcgtgaatg agctggtacg tgtgaccagt gagggagctg     2760

gcctgcagct gcagaaggtg actgtcctgg gcgtggccac ggcgccccag caggtcctct     2820

ccaacggtgt ccctgtctcc aacttcacct acagccccga caccaaggtc ctggacatct     2880

gtgtctcgct gttgatggga gagcagtttc tcgtcagctg gtgttagtct agagcttgct     2940

agcggccgc                                                            2949
```

<210> 22
<211> *2952*
<*212*> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d34-39-GAA70-952

<400> 22

```
ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc      60
tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg     120
agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg     180
caagccgtgg catcgttgag gagtgctgtt tccgcagctg tgacctggcc ctcctggaga     240
cgtactgtgc taccccgcc aagtccgagg gcgcgccggc acaccccggc cgtcccagag      300
cagtgcccac acagtgcgac gtcccccca acagccgctt cgattgcgcc cctgacaagg      360
ccatcaccca ggaacagtgc gaggcccgcg gctgctgcta catccctgca aagcaggggc     420
tgcagggagc ccagatgggg cagccctggt gcttcttccc acccagctac cccagctaca     480
agctggagaa cctgagctcc tctgaaatgg gctacacggc caccctgacc cgtaccaccc     540
ccaccttctt ccccaaggac atcctgaccc tgcggctgga cgtgatgatg gagactgaga     600
accgcctcca cttcacgatc aaagatccag ctaacaggcg ctacgaggtg cccttggaga     660
ccccgcgtgt ccacagccgg gcaccgtccc cactctacag cgtggagttc tctgaggagc     720
ccttcggggt gatcgtgcac cggcagctgg acggccgcgt gctgctgaac acgacggtgg     780
cgcccctgtt ctttgcggac cagttccttc agctgtccac ctcgctgccc tcgcagtata     840
tcacaggcct cgccgagcac ctcagtcccc tgatgctcag caccagctgg accaggatca     900
ccctgtggaa ccgggacctt gcgcccacgc ccggtgcgaa cctctacggg tctcaccctt     960
tctacctggc gctggaggac ggcgggtcgg cacacggggt gttcctgcta aacagcaatg    1020
ccatggatgt ggtcctgcag ccgagccctg cccttagctg gaggtcgaca ggtgggatcc    1080
```

tggatgtcta catcttcctg ggcccagagc ccaagagcgt ggtgcagcag tacctggacg 1140

ttgtgggata cccgttcatg ccgccatact ggggcctggg cttccacctg tgccgctggg 1200

gctactcctc caccgctatc acccgccagg tggtggagaa catgaccagg gcccacttcc 1260

ccctggacgt ccaatggaac gacctggact acatggactc ccggagggac ttcacgttca 1320

acaaggatgg cttccgggac ttcccggcca tggtgcagga gctgcaccag ggcggccggc 1380

gctacatgat gatcgtggat cctgccatca gcagctcggg ccctgccggg agctacaggc 1440

cctacgacga gggtctgcgg agggggggttt tcatcaccaa cgagaccggc cagccgctga 1500

ttgggaaggt atggcccggg tccactgcct tccccgactt caccaacccc acagccctgg 1560

cctggtggga ggacatggtg gctgagttcc atgaccaggt gcccttcgac ggcatgtgga 1620

ttgacatgaa cgagccttcc aacttcatca ggggctctga ggacggctgc cccaacaatg 1680

agctggagaa cccaccctac gtgcctgggg tggttggggg gaccctccag gcggcaacca 1740

tctgtgcctc cagccaccag tttctctcca cacactacaa cctgcacaac ctctacggcc 1800

tgaccgaagc catcgcctcc cacagggcgc tggtgaaggc tcgggggaca cgcccatttg 1860

tgatctcccg ctcgaccttt gctggccacg gccgatacgc cggccactgg acgggggacg 1920

tgtggagctc ctgggagcag ctcgcctcct ccgtgccaga aatcctgcag tttaacctgc 1980

tgggggtgcc tctggtcggg gccgacgtct gcggcttcct gggcaacacc tcagaggagc 2040

tgtgtgtgcg ctggacccag ctgggggcct tctacccctt catgcggaac cacaacagcc 2100

tgctcagtct gccccaggag ccgtacagct tcagcgagcc ggcccagcag gccatgagga 2160

aggccctcac cctgcgctac gcactcctcc cccacctcta cacgctgttc caccaggccc 2220

acgtcgcggg ggagaccgtg gcccggcccc tcttcctgga gttccccaag gactctagca 2280

cctggactgt ggaccaccag ctcctgtggg gggaggccct gctcatcacc ccagtgctcc 2340

aggccgggaa ggccgaagtg actggctact tccccttggg cacatggtac gacctgcaga 2400

cggtgccaat agaggccctt ggcagcctcc cacccccacc tgcagctccc cgtgagccag 2460

ccatccacag cgaggggcag tgggtgacgc tgccggcccc cctggacacc atcaacgtcc 2520

acctccgggc tgggtacatc atccccctgc agggccctgg cctcacaacc acagagtccc 2580

gccagcagcc catggccctg gctgtggccc tgaccaaggg tggagaggcc cgaggggagc 2640

tgttctggga cgatggagag agcctggaag tgctggagcg aggggcctac acacaggtca 2700

tcttcctggc caggaataac acgatcgtga atgagctggt acgtgtgacc agtgagggag 2760

ctggcctgca gctgcagaag gtgactgtcc tgggcgtggc cacggcgccc cagcaggtcc 2820

tctccaacgg tgtccctgtc tccaacttca cctacagccc cgacaccaag gtcctggaca 2880

tctgtgtctc gctgttgatg ggagagcagt ttctcgtcag ctggtgttag tctagagctt 2940

gctagcggcc gc 2952

<210> 23
<211> 2955
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d35-39-GAA70-952

<400> 23

ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc 60

tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg 120

agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg 180

caagccgtcg tggcatcgtt gaggagtgct gtttccgcag ctgtgacctg gccctcctgg 240

agacgtactg tgctaccccc gccaagtccg agggcgcgcc ggcacacccc ggccgtccca 300

gagcagtgcc cacacagtgc gacgtccccc ccaacagccg cttcgattgc gcccctgaca 360

aggccatcac ccaggaacag tgcgaggccc gcggctgctg ctacatccct gcaaagcagg 420

ggctgcaggg agcccagatg gggcagccct ggtgcttctt cccacccagc taccccagct 480

acaagctgga gaacctgagc tcctctgaaa tgggctacac ggccaccctg acccgtacca 540

cccccacctt cttccccaag gacatcctga ccctgcggct ggacgtgatg atggagactg 600

agaaccgcct ccacttcacg atcaaagatc cagctaacag gcgctacgag gtgcccttgg 660

agaccccgcg tgtccacagc cgggcaccgt ccccactcta cagcgtggag ttctctgagg 720

agcccttcgg ggtgatcgtg caccggcagc tggacggccg cgtgctgctg aacacgacgg 780

tggcgccccc gttctttgcg gaccagttcc ttcagctgtc cacctcgctg ccctcgcagt 840

atatcacagg cctcgccgag cacctcagtc ccctgatgct cagcaccagc tggaccagga 900

tcaccctgtg gaaccgggac cttgcgccca cgcccggtgc gaacctctac gggtctcacc 960

ctttctacct ggcgctggag gacggcgggt cggcacacgg ggtgttcctg ctaaacagca 1020

atgccatgga tgtggtcctg cagccgagcc ctgcccttag ctggaggtcg acaggtggga 1080

tcctggatgt ctacatcttc ctgggcccag agcccaagag cgtggtgcag cagtacctgg 1140

acgttgtggg atacccgttc atgccgccat actggggcct gggcttccac ctgtgccgct 1200

ggggctactc ctccaccgct atcacccgcc aggtggtgga gaacatgacc agggcccact 1260

tccccctgga cgtccaatgg aacgacctgg actacatgga ctcccggagg gacttcacgt 1320

tcaacaagga tggcttccgg gacttcccgg ccatggtgca ggagctgcac cagggcggcc 1380

ggcgctacat gatgatcgtg gatcctgcca tcagcagctc gggccctgcc gggagctaca 1440

ggccctacga cgagggtctg cggaggggag ttttcatcac caacgagacc ggccagccgc 1500

tgattgggaa ggtatggccc gggtccactg ccttccccga cttcaccaac cccacagccc 1560

```
tggcctggtg ggaggacatg gtggctgagt tccatgacca ggtgcccttc gacggcatgt     1620
ggattgacat gaacgagcct tccaacttca tcaggggctc tgaggacggc tgccccaaca     1680
atgagctgga gaacccaccc tacgtgcctg gggtggttgg ggggaccctc caggcggcaa     1740
ccatctgtgc ctccagccac cagtttctct ccacacacta caacctgcac aacctctacg     1800
gcctgaccga agccatcgcc tcccacaggg cgctggtgaa ggctcggggg acacgcccat     1860
ttgtgatctc ccgctcgacc tttgctggcc acggccgata cgccggccac tggacggggg     1920
acgtgtggag ctcctgggag cagctcgcct cctccgtgcc agaaatcctg cagtttaacc     1980
tgctgggggt gcctctggtc ggggccgacg tctgcggctt cctgggcaac acctcagagg     2040
agctgtgtgt gcgctggacc cagctggggg ccttctaccc cttcatgcgg aaccacaaca     2100
gcctgctcag tctgccccag gagccgtaca gcttcagcga gccggcccag caggccatga     2160
ggaaggccct caccctgcgc tacgcactcc tcccccacct ctacacgctg ttccaccagg     2220
cccacgtcgc gggggagacc gtggcccggc ccctcttcct ggagttcccc aaggactcta     2280
gcacctggac tgtggaccac cagctcctgt ggggggaggc cctgctcatc accccagtgc     2340
tccaggccgg gaaggccgaa gtgactggct acttcccctt gggcacatgg tacgacctgc     2400
agacggtgcc aatagaggcc cttggcagcc tcccaccccc acctgcagct ccccgtgagc     2460
cagccatcca cagcgagggg cagtgggtga cgctgccggc ccccctggac accatcaacg     2520
tccacctccg ggctgggtac atcatccccc tgcagggccc tggcctcaca accacagagt     2580
cccgccagca gcccatggcc ctggctgtgg ccctgaccaa gggtggagag gcccgagggg     2640
agctgttctg ggacgatgga gagagcctgg aagtgctgga gcgaggggcc tacacacagg     2700
tcatcttcct ggccaggaat aacacgatcg tgaatgagct ggtacgtgtg accagtgagg     2760
gagctggcct gcagctgcag aaggtgactg tcctgggcgt ggccacggcg ccccagcagg     2820
tcctctccaa cggtgtccct gtctccaact tcacctacag ccccgacacc aaggtcctgg     2880
acatctgtgt ctcgctgttg atgggagagc agtttctcgt cagctggtgt tagtctagag     2940
cttgctagcg gccgc                                                      2955
```

<210> 24
<211> 2958
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d36-39-GAA70-952

<400> 24

ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc 60

tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg 120

agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg 180
caagccgtgt gcgtggcatc gttgaggagt gctgtttccg cagctgtgac ctggccctcc 240
tggagacgta ctgtgctacc cccgccaagt ccgagggcgc gccggcacac cccggccgtc 300
ccagagcagt gcccacacag tgcgacgtcc cccccaacag ccgcttcgat tgcgcccctg 360
acaaggccat cacccaggaa cagtgcgagg cccgcggctg ctgctacatc cctgcaaagc 420
aggggctgca gggagcccag atggggcagc cctggtgctt cttcccaccc agctacccca 480
gctacaagct ggagaacctg agctcctctg aaatgggcta cacggccacc ctgacccgta 540
ccacccccac cttcttcccc aaggacatcc tgaccctgcg gctggacgtg atgatggaga 600
ctgagaaccg cctccacttc acgatcaaag atccagctaa caggcgctac gaggtgccct 660
tggagacccc gcgtgtccac agccgggcac cgtccccact ctacagcgtg gagttctctg 720
aggagccctt cggggtgatc gtgcaccggc agctggacgg ccgcgtgctg ctgaacacga 780
cggtggcgcc cctgttcttt gcggaccagt tccttcagct gtccacctcg ctgccctcgc 840
agtatatcac aggcctcgcc gagcacctca gtcccctgat gctcagcacc agctggacca 900
ggatcaccct gtggaaccgg gaccttgcgc ccacgcccgg tgcgaacctc tacgggtctc 960
acccttttcta cctggcgctg gaggacggcg ggtcggcaca cggggtgttc ctgctaaaca 1020
gcaatgccat ggatgtggtc ctgcagccga gccctgccct tagctggagg tcgacaggtg 1080
ggatcctgga tgtctacatc ttcctgggcc cagagcccaa gagcgtggtg cagcagtacc 1140
tggacgttgt gggatacccg ttcatgccgc catactgggg cctgggcttc cacctgtgcc 1200
gctggggcta ctcctccacc gctatcaccc gccaggtggt ggagaacatg accagggccc 1260
acttcccct ggacgtccaa tggaacgacc tggactacat ggactcccgg agggacttca 1320
cgttcaacaa ggatggcttc cgggacttcc cggccatggt gcaggagctg caccagggcg 1380
gccggcgcta catgatgatc gtggatcctg ccatcagcag ctcgggccct gccgggagct 1440
acaggcccta cgacgagggt ctgcggaggg gggttttcat caccaacgag accggccagc 1500
cgctgattgg gaaggtatgg cccgggtcca ctgccttccc cgacttcacc aaccccacag 1560
ccctggcctg gtgggaggac atggtggctg agttccatga ccaggtgccc ttcgacggca 1620
tgtggattga catgaacgag ccttccaact tcatcagggg ctctgaggac ggctgcccca 1680
acaatgagct ggagaaccca ccctacgtgc ctggggtggt tgggggggacc ctccaggcgg 1740
caaccatctg tgcctccagc caccagtttc tctccacaca ctacaacctg cacaacctct 1800
acggcctgac cgaagccatc gcctcccaca gggcgctggt gaaggctcgg gggacacgcc 1860
catttgtgat ctcccgctcg acctttgctg gccacggccg atacgccggc cactggacgg 1920
gggacgtgtg gagctcctgg gagcagctcg cctcctccgt gccagaaatc ctgcagttta 1980
acctgctggg ggtgcctctg gtcggggccg acgtctgcgg cttcctgggc aacacctcag 2040

aggagctgtg tgtgcgctgg acccagctgg gggccttcta ccccttcatg cggaaccaca 2100

acagcctgct cagtctgccc caggagccgt acagcttcag cgagccggcc cagcaggcca 2160

tgaggaaggc cctcaccctg cgctacgcac tcctccccca cctctacacg ctgttccacc 2220

aggcccacgt cgcgggggag accgtggccc ggcccctctt cctggagttc cccaaggact 2280

ctagcacctg gactgtggac caccagctcc tgtgggggga ggccctgctc atcaccccag 2340

tgctccaggc cgggaaggcc gaagtgactg gctacttccc cttgggcaca tggtacgacc 2400

tgcagacggt gccaatagag gcccttggca gcctcccacc cccacctgca gctccccgtg 2460

agccagccat ccacagcgag gggcagtggg tgacgctgcc ggcccccctg gacaccatca 2520

acgtccacct ccgggctggg tacatcatcc ccctgcaggg ccctggcctc acaaccacag 2580

agtcccgcca gcagcccatg gccctggctg tggccctgac caagggtgga gaggcccgag 2640

gggagctgtt ctgggacgat ggagagagcc tggaagtgct ggagcgaggg gcctacacac 2700

aggtcatctt cctggccagg aataacacga tcgtgaatga gctggtacgt gtgaccagtg 2760

agggagctgg cctgcagctg cagaaggtga ctgtcctggg cgtggccacg gcgccccagc 2820

aggtcctctc caacggtgtc cctgtctcca acttcaccta cagccccgac accaaggtcc 2880

tggacatctg tgtctcgctg ttgatgggag agcagtttct cgtcagctgg tgttagtcta 2940

gagcttgcta gcggccgc 2958

<210> 25
<211> 2934
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d29-40-GAA70-952

<400> 25

ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc 60

tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg 120

agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc ggcatcgttg 180

aggagtgctg tttccgcagc tgtgacctgg ccctcctgga gacgtactgt gctacccccg 240

ccaagtccga gggcgcgccg gcacaccccg gccgtcccag agcagtgccc acacagtgcg 300

acgtcccccc caacagccgc ttcgattgcg cccctgacaa ggccatcacc caggaacagt 360

gcgaggcccg cggctgctgc tacatccctg caaagcaggg gctgcaggga gcccagatgg 420

ggcagccctg gtgcttcttc ccacccagct accccagcta caagctggag aacctgagct 480

cctctgaaat gggctacacg gccaccctga cccgtaccac ccccaccttc ttccccaagg 540

acatcctgac cctgcggctg gacgtgatga tggagactga gaaccgcctc cacttcacga 600

tcaaagatcc agctaacagg cgctacgagg tgcccttgga gaccccgcgt gtccacagcc 660

gggcaccgtc cccactctac agcgtggagt tctctgagga gcccttcggg gtgatcgtgc 720

accggcagct ggacggccgc gtgctgctga acacgacggt ggcgcccctg ttctttgcgg 780

accagttcct tcagctgtcc acctcgctgc cctcgcagta tatcacaggc ctcgccgagc 840

acctcagtcc cctgatgctc agcaccagct ggaccaggat caccctgtgg aaccgggacc 900

ttgcgcccac gcccggtgcg aacctctacg ggtctcaccc tttctacctg gcgctggagg 960

acggcgggtc ggcacacggg gtgttcctgc taaacagcaa tgccatggat gtggtcctgc 1020

agccgagccc tgcccttagc tggaggtcga caggtgggat cctggatgtc tacatcttcc 1080

tgggcccaga gcccaagagc gtggtgcagc agtacctgga cgttgtggga tacccgttca 1140

tgccgccata ctggggcctg ggcttccacc tgtgccgctg gggctactcc tccaccgcta 1200

tcacccgcca ggtggtggag aacatgacca gggcccactt ccccctggac gtccaatgga 1260

acgacctgga ctacatggac tcccggaggg acttcacgtt caacaaggat ggcttccggg 1320

acttcccggc catggtgcag gagctgcacc agggcggccg gcgctacatg atgatcgtgg 1380

atcctgccat cagcagctcg ggccctgccg ggagctacag gccctacgac gagggtctgc 1440

ggaggggggt tttcatcacc aacgagaccg gccagccgct gattgggaag gtatggcccg 1500

ggtccactgc cttccccgac ttcaccaacc ccacagccct ggcctggtgg gaggacatgg 1560

tggctgagtt ccatgaccag gtgcccttcg acggcatgtg gattgacatg aacgagcctt 1620

ccaacttcat caggggctct gaggacggct gccccaacaa tgagctggag aacccaccct 1680

acgtgcctgg ggtggttggg gggaccctcc aggcggcaac catctgtgcc tccagccacc 1740

agtttctctc cacacactac aacctgcaca acctctacgg cctgaccgaa gccatcgcct 1800

cccacagggc gctggtgaag gctcgggggа cacgcccatt tgtgatctcc cgctcgacct 1860

ttgctggcca cggccgatac gccggccact ggacgggggа cgtgtggagc tcctgggagc 1920

agctcgcctc ctccgtgcca gaaatcctgc agtttaacct gctgggggtg cctctggtcg 1980

gggccgacgt ctgcggcttc ctgggcaaca cctcagagga gctgtgtgtg cgctggaccc 2040

agctgggggc cttctacccc ttcatgcgga accacaacag cctgctcagt ctgccccagg 2100

agccgtacag cttcagcgag ccggcccagc aggccatgag gaaggccctc accctgcgct 2160

acgcactcct cccccacctc tacacgctgt tccaccaggc ccacgtcgcg ggggagaccg 2220

tggcccggcc cctcttcctg gagttcccca aggactctag cacctggact gtggaccacc 2280

agctcctgtg gggggaggcc ctgctcatca ccccagtgct ccaggccggg aaggccgaag 2340

tgactggcta cttccccttg ggcacatggt acgacctgca gacggtgcca atagaggccc 2400

ttggcagcct cccaccccca cctgcagctc cccgtgagcc agccatccac agcgaggggc 2460

agtgggtgac gctgccggcc cccctggaca ccatcaacgt ccacctccgg gctgggtaca 2520

```
tcatcccccct gcagggccct ggcctcacaa ccacagagtc ccgccagcag cccatggccc     2580

tggctgtggc cctgaccaag ggtggagagg cccgagggga gctgttctgg gacgatggag     2640

agagcctgga agtgctggag cgaggggcct acacacaggt catcttcctg gccaggaata     2700

acacgatcgt gaatgagctg gtacgtgtga ccagtgaggg agctggcctg cagctgcaga     2760

aggtgactgt cctgggcgtg gccacggcgc cccagcaggt cctctccaac ggtgtccctg     2820

tctccaactt cacctacagc cccgacacca aggtcctgga catctgtgtc tcgctgttga     2880

tgggagagca gtttctcgtc agctggtgtt agtctagagc ttgctagcgg ccgc           2934
```

<210> 26
<211> 2937
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d30-40-GAA70-952

<400> 26

```
ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc      60
tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg     120
agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcggcatcg     180
ttgaggagtg ctgtttccgc agctgtgacc tggccctcct ggagacgtac tgtgctaccc     240
ccgccaagtc cgagggcgcg ccggcacacc ccggccgtcc cagagcagtg cccacacagt     300
gcgacgtccc ccccaacagc cgcttcgatt gcgcccctga caaggccatc acccaggaac     360
agtgcgaggc ccgcggctgc tgctacatcc ctgcaaagca ggggctgcag ggagcccaga     420
tggggcagcc ctggtgcttc ttcccaccca gctaccccag ctacaagctg gagaacctga     480
gctcctctga aatgggctac acggccaccc tgacccgtac cacccccacc ttcttcccca     540
aggacatcct gaccctgcgg ctggacgtga tgatggagac tgagaaccgc ctccacttca     600
cgatcaaaga tccagctaac aggcgctacg aggtgccctt ggagaccccg cgtgtccaca     660
gccgggcacc gtccccactc tacagcgtgg agttctctga ggagcccttc ggggtgatcg     720
tgcaccggca gctggacggc cgcgtgctgc tgaacacgac ggtggcgccc ctgttctttg     780
cggaccagtt ccttcagctg tccacctcgc tgccctcgca gtatatcaca ggcctcgccg     840
agcacctcag tcccctgatg ctcagcacca gctggaccag gatcaccctg tggaaccggg     900
accttgcgcc cacgcccggt gcgaacctct acgggtctca ccctttctac ctggcgctgg     960
aggacggcgg gtcggcacac ggggtgttcc tgctaaacag caatgccatg gatgtggtcc    1020
tgcagccgag ccctgccctt agctggaggt cgacaggtgg gatcctggat gtctacatct    1080
tcctgggccc agagcccaag agcgtggtgc agcagtacct ggacgttgtg ggatacccgt    1140
```

tcatgccgcc atactggggc ctgggcttcc acctgtgccg ctggggctac tcctccaccg 1200

ctatcacccg ccaggtggtg gagaacatga ccagggccca cttccccctg gacgtccaat 1260

ggaacgacct ggactacatg gactcccgga gggacttcac gttcaacaag gatggcttcc 1320

gggacttccc ggccatggtg caggagctgc accagggcgg ccggcgctac atgatgatcg 1380

tggatcctgc catcagcagc tcgggccctg ccgggagcta caggccctac gacgagggtc 1440

tgcggagggg ggttttcatc accaacgaga ccggccagcc gctgattggg aaggtatggc 1500

ccgggtccac tgccttcccc gacttcacca accccacagc cctggcctgg tgggaggaca 1560

tggtggctga gttccatgac caggtgccct tcgacggcat gtggattgac atgaacgagc 1620

cttccaactt catcaggggc tctgaggacg gctgccccaa caatgagctg gagaacccac 1680

cctacgtgcc tggggtggtt gggggggaccc tccaggcggc aaccatctgt gcctccagcc 1740

accagtttct ctccacacac tacaacctgc acaacctcta cggcctgacc gaagccatcg 1800

cctcccacag ggcgctggtg aaggctcggg ggacacgccc atttgtgatc tcccgctcga 1860

cctttgctgg ccacggccga tacgccggcc actggacggg ggacgtgtgg agctcctggg 1920

agcagctcgc ctcctccgtg ccagaaatcc tgcagtttaa cctgctgggg gtgcctctgg 1980

tcggggccga cgtctgcggc ttcctgggca acacctcaga ggagctgtgt gtgcgctgga 2040

cccagctggg ggccttctac cccttcatgc ggaaccacaa cagcctgctc agtctgcccc 2100

aggagccgta cagcttcagc gagccggccc agcaggccat gaggaaggcc ctcaccctgc 2160

gctacgcact cctcccccac ctctacacgc tgttccacca ggcccacgtc gcgggggaga 2220

ccgtggcccg gcccctcttc ctggagttcc ccaaggactc tagcacctgg actgtggacc 2280

accagctcct gtgggggggag gccctgctca tcaccccagt gctccaggcc gggaaggccg 2340

aagtgactgg ctacttcccc ttgggcacat ggtacgacct gcagacggtg ccaatagagg 2400

cccttggcag cctcccaccc ccacctgcag ctccccgtga gccagccatc cacagcgagg 2460

ggcagtgggt gacgctgccg gcccccctgg acaccatcaa cgtccacctc cgggctgggt 2520

acatcatccc cctgcagggc cctggcctca caaccacaga gtcccgccag cagcccatgg 2580

ccctggctgt ggccctgacc aagggtggag aggcccgagg ggagctgttc tgggacgatg 2640

gagagagcct ggaagtgctg gagcgagggg cctacacaca ggtcatcttc ctggccagga 2700

ataacacgat cgtgaatgag ctggtacgtg tgaccagtga gggagctggc ctgcagctgc 2760

agaaggtgac tgtcctgggc gtggccacgg cgccccagca ggtcctctcc aacggtgtcc 2820

ctgtctccaa cttcacctac agccccgaca ccaaggtcct ggacatctgt gtctcgctgt 2880

tgatgggaga gcagtttctc gtcagctggt gttagtctag agcttgctag cggccgc 2937

<210> 27

<211> 2940
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d31-40-GAA70-952

<400> 27

ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc 60

tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg 120

agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggggca 180

tcgttgagga gtgctgtttc cgcagctgtg acctggccct cctggagacg tactgtgcta 240

cccccgccaa gtccgagggc gcgccggcac accccggccg tcccagagca gtgcccacac 300

agtgcgacgt ccccccccaac agccgcttcg attgcgcccc tgacaaggcc atcacccagg 360

aacagtgcga ggcccgcggc tgctgctaca tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc 420

agatggggca gccctggtgc ttcttcccac ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc 480

tgagctcctc tgaaatgggc tacacggcca ccctgacccg taccaccccc accttcttcc 540

ccaaggacat cctgaccctg cggctggacg tgatgatgga gactgagaac cgcctccact 600

tcacgatcaa agatccagct aacaggcgct acgaggtgcc cttggagacc ccgcgtgtcc 660

acagccgggc accgtcccca ctctacagcg tggagttctc tgaggagccc ttcggggtga 720

tcgtgcaccg gcagctggac ggccgcgtgc tgctgaacac gacggtggcg cccctgttct 780

ttgcggacca gttccttcag ctgtccacct cgctgccctc gcagtatatc acaggcctcg 840

ccgagcacct cagtcccctg atgctcagca ccagctggac caggatcacc ctgtggaacc 900

gggaccttgc gcccacgccc ggtgcgaacc tctacgggtc tcacccttc tacctggcgc 960

tggaggacgg cgggtcggca cacggggtgt tcctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg 1020

tcctgcagcc gagccctgcc cttagctgga ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca 1080

tcttcctggg cccagagccc aagagcgtgg tgcagcagta cctggacgtt gtgggatacc 1140

cgttcatgcc gccatactgg ggcctgggct tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca 1200

ccgctatcac ccgccaggtg gtggagaaca tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc 1260

aatggaacga cctggactac atggactccc ggagggactt cacgttcaac aaggatggct 1320

tccgggactt cccggccatg gtgcaggagc tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga 1380

tcgtggatcc tgccatcagc agctcgggcc ctgccgggag ctacaggccc tacgacgagg 1440

gtctgcggag gggggttttc atcaccaacg agaccggcca gccgctgatt gggaaggtat 1500

ggcccgggtc cactgccttc cccgacttca ccaaccccac agccctggcc tggtgggagg 1560

acatggtggc tgagttccat gaccaggtgc ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg 1620

agccttccaa cttcatcagg ggctctgagg acggctgccc caacaatgag ctggagaacc 1680

caccctacgt gcctggggtg gttgggggga ccctccaggc ggcaaccatc tgtgcctcca 1740

gccaccagtt tctctccaca cactacaacc tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca 1800

tcgcctccca cagggcgctg gtgaaggctc gggggacacg cccatttgtg atctcccgct 1860

cgacctttgc tggccacggc cgatacgccg gccactggac gggggacgtg tggagctcct 1920

gggagcagct cgcctcctcc gtgccagaaa tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc 1980

tggtcggggc cgacgtctgc ggcttcctgg gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct 2040

ggacccagct gggggccttc tacccccttca tgcggaacca caacagcctg ctcagtctgc 2100

cccaggagcc gtacagcttc agcgagccgg cccagcaggc catgaggaag gccctcaccc 2160

tgcgctacgc actcctcccc cacctctaca cgctgttcca ccaggcccac gtcgcggggg 2220

agaccgtggc ccggcccctc ttcctggagt tccccaagga ctctagcacc tggactgtgg 2280

accaccagct cctgtggggg gaggccctgc tcatcacccc agtgctccag gccgggaagg 2340

ccgaagtgac tggctacttc cccttgggca catggtacga cctgcagacg gtgccaatag 2400

aggcccttgg cagcctccca cccccacctg cagctccccg tgagccagcc atccacagcg 2460

aggggcagtg ggtgacgctg ccggcccccc tggacaccat caacgtccac ctccgggctg 2520

ggtacatcat ccccctgcag ggccctggcc tcacaaccac agagtcccgc cagcagccca 2580

tggccctggc tgtggccctg accaagggtg gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg 2640

atggagagag cctggaagtg ctggagcgag gggcctacac acaggtcatc ttcctggcca 2700

ggaataacac gatcgtgaat gagctggtac gtgtgaccag tgagggagct ggcctgcagc 2760

tgcagaaggt gactgtcctg ggcgtggcca cggcgcccca gcaggtcctc tccaacggtg 2820

tccctgtctc caacttcacc tacagccccg acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc 2880

tgttgatggg agagcagttt ctcgtcagct ggtgttagtc tagagcttgc tagcggccgc 2940

<210> 28
<211> 2943
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d32-40-GAA70-952

<400> 28

```
ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc      60
tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg     120
agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg     180
gcatcgttga ggagtgctgt ttccgcagct gtgacctggc cctcctggag acgtactgtg     240
ctacccccgc caagtccgag ggcgcgccgg cacaccccgg ccgtcccaga gcagtgccca     300
cacagtgcga cgtccccccc aacagccgct tcgattgcgc ccctgacaag gccatcaccc     360
```

aggaacagtg cgaggcccgc ggctgctgct acatccctgc aaagcagggg ctgcagggag 420

cccagatggg gcagccctgg tgcttcttcc cacccagcta ccccagctac aagctggaga 480

acctgagctc ctctgaaatg ggctacacgg ccaccctgac ccgtaccacc cccaccttct 540

tccccaagga catcctgacc ctgcggctgg acgtgatgat ggagactgag aaccgcctcc 600

acttcacgat caaagatcca gctaacaggc gctacgaggt gcccttggag accccgcgtg 660

tccacagccg ggcaccgtcc ccactctaca gcgtggagtt ctctgaggag cccttcgggg 720

tgatcgtgca ccggcagctg gacggccgcg tgctgctgaa cacgacggtg gcgcccctgt 780

tctttgcgga ccagttcctt cagctgtcca cctcgctgcc ctcgcagtat atcacaggcc 840

tcgccgagca cctcagtccc ctgatgctca gcaccagctg gaccaggatc accctgtgga 900

accgggacct tgcgcccacg cccggtgcga acctctacgg gtctcaccct ttctacctgg 960

cgctggagga cggcgggtcg gcacacgggg tgttcctgct aaacagcaat gccatggatg 1020

tggtcctgca gccgagccct gcccttagct ggaggtcgac aggtgggatc ctggatgtct 1080

acatcttcct gggcccagag cccaagagcg tggtgcagca gtacctggac gttgtgggat 1140

acccgttcat gccgccatac tggggcctgg gcttccacct gtgccgctgg ggctactcct 1200

ccaccgctat cacccgccag gtggtggaga acatgaccag ggcccacttc cccctggacg 1260

tccaatggaa cgacctggac tacatggact cccggaggga cttcacgttc aacaaggatg 1320

gcttccggga cttcccggcc atggtgcagg agctgcacca gggcggccgg cgctacatga 1380

tgatcgtgga tcctgccatc agcagctcgg gccctgccgg gagctacagg ccctacgacg 1440

agggtctgcg gaggggggtt ttcatcacca acgagaccgg ccagccgctg attgggaagg 1500

tatggcccgg gtccactgcc ttccccgact tcaccaaccc cacagccctg gcctggtggg 1560

aggacatggt ggctgagttc catgaccagg tgcccttcga cggcatgtgg attgacatga 1620

acgagccttc caacttcatc aggggctctg aggacggctg ccccaacaat gagctggaga 1680

acccacccta cgtgcctggg gtggttgggg ggaccctcca ggcggcaacc atctgtgcct 1740

ccagccacca gtttctctcc acacactaca acctgcacaa cctctacggc ctgaccgaag 1800

ccatcgcctc ccacagggcg ctggtgaagg ctcgggggac acgcccattt gtgatctccc 1860

gctcgacctt tgctggccac ggccgatacg ccggccactg gacggggggac gtgtggagct 1920

cctgggagca gctcgcctcc tccgtgccag aaatcctgca gtttaacctg ctgggggtgc 1980

ctctggtcgg ggccgacgtc tgcggcttcc tgggcaacac ctcagaggag ctgtgtgtgc 2040

gctggaccca gctgggggcc ttctaccccct tcatgcggaa ccacaacagc ctgctcagtc 2100

tgccccagga gccgtacagc ttcagcgagc cggcccagca ggccatgagg aaggccctca 2160

ccctgcgcta cgcactcctc ccccacctct acacgctgtt ccaccaggcc cacgtcgcgg 2220

gggagaccgt ggcccggccc ctcttcctgg agttccccaa ggactctagc acctggactg 2280

tggaccacca gctcctgtgg ggggaggccc tgctcatcac cccagtgctc caggccggga 2340

aggccgaagt gactggctac ttccccttgg gcacatggta cgacctgcag acggtgccaa 2400

tagaggccct tggcagcctc ccacccccac ctgcagctcc ccgtgagcca gccatccaca 2460

gcgaggggca gtgggtgacg ctgccggccc ccctggacac catcaacgtc cacctccggg 2520

ctgggtacat catccccctg cagggccctg gcctcacaac cacagagtcc cgccagcagc 2580

ccatggccct ggctgtggcc ctgaccaagg gtggagaggc ccgaggggag ctgttctggg 2640

acgatggaga gagcctggaa gtgctggagc gaggggccta cacacaggtc atcttcctgg 2700

ccaggaataa cacgatcgtg aatgagctgg tacgtgtgac cagtgaggga gctggcctgc 2760

agctgcagaa ggtgactgtc ctgggcgtgg ccacggcgcc ccagcaggtc ctctccaacg 2820

gtgtccctgt ctccaacttc acctacagcc ccgacaccaa ggtcctggac atctgtgtct 2880

cgctgttgat gggagagcag tttctcgtca gctggtgtta gtctagagct tgctagcggc 2940

cgc 2943

<210> 29
<211> 2946
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d33-40-GAA70-952

<400> 29

```
ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc      60
tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg     120
agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg     180
caggcatcgt tgaggagtgc tgtttccgca gctgtgacct ggccctcctg gagacgtact     240
gtgctacccc cgccaagtcc gagggcgcgc cggcacaccc cggccgtccc agagcagtgc     300
ccacacagtg cgacgtcccc cccaacagcc gcttcgattg cgcccctgac aaggccatca     360
cccaggaaca gtgcgaggcc cgcggctgct gctacatccc tgcaaagcag gggctgcagg     420
gagcccagat ggggcagccc tggtgcttct tcccacccag ctaccccagc tacaagctgg     480
agaacctgag ctcctctgaa atgggctaca cggccaccct gacccgtacc acccccacct     540
tcttccccaa ggacatcctg accctgcggc tggacgtgat gatggagact gagaaccgcc     600
tccacttcac gatcaaagat ccagctaaca ggcgctacga ggtgcccttg gagaccccgc     660
gtgtccacag ccgggcaccg tccccactct acagcgtgga gttctctgag gagcccttcg     720
gggtgatcgt gcaccggcag ctggacggcc gcgtgctgct gaacacgacg gtggcgcccc     780
tgttctttgc ggaccagttc cttcagctgt ccacctcgct gccctcgcag tatatcacag     840
```

gcctcgccga gcacctcagt cccctgatgc tcagcaccag ctggaccagg atcaccctgt 900

ggaaccggga ccttgcgccc acgcccggtg cgaacctcta cgggtctcac cctttctacc 960

tggcgctgga ggacggcggg tcggcacacg gggtgttcct gctaaacagc aatgccatgg 1020

atgtggtcct gcagccgagc cctgccctta gctggaggtc gacaggtggg atcctggatg 1080

tctacatctt cctgggccca gagcccaaga gcgtggtgca gcagtacctg gacgttgtgg 1140

gatacccgtt catgccgcca tactggggcc tgggcttcca cctgtgccgc tggggctact 1200

cctccaccgc tatcacccgc caggtggtgg agaacatgac cagggcccac ttccccctgg 1260

acgtccaatg gaacgacctg gactacatgg actcccggag ggacttcacg ttcaacaagg 1320

atggcttccg ggacttcccg gccatggtgc aggagctgca ccagggcggc cggcgctaca 1380

tgatgatcgt ggatcctgcc atcagcagct cgggccctgc cgggagctac aggccctacg 1440

acgagggtct gcggaggggg gttttcatca ccaacgagac cggccagccg ctgattggga 1500

aggtatggcc cgggtccact gccttccccg acttcaccaa ccccacagcc ctggcctggt 1560

gggaggacat ggtggctgag ttccatgacc aggtgccctt cgacggcatg tggattgaca 1620

tgaacgagcc ttccaacttc atcaggggct ctgaggacgg ctgccccaac aatgagctgg 1680

agaacccacc ctacgtgcct ggggtggttg gggggaccct ccaggcggca accatctgtg 1740

cctccagcca ccagtttctc tccacacact acaacctgca caacctctac ggcctgaccg 1800

aagccatcgc ctcccacagg gcgctggtga aggctcgggg gacacgccca tttgtgatct 1860

cccgctcgac ctttgctggc cacggccgat acgccggcca ctggacgggg gacgtgtgga 1920

gctcctggga gcagctcgcc tcctccgtgc cagaaatcct gcagtttaac ctgctggggg 1980

tgcctctggt cggggccgac gtctgcggct tcctgggcaa cacctcagag gagctgtgtg 2040

tgcgctggac ccagctgggg gccttctacc ccttcatgcg gaaccacaac agcctgctca 2100

gtctgcccca ggagccgtac agcttcagcg agccggccca gcaggccatg aggaaggccc 2160

tcaccctgcg ctacgcactc ctcccccacc tctacacgct gttccaccag gcccacgtcg 2220

cgggggagac cgtggcccgg cccctcttcc tggagttccc caaggactct agcacctgga 2280

ctgtggacca ccagctcctg tgggggggagg ccctgctcat caccccagtg ctccaggccg 2340

ggaaggccga agtgactggc tacttccccct tgggcacatg gtacgacctg cagacggtgc 2400

caatagaggc ccttggcagc ctcccacccc cacctgcagc tccccgtgag ccagccatcc 2460

acagcgaggg gcagtgggtg acgctgccgg ccccccctgga caccatcaac gtccacctcc 2520

gggctgggta catcatcccc ctgcagggcc ctggcctcac aaccacagag tcccgccagc 2580

agcccatggc cctggctgtg gccctgacca agggtggaga ggcccgaggg gagctgttct 2640

gggacgatgg agagagcctg gaagtgctgg agcgaggggc ctacacacag gtcatcttcc 2700

tggccaggaa taacacgatc gtgaatgagc tggtacgtgt gaccagtgag ggagctggcc 2760

tgcagctgca gaaggtgact gtcctgggcg tggccacggc gccccagcag gtcctctcca 2820

acggtgtccc tgtctccaac ttcacctaca gccccgacac caaggtcctg gacatctgtg 2880

tctcgctgtt gatgggagag cagtttctcg tcagctggtg ttagtctaga gcttgctagc 2940

ggccgc 2946

<210> 30
<211> 2949
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7d34-40-GAA70-952

<400> 30

```
ggtaccagct gctagcaagc taattcacac caatgggaat cccaatgggg aagtcgatgc       60
tggtgcttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgctctg tgcggcgggg      120
agctggtgga caccctccag ttcgtctgtg gggaccgcgg cttctacttc agcaggcccg      180
caagcggcat cgttgaggag tgctgtttcc gcagctgtga cctggccctc ctggagacgt      240
actgtgctac ccccgccaag tccgagggcg cgccggcaca ccccggccgt cccagagcag      300
tgcccacaca gtgcgacgtc ccccccaaca gccgcttcga ttgcgccccc gacaaggcca      360
tcacccagga acagtgcgag gcccgcggct gctgctacat ccctgcaaag caggggctgc      420
agggagccca gatggggcag ccctggtgct tcttcccacc cagctacccc agctacaagc      480
tggagaacct gagctcctct gaaatgggct acacggccac cctgacccgt accacccccа      540
ccttcttccc caaggacatc ctgaccctgc ggctggacgt gatgatggag actgagaacc      600
gcctccactt cacgatcaaa gatccagcta acaggcgcta cgaggtgccc ttggagaccc      660
cgcgtgtcca cagccgggca ccgtccccac tctacagcgt ggagttctct gaggagccct      720
tcggggtgat cgtgcaccgg cagctggacg gccgcgtgct gctgaacacg acggtggcgc      780
ccctgttctt tgcggaccag ttccttcagc tgtccacctc gctgccctcg cagtatatca      840
caggcctcgc cgagcacctc agtcccctga tgctcagcac cagctggacc aggatcaccc      900
tgtggaaccg ggaccttgcg cccacgcccg gtgcgaacct ctacgggtct cacccтttct      960
acctggcgct ggaggacggc gggtcggcac acggggtgtt cctgctaaac agcaatgcca     1020
tggatgtggt cctgcagccg agccctgccc ttagctggag gtcgacaggt gggatcctgg     1080
atgtctacat cttcctgggc ccagagccca agagcgtggt gcagcagtac ctggacgttg     1140
tgggataccc gttcatgccg ccatactggg gcctgggctt ccacctgtgc cgctggggct     1200
actcctccac cgctatcacc cgccaggtgg tggagaacat gaccagggcc cacttccccc     1260
tggacgtcca atggaacgac ctggactaca tggactcccg gagggacttc acgttcaaca     1320
```

aggatggctt ccgggacttc ccggccatgg tgcaggagct gcaccagggc ggccggcgct 1380

acatgatgat cgtggatcct gccatcagca gctcgggccc tgccgggagc tacaggccct 1440

acgacgaggg tctgcggagg ggggttttca tcaccaacga gaccggccag ccgctgattg 1500

ggaaggtatg gcccgggtcc actgccttcc ccgacttcac caaccccaca gccctggcct 1560

ggtgggagga catggtggct gagttccatg accaggtgcc cttcgacggc atgtggattg 1620

acatgaacga gccttccaac ttcatcaggg gctctgagga cggctgcccc aacaatgagc 1680

tggagaaccc accctacgtg cctggggtgg ttgggggggac cctccaggcg gcaaccatct 1740

gtgcctccag ccaccagttt ctctccacac actacaacct gcacaacctc tacggcctga 1800

ccgaagccat cgcctcccac agggcgctgg tgaaggctcg ggggacacgc ccatttgtga 1860

tctcccgctc gacctttgct ggccacggcc gatacgccgg ccactggacg ggggacgtgt 1920

ggagctcctg ggagcagctc gcctcctccg tgccagaaat cctgcagttt aacctgctgg 1980

gggtgcctct ggtcggggcc gacgtctgcg gcttcctggg caacacctca gaggagctgt 2040

gtgtgcgctg gacccagctg ggggccttct acccccttcat gcggaaccac aacagcctgc 2100

tcagtctgcc ccaggagccg tacagcttca gcgagccggc ccagcaggcc atgaggaagg 2160

ccctcaccct gcgctacgca ctcctccccc acctctacac gctgttccac caggcccacg 2220

tcgcgggggga gaccgtggcc cggcccctct tcctggagtt ccccaaggac tctagcacct 2280

ggactgtgga ccaccagctc ctgtgggggg aggccctgct catcacccca gtgctccagg 2340

ccgggaaggc cgaagtgact ggctacttcc ccttgggcac atggtacgac ctgcagacgg 2400

tgccaataga ggcccttggc agcctcccac ccccacctgc agctccccgt gagccagcca 2460

tccacagcga ggggcagtgg gtgacgctgc cggcccccct ggacaccatc aacgtccacc 2520

tccgggctgg gtacatcatc cccctgcagg gccctggcct cacaaccaca gagtcccgcc 2580

agcagcccat ggccctggct gtggccctga ccaagggtgg agaggcccga ggggagctgt 2640

tctgggacga tggagagagc ctggaagtgc tggagcgagg ggcctacaca caggtcatct 2700

tcctggccag gaataacacg atcgtgaatg agctggtacg tgtgaccagt gagggagctg 2760

gcctgcagct gcagaaggtg actgtcctgg gcgtggccac ggcgccccag caggtcctct 2820

ccaacggtgt ccctgtctcc aacttcacct acagccccga caccaaggtc ctggacatct 2880

gtgtctcgct gttgatggga gagcagtttc tcgtcagctg gtgttagtct agagcttgct 2940

agcggccgc 2949

<210> 31
<211> 2953
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> casete GILTd2-7MI/L27A37-GAA70-952

<400> 31
5

ggtaccaagc ttgccatggg aatcccaatg ggcaagtcga tgctggtgct gctcaccttc 60

ttggcctttg cctcgtgctg cattgccgct ctgtgcggcg gggaactggt ggacaccctc 120

caattcgtct gtggggaccg gggcttcctg ttcagcagac ccgcaagccg tgtgagtgct 180

cgcagccgtg gcattgttga ggagtgctgt tttcgcagct gtgacctggc tctcctggag 240

acgtactgcg ctacccccgc caagtctgag ggcgcgccgg cacaccccgg ccgtcccaga 300

gcagtgccca cacagtgcga cgtccccccc aacagccgct tcgattgcgc ccctgacaag 360

gccatcaccc aggaacagtg cgaggcccgc ggctgctgct acatccctgc aaagcagggg 420

ctgcagggag cccagatggg gcagccctgg tgcttcttcc cacccagcta ccccagctac 480

aagctggaga acctgagctc ctctgaaatg ggctacacgg ccaccctgac ccgtaccacc 540

cccaccttct tccccaagga catcctgacc ctgcggctgg acgtgatgat ggagactgag 600

aaccgcctcc acttcacgat caaagatcca gctaacaggc gctacgaggt gcccttggag 660

accccgcgtg tccacagccg ggcaccgtcc ccactctaca gcgtggagtt ctctgaggag 720

cccttcgggg tgatcgtgca ccggcagctg gacggccgcg tgctgctgaa cacgacggtg 780

gcgcccctgt tctttgcgga ccagttcctt cagctgtcca cctcgctgcc ctcgcagtat 840

atcacaggcc tcgccgagca cctcagtccc ctgatgctca gcaccagctg gaccaggatc 900

accctgtgga accgggacct tgcgcccacg cccggtgcga acctctacgg gtctcaccct 960

ttctacctgg cgctggagga cggcgggtcg gcacacgggg tgttcctgct aaacagcaat 1020

gccatggatg tggtcctgca gccgagccct gcccttagct ggaggtcgac aggtgggatc 1080

ctggatgtct acatcttcct gggcccagag cccaagagcg tggtgcagca gtacctggac 1140

gttgtgggat acccgttcat gccgccatac tggggcctgg gcttccacct gtgccgctgg 1200

ggctactcct ccaccgctat cacccgccag gtggtggaga acatgaccag ggcccacttc 1260

cccctggacg tccaatggaa cgacctggac tacatggact cccggaggga cttcacgttc 1320

aacaaggatg gcttccggga cttcccggcc atggtgcagg agctgcacca gggcggccgg 1380

cgctacatga tgatcgtgga tcctgccatc agcagctcgg gccctgccgg gagctacagg 1440

ccctacgacg agggtctgcg gaggggggtt ttcatcacca acgagaccgg ccagccgctg 1500

attgggaagg tatggcccgg gtccactgcc ttccccgact tcaccaaccc cacagccctg 1560

gcctggtggg aggacatggt ggctgagttc catgaccagg tgcccttcga cggcatgtgg 1620

attgacatga acgagccttc caacttcatc aggggctctg aggacggctg ccccaacaat 1680

gagctggaga acccacccta cgtgcctggg gtggttgggg ggaccctcca ggcggcaacc 1740

atctgtgcct ccagccacca gtttctctcc acacactaca acctgcacaa cctctacggc 1800

```
ctgaccgaag ccatcgcctc ccacagggcg ctggtgaagg ctcgggggac acgcccattt     1860

gtgatctccc gctcgacctt tgctggccac ggccgatacg ccggccactg gacgggggac     1920

gtgtggagct cctgggagca gctcgcctcc tccgtgccag aaatcctgca gtttaacctg     1980

ctgggggtgc ctctggtcgg ggccgacgtc tgcggcttcc tgggcaacac ctcagaggag     2040

ctgtgtgtgc gctggaccca gctgggggcc ttctaccct tcatgcggaa ccacaacagc     2100

ctgctcagtc tgccccagga gccgtacagc ttcagcgagc cggcccagca ggccatgagg     2160

aaggccctca ccctgcgcta cgcactcctc ccccacctct acacgctgtt ccaccaggcc     2220

cacgtcgcgg gggagaccgt ggcccggccc ctcttcctgg agttccccaa ggactctagc     2280

acctggactg tggaccacca gctcctgtgg ggggaggccc tgctcatcac cccagtgctc     2340

caggccggga aggccgaagt gactggctac ttccccttgg gcacatggta cgacctgcag     2400

acggtgccaa tagaggccct tggcagcctc ccacccccac ctgcagctcc ccgtgagcca     2460

gccatccaca gcgaggggca gtgggtgacg ctgccggccc ccctggacac catcaacgtc     2520

cacctccggg ctgggtacat catccccctg cagggccctg gcctcacaac cacagagtcc     2580

cgccagcagc ccatggccct ggctgtggcc ctgaccaagg gtggagaggc ccgaggggag     2640

ctgttctggg acgatggaga gagcctggaa gtgctggagc gaggggccta cacacaggtc     2700

atcttcctgg ccaggaataa cacgatcgtg aatgagctgg tacgtgtgac cagtgaggga     2760

gctggcctgc agctgcagaa ggtgactgtc ctgggcgtgg ccacggcgcc ccagcaggtc     2820

ctctccaacg gtgtccctgt ctccaacttc acctacagcc ccgacaccaa ggtcctggac     2880

atctgtgtct cgctgttgat gggagagcag tttctcgtca gctggtgtta gtctagagct     2940

tgctagcggc cgc                                                        2953
```

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de escisión de furina - ZC-701

<400> 32

```
Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly
1               5
```

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de escisión de furina - p1459 K37

<400> 33

Arg Val Ser Lys Arg Ser Arg Gly
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de escisión de furina - p1460 K40

<400> 34

Arg Val Ser Arg Arg Ser Lys Gly
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de escisión de furina - p1461 A37

<400> 35

Arg Val Ser Ala Arg Ser Arg Gly
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a la alfa-glucosidasa ácida (GAA) humana de tipo silvestre que todavía codifica una proteína que puede rescatar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico; un resto de dirección lisosómica, en donde el resto de dirección lisosómica es una muteína IGF-II que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 70 % idéntica a IGF-II humana madura (SEQ ID NO: 1), con una mutación dentro de una región correspondiente a los aminoácidos 30-40 de la SEQ ID NO: 1 de modo que dicha mutación anula al menos un sitio de escisión por proteasa furina, donde la muteína IGF-II es (a) resistente a la escisión con furina, (b) tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de insulina respecto a la afinidad de IGF-II humana de origen natural por el receptor de insulina y (c) se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes humano de una manera independiente de manosa-6-fosfato.

2. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la muteína IGF-II comprende una deleción de los aminoácidos 30-40 de la SEQ ID NO: 1.

3. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la mutación es una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a Arg37 de la SEQ ID NO: 1.

4. El ácido nucleico de la reivindicación 3, en donde la sustitución de aminoácido es una sustitución de Lys o Ala.

5. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la muteína IGF-II tiene afinidad de unión disminuida por el receptor de IGF-I respecto a la afinidad de IGF-II humano de origen natural por el receptor de IGF-I.

6. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión comprende los aminoácidos 70-952 de GAA humana.

7. El ácido nucleico de la reivindicación 6, en donde la proteína de fusión comprende un espaciador entre los aminoácidos 70-952 de GAA humana y la muteína IGF-II.

8. El ácido nucleico de la reivindicación 7, en donde el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos Gly-Ala-Pro.

9. Una célula aislada que contiene el ácido nucleico de la reivindicación 1.

10. Una célula aislada que contiene el ácido nucleico de la reivindicación 6.

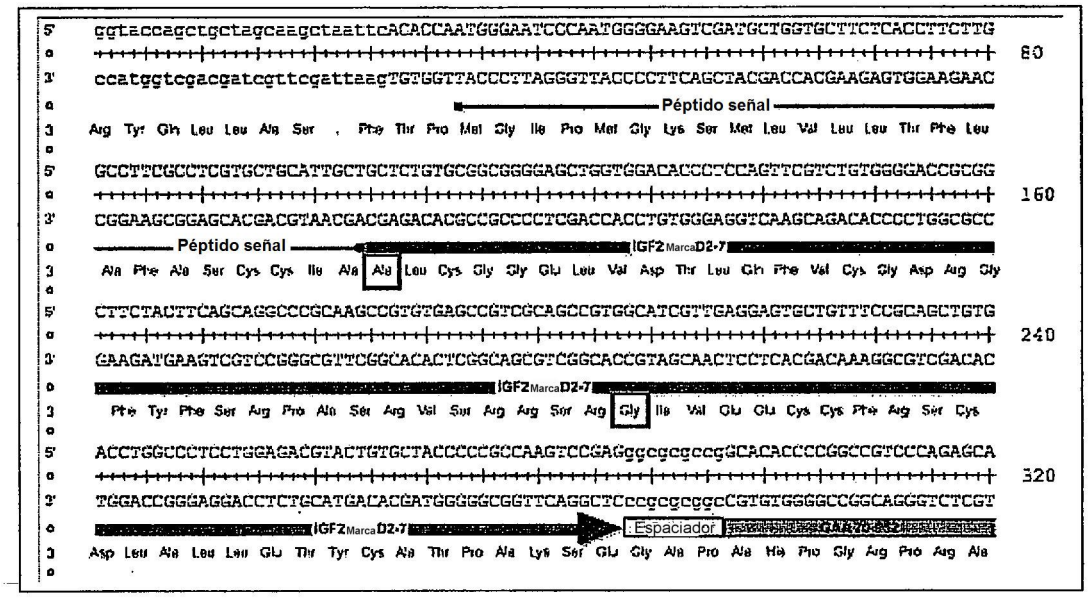


Figura 1. Mapa del extremo N-terminal de ZC-701. Los dos restos de aminoácido en recuadro en rojo son sitios de eventos de escisión. El primero es el sitio de escisión del péptido señal, el segundo es el sitio de una escisión con furina.

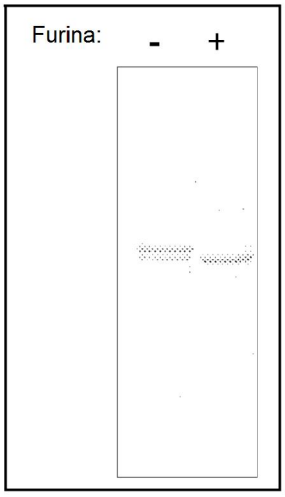


Figura 2. SDS-PAGE de ZC-701 después del tratamiento con PNGasa F. El carril en la derecha se ha tratado adicionalmente con furina.

FIGURA 2

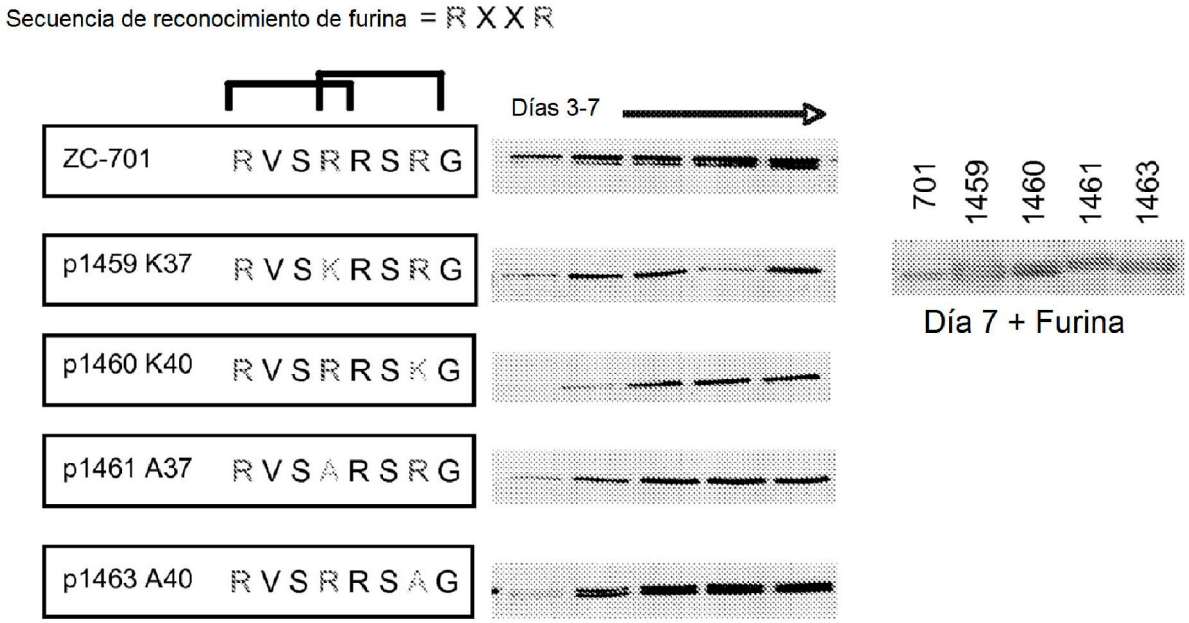
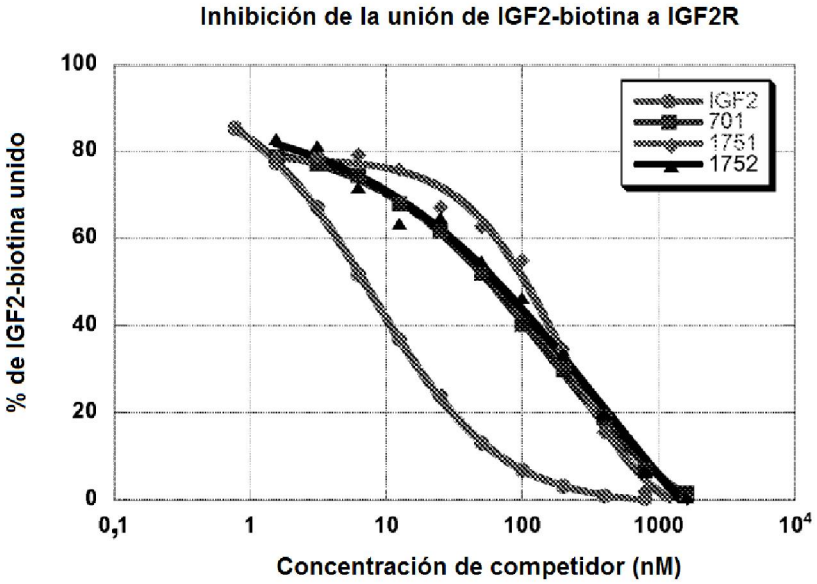
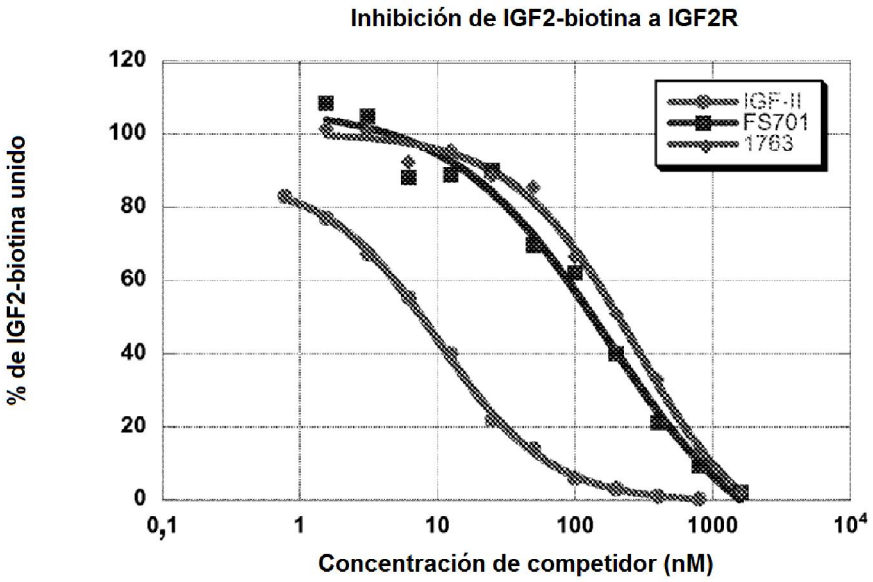


Figura 3. Izquierda. Esquema de mutantes ZC-701 en que el sitio de escisión con furina está modificado. Centro. Análisis de SDS-PAGE de mutantes tratados con PNGasa después de 3-7 días de cultivo celular. Derecha. Análisis de SDS-PAGE de mutantes tratados con PNGasa tratados con furina.



Competidor	IGF2	ZC-701	1751	1752
CI_{50}	6,9	57,7	106,0	65,3

FIGURA 4



Competidor	IGF2	ZC-701	1763
CI_{50}	7,7	135,4	207,9

FIGURA 5

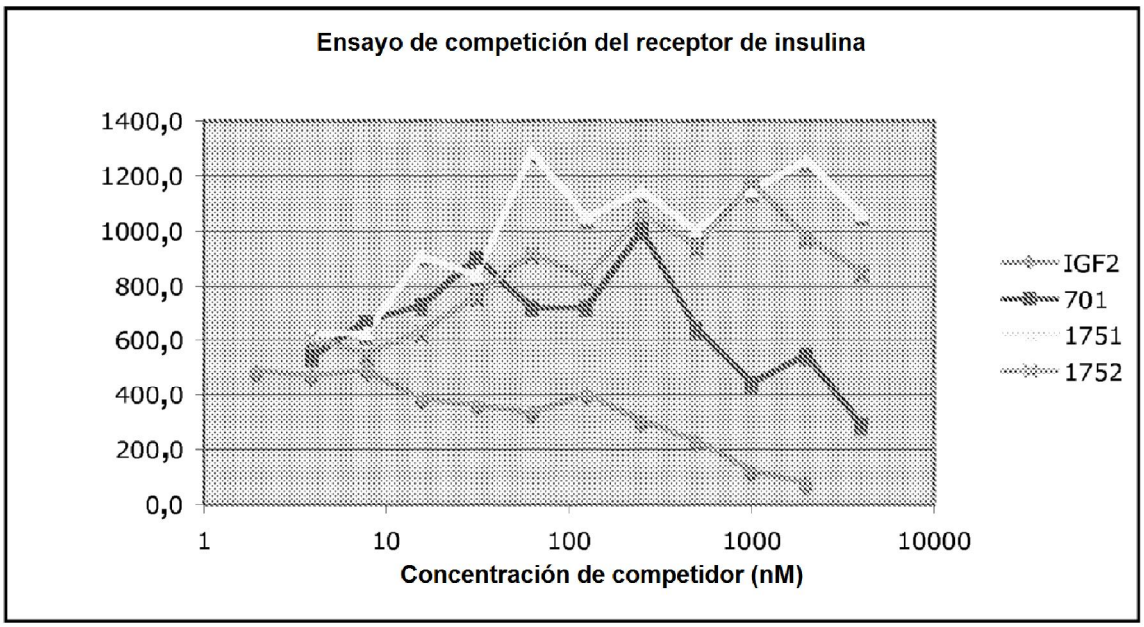

Ensayo de competición del receptor de insulina
1400,0
1200,0
1000,0
800,0
600,0
400,0
200,0
0,0
1
10
100
1000
10000
Concentración de competidor (nM)
IGF2
701
1751
1752

FIGURA 6

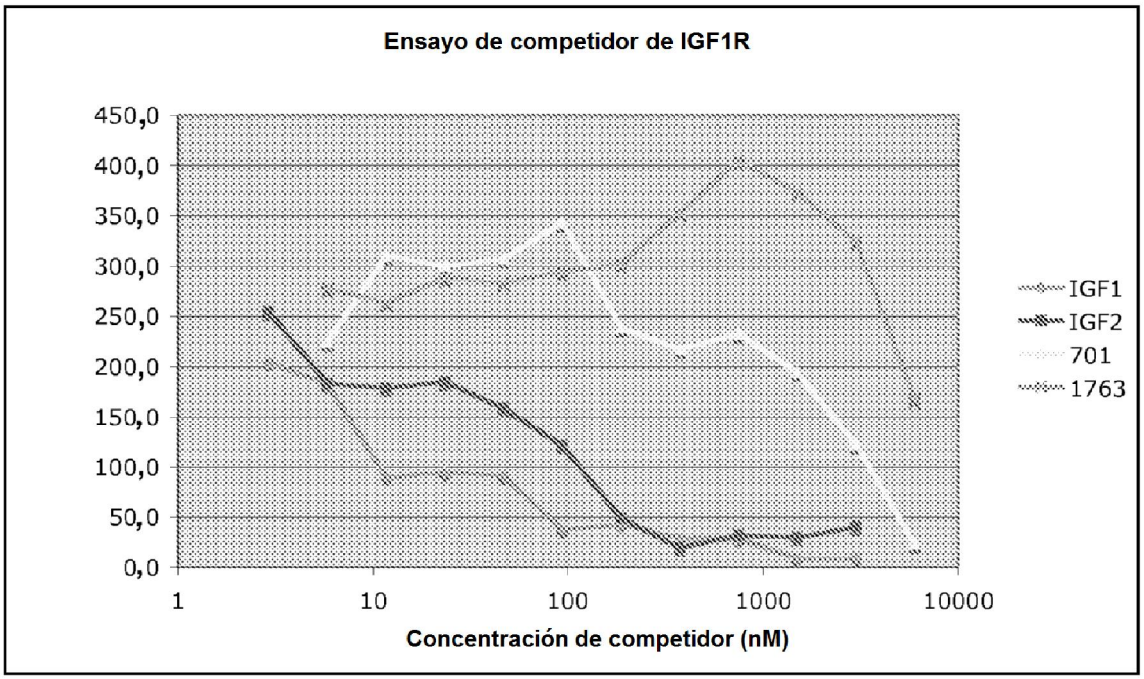

Ensayo de competidor de IGF1R
450,0
400,0
350,0
300,0
250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
1
10
100
1000
10000
Concentración de competidor (nM)
IGF1
IGF2
701
1763

FIGURA 7

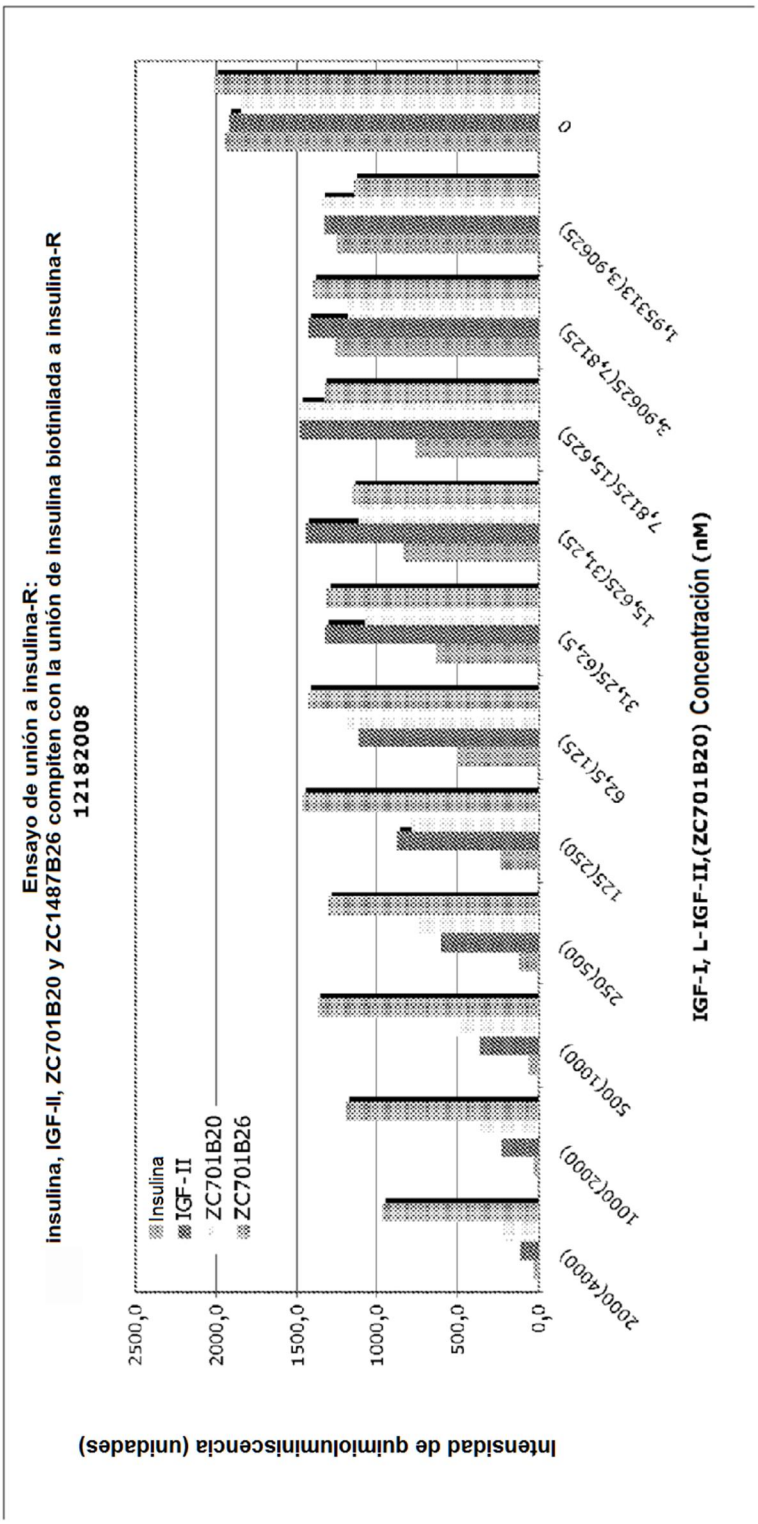
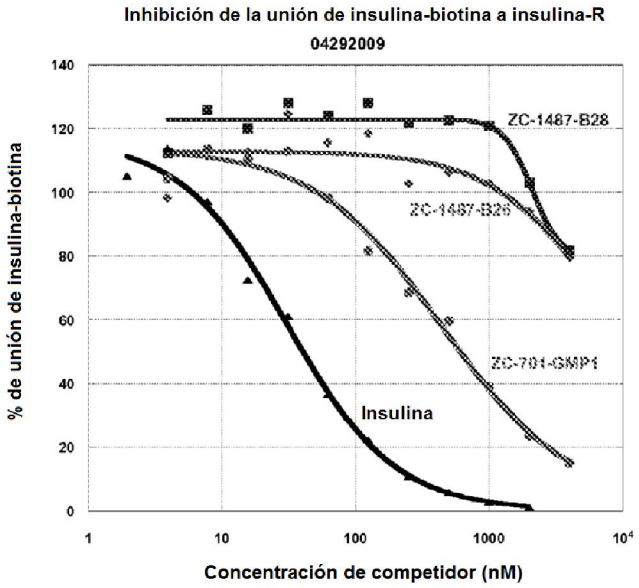

Ensayo de unión a insulina-R:
insulina, IGF-II, ZC701B20 y ZC1487B26 compiten con la unión de insulina biotinilada a insulina-R
12182008
Insulina
IGF-II
ZC701B20
ZC701B26
Intensidad de quimioluminiscencia (unidades)
2500,0
2000,0
1500,0
1000,0
500,0
0,0
2000(4000)
1000(2000)
500(1000)
250(500)
125(250)
62,5(125)
31,25(62,5)
15,625(31,25)
7,8125(15,625)
3,90625(7,8125)
1,953125(3,90625)
0
IGF-I, L-IGF-II,(ZC701B20) Concentración (nM)

FIGURA 8



	Insulina	ZC-1487-B26	ZC-1487-B28	ZC-701-GMP1
CI_{50}	40,5	N/A	N/A	607

FIGURA 9

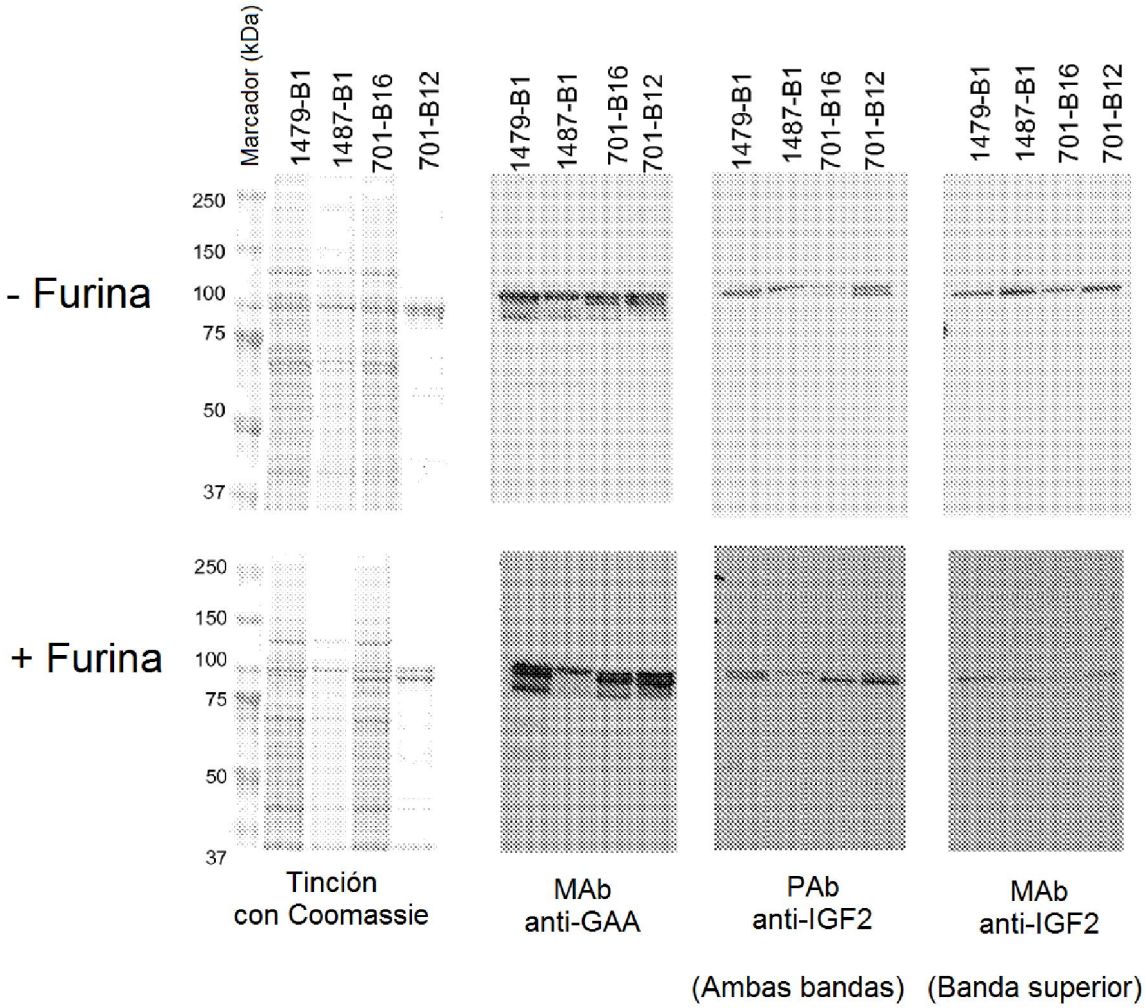
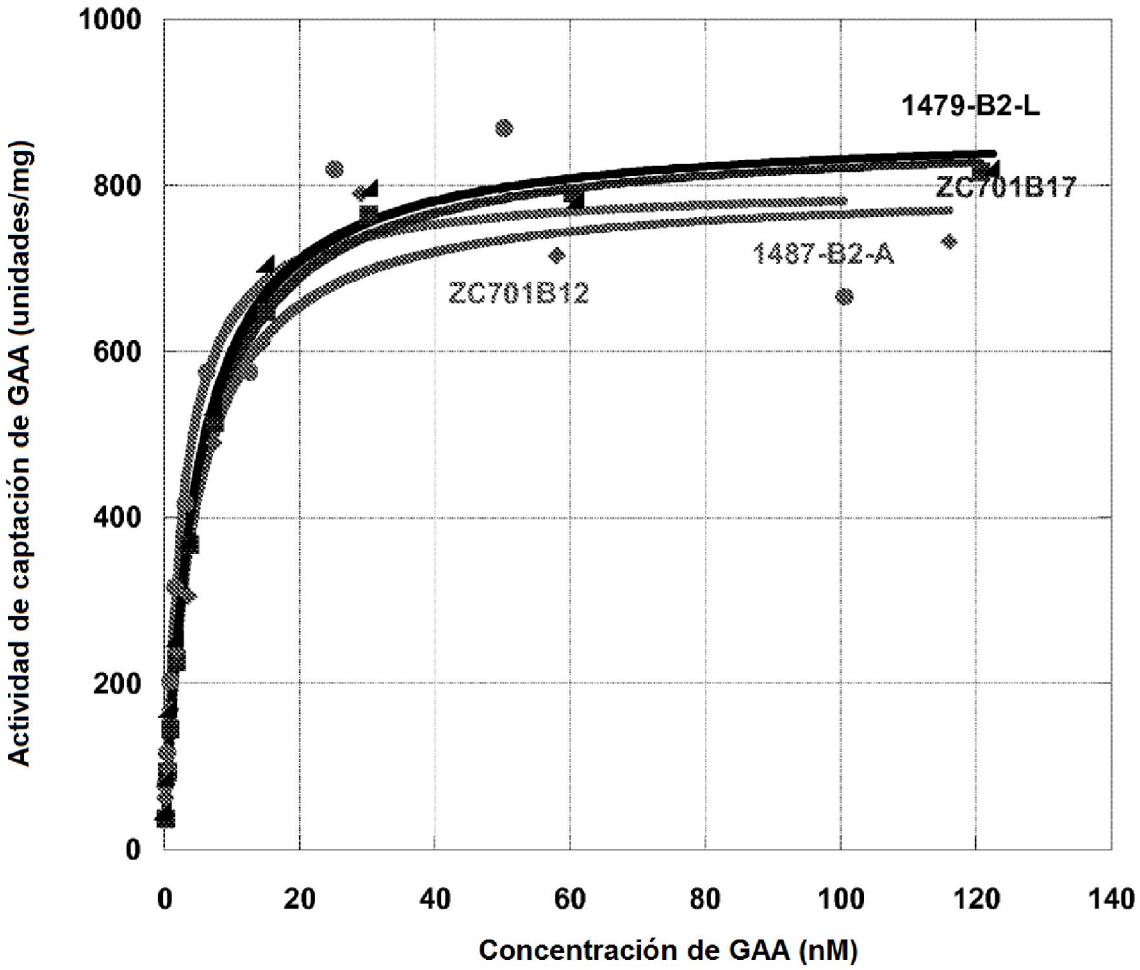

Marcador (kDa)
1479-B1
1487-B1
701-B16
701-B12
- Furina
+ Furina
250
150
100
75
50
37
Tinción con Coomassie
MAb anti-GAA
PAb anti-IGF2
(Ambas bandas)
MAb anti-IGF2
(Banda superior)

FIGURA 10

FIGURA 11


1000
800
600
400
200
0
Actividad de captación de GAA (unidades/mg)
0
20
40
60
80
100
120
140
Concentración de GAA (nM)
1479-B2-L
ZC701B17
1487-B2-A
ZC701B12