

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 824 829**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00

(2006.01)

C12N 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2015** **PCT/US2015/067338**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016** **WO16106303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2015** **E 15830932 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 3236984**

54 Título: **Vectores de virus adenoasociado que codifican G6PC modificada y usos de estos**

30 Prioridad:

23.12.2014 US 201462096400 P

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

13.05.2021

73 Titular/es:

**THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES (100.0%)
National Institutes of Health, Office of
Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard,
Suite 325, MSC 7660
Bethesda, MD 20852-7660, US**

72 Inventor/es:

CHOU, JANICE J.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 824 829 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores de virus adenoasociado que codifican G6PC modificada y usos de estos

5 Referencia cruzada a solicitudes referidas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/096,400, presentada el 23 de diciembre de 2014.

10 Campo

Esta descripción se refiere a vectores de terapia génica que codifican una enzima glucosa-6-fosfatasa- α (G6PC) modificada con actividad aumentada y su uso, tal como para el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno (GSD) y las complicaciones asociadas con GSD.

15 Antecedentes

La enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia o enfermedad de von Gierke, MIM232200) es provocada por una deficiencia de glucosa-6-fosfatasa-a (G6Pasa-a o G6PC), una enzima que se expresa principalmente en el hígado, el riñón y el intestino (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). La G6Pasa-a, codificada por el gen *G6PC*, es una proteína hidrófoba anclada en el retículo endoplásmico (RE) por nueve hélices transmembrana (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). Esta enzima cataliza la hidrólisis de glucosa-6-fosfato (G6P) a glucosa y fosfato en la etapa terminal de la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Los pacientes afectados por GSD-Ia no pueden mantener la homeostasis de la glucosa y presentan hipoglucemia en ayunas, retraso del crecimiento, hepatomegalia, nefromegalia, hiperlipidemia, hiperuricemia y academia láctica (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010).

Actualmente no existe cura para la GSD-Ia. La hipoglucemia puede controlarse mediante terapias dietéticas (Greene y otros, N Engl J Med 294:423-425, 1976; Chen y otros, N Engl J Med 310:171-175, 1984) que permiten a los pacientes alcanzar un crecimiento y desarrollo puberal casi normales. Sin embargo, las complicaciones clínicas a más largo plazo y sus procesos patológicos subyacentes permanecen sin corregir. Uno de los riesgos crónicos más importantes es el adenoma hepatocelular (HCA), que se desarrolla en el 70-80 % de los pacientes con GSD-Ia mayores de 25 años (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010; Labrune y otros, J Pediatr Gastroenterol Nutr 24:276-279, 1997; Rake y otros, Eur J Pediatr 161(Supl 1):S20-S34, 2002). Los HCA en pacientes con GSD-Ia son pequeños, múltiples y no encapsulados, con complicaciones que incluyen compresión local y hemorragia intratumoral. En el 10 % de los pacientes con GSD-Ia, los AHC experimentan una transformación maligna en carcinoma hepatocelular (HCC) (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010; Rake y otros, Eur J Pediatr 161(Supl 1):S20-S34, 2002; Franco y otros, J Inher Metab Dis 28:153-162, 2005).

Aunque se han realizado previamente estudios de terapia génica mediante el uso de virus adenoasociados (AAV) recombinantes que portan G6Pasa-a en modelos animales de GSD-Ia, ninguno ha sido capaz de corregir completamente la deficiencia de G6Pasa-a hepática. Por tanto, existe la necesidad de un vector de terapia génica mejorado para el tratamiento de GSD-Ia y sus complicaciones asociadas.

45 Resumen

La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier objeto que se describa en la presente descripción, pero que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención. En la presente descripción se describe que la enzima G6Pasa-a canina es más activa que la enzima G6Pasa-a humana. Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las dos proteínas reveló que difieren principalmente en 18 residuos. Para identificar mutantes de G6Pasa-a humana con actividad de fosfohidrolasa aumentada, se generaron mutantes que contienen uno o dos aminoácidos correspondientes de la G6Pasa-a canina.

En la presente descripción se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una G6Pasa-a modificada. En algunas modalidades, la G6Pasa-a modificada comprende una sustitución de serina por cisteína en el aminoácido 298 de la G6Pasa-a humana, tal como la G6Pasa-a modificada de la SEQ ID NO: 8. En algunos ejemplos, las moléculas de ácido nucleico comprenden la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.

Se proporcionan además vectores, tales como vectores de virus adenoasociado (AAV), que incluyen las moléculas de ácido nucleico descritas que codifican la G6Pasa-a humana modificada. En algunos ejemplos, los vectores comprenden además un promotor, tal como un promotor/ potenciador de *G6PC* humano (GPE).

Se proporcionan además AAV recombinantes (rAAV) que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican la G6Pasa-a humana modificada. Se proporcionan además células huésped aisladas que comprenden las moléculas

de ácido nucleico o los vectores descritos en la presente descripción. Por ejemplo, las células huésped aisladas pueden ser células adecuadas para la propagación de rAAV.

Las composiciones que comprenden las moléculas de ácido nucleico, los vectores y el rAAV descritos se proporcionan además en la presente descripción.

Se proporciona además un método para tratar a un sujeto diagnosticado con una enfermedad por almacenamiento de glucógeno. En algunas modalidades, el método incluye seleccionar un sujeto con enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia) y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del rAAV, o composiciones que comprenden el rAAV, descritas en la presente descripción.

También se proporciona un método para promover la homeostasis de la glucosa; inhibir la hipoglucemia; inhibir o prevenir el desarrollo de HCA; inhibir o prevenir el desarrollo de HCC; inhibir o prevenir la disfunción o insuficiencia renal; o tratar cualquier otra complicación asociada con GSD-Ia, en un sujeto con una deficiencia de G6Pasa-a al administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del rAAV, o composiciones que comprenden el rAAV, descritas en la presente descripción.

Lo anterior y otros objetivos, características y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un alineamiento de las secuencias de la proteína G6Pasa- α canina (SEQ ID NO: 1) y humana (SEQ ID NO: 2). Los 18 residuos de aminoácidos que difieren entre las secuencias canina y humana se indican con flechas.

La Figura 2 representa la G6Pasa-a humana, que está anclada en la membrana del retículo endoplásmico por 9 hélices, H1 a H9 (Pan y otros, J Biol Chem 273:6144-6148, 1998). Se enumeran las diferencias de aminoácidos entre la G6Pasa-a humana y canina.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la actividad de G6Pasa-a microsomal hepática en ratones GSD-Ia ($G6pc^{-/-}$) de 4 semanas de edad transducidos a las 2 semanas de edad con un vector AAV8-GPE recombinante (10^{13} vg/kg) que expresa G6PC humana (AAV-G6PC), G6PC humana optimizada en codón (co) (AAV-co-G6PC), mutante G6PC-S298C humano (AAV-G6PC-S298C) o mutante G6PC-S298C co-humano (AAV-coG6PC-S298C). La actividad de G6Pasa-a microsomal hepática en ratones de tipo silvestre de 4 semanas de edad promedió $227,5 \pm 17,6$ nmol/min/mg. Los datos se presentan como la media \pm SEM. $**P < 0,005$.

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de G6PC (SEQ ID NO: 11), con la ubicación de cada uno de los 18 mutantes de G6PC humanos indicados. Para la mutagénesis dirigida al sitio, se diseñaron cebadores sentido y antisentido de 20 nucleótidos de manera que el codón a mutar se localizara en el medio de cada cebador.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la actividad de la G6Pasa- α hepática en pacientes ratones $G6pc^{-/-}$ de 24 días transducidos a la edad de 10 días con 5×10^{11} vg/kg de vector AAV-co-G6PC ($n=3$) o vector rAAV8-co-G6PC-S298C ($n=3$). La actividad de G6Pasa hepática de tipo silvestre promedió $174 \pm 18,3$ nmol/min/mg. Los datos representan la media \pm SEM. $**P < 0,005$.

Las figuras 6A-6E muestran datos que demuestran la corrección de la deficiencia de G6Pasa- α hepática mediante rAAV-G6PC. Los ratones L- $G6pc^{-/-}$ se trataron con 1×10^{12} vg/kg de rAAV-G6PC a las 10 semanas y se analizaron a las 18 semanas. La Figura 6A es un gráfico que muestra la actividad de G6Pasa- α hepática en el control ($n=7$), L- $G6pc^{-/-}$ ($n=7$) y ratones AAV ($n=8$). La Figura 6B muestra imágenes de hígados teñidos con H&E representativos de ratones control, L- $G6pc^{-/-}$ y AAV. La Figura 6C es un gráfico que muestra la tolerancia a la glucosa en ayunas (FGT) de ratones control ($n=13$), L- $G6pc^{-/-}$ ($n=6$) y AAV ($n=8$). La Figura 6D es un gráfico que muestra los pesos del hígado de ratones control, L- $G6pc^{-/-}$ y AAV ($n=8$). La Figura 6E es un gráfico que muestra el contenido hepático de glucógeno y triglicérido de ratones control, L- $G6pc^{-/-}$ y AAV ($n=8$). Los datos representan la media \pm SEM. $*P < 0,05$, $**P < 0,005$.

Listado de secuencias

Las secuencias de aminoácidos y nucleicos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran mediante el uso de abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos y código de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 CFR 1.822. Sólo se muestra una cadena de cada secuencia de ácidos nucleicos, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena presentada. El listado de secuencias se envía como un archivo de texto ASCII, creado el 22 de diciembre de 2015, 52,8 KB. En el listado de secuencias adjunto:

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la proteína G6Pasa- α canina.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína G6Pasa- α humana.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de pTR-GPE-G6PC humana que tiene las siguientes características:

ITR - nucleótidos 17-163
 Promotor/potenciador de G6PC - nucleótidos 182-3045
 Relleno - nucleótidos 3051-3184
 Intrón - nucleótidos 3185-3321
 Relleno - nucleótidos 3322-3367
 Secuencia codificante de G6PC - nucleótidos 3368-4441
 ITR - nucleótidos 4674-4819.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos de pTR-GPE-G6PC-S298C humana que tiene las siguientes características:

ITR - nucleótidos 17-163
 Promotor/potenciador de G6PC - nucleótidos 182-3045
 Relleno - nucleótidos 3051-3184
 Intrón - nucleótidos 3185-3321
 Relleno - nucleótidos 3322-3367
 Secuencia codificante de G6PC - nucleótidos 3368-4441
 Mutación S298C - nucleótidos 4259-4261 (TCT a TGC)
 ITR - nucleótidos 4674-4819.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos del (co) G6PC-S298C optimizada en codón (co) con pTR-GPE que tiene las siguientes características:

ITR - nucleótidos 17-163
 Promotor/potenciador de G6PC - nucleótidos 182-3045
 Relleno - nucleótidos 3051-3184
 Intrón - nucleótidos 3185-3321
 Relleno - nucleótidos 3322-3367
 Secuencia codificante de G6PC optimizada en codón - nucleótidos 3368-4441
 Mutación S298C - nucleótidos 4259-4261 (AGC a TGC)
 ITR - nucleótidos 4674-4819.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de nucleótidos de una G6PC humana modificada que codifica la G6Pasa- α S298C.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de nucleótidos de una G6PC humana modificada optimizada en codón que codifica la G6Pasa- α S298C.

SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la G6Pasa- α S298C humana modificada.

SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de la G6Pasa- α S298C/A301V humana modificada.

SEQ ID NO: 10 es una secuencia de consenso de aminoácidos basada en el alineamiento de la G6Pasa- α humana y canina.

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos de la región codificante de G6PC humana.

Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones. Cualquier objeto que se describa en la presente descripción, pero que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención.

I. Abreviaturas

AAV	virus adenoasociado
CBA	β -actina de pollo
CMV	citomegalovirus
co	optimizada en codón
FGT	tolerancia a la glucosa en ayunas
G6P	glucosa-6-fosfato
G6Pasa-a	glucosa-6-fosfatasa-a
G6PC	glucosa-6-fosfatasa, subunidad catalítica
G6PT	transportador de glucosa-6-fosfato
GPE	Promotor/potenciador de G6PC
GSD	enfermedad por almacenamiento de glucógeno
HCA	adenoma hepatocelular
HCC	carcinoma hepatocelular
ITR	repetición terminal invertida
ORF	marco de lectura abierto
rAAV	AAV recombinante
SEM	error estándar de la media
vg	genomas virales
vp	partículas virales
WT	de tipo silvestre

II. Términos y métodos

A menos que se indique de cualquier otra forma, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew y otros (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Para facilitar la revisión de las diversas modalidades de la descripción, se proporcionan las explicaciones siguientes de términos específicos:

Virus adenoasociado (AAV): Un virus pequeño, de replicación defectuosa y sin envoltura que infecta a los seres humanos y algunas otras especies de primates. No se conoce que el VAA cause una enfermedad y provoque una respuesta inmunitaria muy leve. Los vectores de terapia génica que utilizan AAV pueden infectar tanto células en división como quiescentes y pueden persistir en un estado extracromosómico sin integrarse en el genoma de la célula huésped. Estas características hacen que el AAV sea un vector viral atractivo para la terapia génica. Actualmente existen 11 serotipos reconocidos de AAV (AAV1-11).

Administración/Administrar: Proporcionar o dar a un sujeto un agente, tal como un agente terapéutico (por ejemplo, un AAV recombinante), por cualquier ruta eficaz. Las vías de administración ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, vías de inyección (tales como vías subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal e intravenosa), oral, intraductal, sublingual, rectal, transdérmica, intranasal, vaginal y por inhalación.

Optimizado en codón: Un ácido nucleico "optimizado en codón" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que se ha alterado de manera que los codones son óptimos para la expresión en un sistema particular (tal como una especie particular o grupo de especies). Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos puede optimizarse para la expresión en células de mamífero o en una especie de mamífero particular (tales como células humanas). La optimización del codón no altera la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

Potenciador: Secuencia de ácidos nucleicos que aumenta la velocidad de transcripción al aumentar la actividad de un promotor.

G6PC: Un gen ubicado en el cromosoma humano 17q21 que codifica la glucosa-6-fosfatasa- α (G6Pasa- α). La G6Pasa- α es una proteína hidrófoba de 357 aminoácidos que tiene 9 hélices que la anclan en el retículo endoplásmico (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). La G6Pasa- α se representa en la Figura 2. La proteína G6Pasa- α cataliza la hidrólisis de la glucosa 6-fosfato a glucosa y fosfato en la etapa terminal de la gluconeogénesis y glucogenólisis y es una enzima clave en la homeostasis de la glucosa. Las mutaciones deletéreas en el gen de G6PC causan la enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia), que es un trastorno metabólico caracterizado por hipoglucemia severa en ayunas asociada con la acumulación de glucógeno y grasa en el hígado y los riñones.

Enfermedad por almacenamiento de glucógeno (GSD): Un grupo de enfermedades que resultan de defectos en el procesamiento de la síntesis o degradación del glucógeno en los músculos, el hígado y otros tejidos. La GSD puede ser genética o adquirida. La GSD genética es causada por cualquier error innato del metabolismo implicado en estos procesos. Actualmente existen 11 enfermedades por almacenamiento de glucógeno reconocidas (GSD tipo I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, XI, XII y XIII). GSD-I consiste en dos trastornos autosómicos recesivos, GSD-Ia y GSD-Ib (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). GSD-Ia resulta de una deficiencia de la glucosa-6-fosfatasa- α . Las deficiencias en el transportador de glucosa-6-fosfato (G6PT) son responsables de GSD-Ib.

Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia): También conocida como enfermedad de von Gierke, GSD-Ia es la enfermedad por almacenamiento de glucógeno más común, que tiene una incidencia de aproximadamente 1 de cada 100 000 nacidos vivos. GSD-Ia es una enfermedad genética que resulta de la deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfatasa- α (G6Pasa- α). La deficiencia de G6Pasa- α afecta la capacidad del hígado de producir glucosa libre a partir del glucógeno y de la gluconeogénesis. Los pacientes afectados por GSD-Ia no pueden mantener la homeostasis de la glucosa y presentan hipoglucemia en ayunas, retraso del crecimiento, hepatomegalia, nefromegalia, hiperlipidemia, hiperuricemia y acidemia láctica (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). Actualmente no existe cura para la GSD-Ia.

Intrón: Un tramo de ADN dentro de un gen que no contiene información codificante para una proteína. Los intrones se eliminan antes de la traducción de un ARN mensajero.

Repetición terminal invertida (ITR): Secuencias simétricas de ácidos nucleicos en el genoma de los virus adenoasociados necesarias para una replicación eficiente. Las secuencias de ITR se ubican en cada extremo del genoma de ADN de AAV. Los ITR sirven como los orígenes de replicación para la síntesis de ADN viral y son componentes cis esenciales para generar vectores de integración de AAV.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, una proteína, un virus o una célula) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos en la célula o tejido del organismo, o del propio organismo, en el que el componente se produce de forma natural, tales como otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y células. Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que se han "aislado" incluyen las purificadas mediante métodos de purificación estándar. El término también abarca moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como también moléculas de ácido nucleico y proteínas sintetizadas químicamente.

Modificado: En el contexto de la presente descripción, una G6PC o G6Pasa-a "modificada" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos de G6PC o una secuencia de aminoácidos de G6Pasa que comprende al menos una sustitución, delección o inserción de un ácido nucleico o aminoácido en comparación con la secuencia de tipo silvestre (tal como se compara con la secuencia codificante de G6PC humana expuesta como los nucleótidos 3368-4441 de la SEQ ID NO: 3, o en relación con la secuencia de aminoácidos de G6Pasa-a humana expuesta como la SEQ ID NO: 2).

Unido operativamente: Una primera secuencia de ácidos nucleicos está unida operativamente a una segunda secuencia de ácidos nucleicos cuando la primera secuencia de ácidos nucleicos se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta la transcripción o la expresión de la secuencia codificante. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

Portador farmacéuticamente aceptable: Los portadores (vehículos) farmacéuticamente aceptables útiles en esta descripción son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ta Edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para el suministro farmacéutico de uno o más compuestos, moléculas o agentes terapéuticos.

En general, la naturaleza del portador dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales comprenden habitualmente fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como un vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, en forma de polvo, píldora, tableta o cápsula), los portadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

Prevenir, tratar o mejorar una enfermedad: "Prevenir" una enfermedad (tal como GSD-Ia) se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad. "Tratar" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de que ha comenzado a desarrollarse. "Mejorar" se refiere a la reducción del número o la gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad.

Promotor: Una región de ADN que dirige/inicia la transcripción de un ácido nucleico (*por ejemplo*, un gen). Un promotor incluye las secuencias de ácidos nucleicos necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción. Típicamente, los promotores se ubican cerca de los genes que transcriben. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales que pueden ubicarse hasta varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción.

Purificado: El término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, está destinado como un término relativo. Así, por ejemplo, un péptido, proteína, virus u otro compuesto activo purificado es uno que está aislado en su totalidad o en parte de proteínas y otros contaminantes asociados naturalmente. En ciertas modalidades, la expresión "sustancialmente purificado" se refiere a un péptido, proteína, virus u otro compuesto activo que se ha aislado de una célula, medio de cultivo celular u otra preparación cruda y se ha sometido a fraccionamiento para eliminar varios componentes de la preparación inicial, tales como proteínas, restos celulares y otros componentes.

Recombinante: Una molécula de ácido nucleico recombinante es una que tiene una secuencia que no es de origen natural o tiene una secuencia que se produce mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de cualquier otra forma. Esta combinación artificial puede lograrse mediante síntesis química o mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácido nucleico, tal como mediante técnicas de ingeniería genética.

De manera similar, un virus recombinante es una secuencia que comprende un virus (tal como una secuencia genómica) que no es de origen natural o se produce mediante una combinación artificial de al menos dos secuencias de diferente origen. El término "recombinante" también incluye ácidos nucleicos, proteínas y virus que se han alterado únicamente mediante la adición, sustitución o delección de una porción de una molécula de ácido nucleico, proteína o virus natural. Como se usa en la presente descripción, "AAV recombinante" se refiere a una partícula de AAV en la que se ha empaquetado una molécula de ácido nucleico recombinante (tal como una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica G6Pasa-a).

Identidad de secuencia: La identidad o similitud entre dos o más secuencias de ácidos nucleicos, o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia puede medirse en términos de porcentaje de identidad; cuanto mayor es el porcentaje, más idénticas son las secuencias. La similitud de secuencia puede medirse en términos de porcentaje de similitud (que tiene en cuenta las sustituciones conservadoras de aminoácidos); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las secuencias. Los homólogos u ortólogos de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos poseen un grado relativamente alto de identidad/similitud de secuencia cuando se alinean mediante el uso de métodos estándar. Esta homología es más significativa cuando las proteínas ortólogas o los ADNc se derivan de especies que están más estrechamente relacionadas (tales como secuencias humanas y de ratón), en comparación con especies más distantes (tales como secuencias de *C. elegans* y humanas).

Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineamiento se describen en: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988;

Higgins & Sharp, *Gene*, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, *CABIOS* 5:151-3, 1989; Corpet y otros, *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988; Huang y otros *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992; y Pearson y otros, *Meth. Mol. Bio.* 24:307-31, 1994. Altschul y otros, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10, 1990, presenta una consideración detallada de los métodos de alineamiento de secuencias y los cálculos de homología.

La herramienta de búsqueda de alineamiento local básica de NCBI (BLAST) (Altschul y otros, *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990) está disponible de varias fuentes, incluido el Centro Nacional de Información Biológica (NCBI) y en Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Puede encontrarse información adicional en el sitio web de NCBI.

Serotipo: Un grupo de microorganismos estrechamente relacionados (tal como virus) que se distinguen por un conjunto característico de antígenos.

Secuencia de relleno: Se refiere a una secuencia de nucleótidos contenida dentro de una molécula de ácido nucleico más grande (tal como un vector) que se usa típicamente para crear el espacio deseado entre dos elementos de ácido nucleico (tal como entre un promotor y una secuencia codificante), o para extender una molécula de ácido nucleico de manera que tenga la longitud deseada. Las secuencias de relleno no contienen información codificante de proteínas y pueden ser de origen sintético/desconocido y/o no estar relacionadas con otras secuencias de ácidos nucleicos dentro de una molécula de ácido nucleico más grande.

Sujeto: Organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye mamíferos humanos y no humanos.

Sintético: Producido por medios artificiales en un laboratorio, por ejemplo, un ácido nucleico sintético puede sintetizarse químicamente en un laboratorio.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Una cantidad de un agente terapéutico o farmacéutico especificado (por ejemplo, un AAV recombinante) suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto, o en una célula, que se trata con el agente. La cantidad eficaz del agente dependerá de varios factores, que incluyen, pero sin limitarse a, el sujeto o las células que se tratan y la forma de administración de la composición terapéutica.

Vector: Un vector es una molécula de ácido nucleico que permite la inserción de ácido nucleico extraño sin alterar la capacidad del vector de replicarse y/o integrarse en una célula huésped. Un vector puede incluir secuencias de ácidos nucleicos que le permitan replicarse en una célula huésped, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos. Un vector de expresión es un vector que contiene las secuencias reguladoras necesarias para permitir la transcripción y traducción del gen o genes insertados. En algunas modalidades de la presente invención, el vector es un vector AAV.

A menos que se explique de cualquier otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra forma. "Que comprende A o B" significa que incluye A, o B, o A y B. Debe entenderse además que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o las pruebas de la presente descripción, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente descripción están en su totalidad. En caso de conflicto, la presente descripción, incluyendo las explicaciones de los términos, tendrá el control. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

III. Introducción

La enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia) es un trastorno hereditario del metabolismo asociado con hipoglucemia potencialmente mortal, neoplasias malignas hepáticas e insuficiencia renal causada por la deficiencia de glucosa-6-fosfatasa-a (G6Pasa-a o G6PC), y que afecta principalmente al hígado y al riñón. La terapia actual no previene las complicaciones a largo plazo en muchos pacientes, que incluyen retraso del crecimiento, gota, hipertensión pulmonar, disfunción renal con riesgo de insuficiencia renal, osteoporosis y adenomas hepatocelulares (HCA) que pueden sufrir una transformación maligna en carcinoma hepatocelular (Chou y otros, *Curr Mol Med* 2:121-143, 2002; Chou y otros, *Nat Rev Endocrinol* 6:676-688, 2010). Por tanto, el desarrollo de nuevas terapias, tales como las terapias génicas, se justifica como un tratamiento potencialmente curativo para GSD-Ia (Chou y otros, *Expert Opin Biol Ther* 11:1011-1024, 2011).

Se han descrito vectores de AAV recombinantes (rAAV) que codifican G6Pasa-a funcional (revisados en Chou y Mansfield, *Expert Opin Biol Ther* 11:1011-1024, 2011). Estudios previos que usan el modelo de ratón de GSD-Ia han demostrado que AAV recombinante que expresa G6Pasa-a dirigido por el promotor de CBA/potenciador de CMV (Ghosh y otros, *Gene Ther* 13:321-329, 2006), el promotor *G6PC* canino Koeberl y otros, *Gene Ther* 13:1281-1289, 2006), o el promotor *G6PC* humano en los nucleótidos -298 a +128 de la región flanqueante *G6PC* 5' (Koeberl y otros, *Mol Ther* 16:665-672, 2008) suministra el transgén de G6Pasa-a al hígado y logra una corrección prolongada de este trastorno. Sin embargo, aunque estos estudios se han mostrado prometedores, ninguno ha sido capaz de corregir por completo la deficiencia de G6Pasa-a hepática.

Un ejemplo de un estudio anterior es descrito por Koeberl y otros (Mol Ther 16:665-672, 2008) que desarrolló un vector de rAAV bicatenario (rAAV-G6Pasa) que fue capaz de tratar ratones GSD-Ia y perros GSD-Ia. Adicionalmente, Yiu y otros (Mol Ther 18:1076-1084, 2010) y Lee y otros (Hepatology 56:1719-1729, 2012) describen el desarrollo de un vector de rAAV monocatenario de eficacia similar, rAAV-GPE-G6PC. Los dos vectores difieren en varios aspectos. En primer lugar, rAAV-GPE-G6PC es un vector de rAAV monocatenario mientras que rAAV-G6Pasa es un vector de rAAV bicatenario. El vector de rAAV bicatenario se desarrolló para eludir la etapa que limita la velocidad en el ciclo de vida del AAV mediante la conversión del genoma de ADN monocatenario en el genoma de ADN bicatenario (Chou y otros, Expert Opin Biol Ther 11:1011-1024, 2011). En segundo lugar, la expresión de G6Pasa-a en rAAV-G6Pasa está dirigida por el promotor/potenciador G6PC humano en los nucleótidos -382 a -1 (Koeberl y otros, Mol Ther 16:665-672, 2008). La expresión de G6Pasa-a en rAAV-GPE-G6PC está dirigida por el promotor/potenciador G6PC humano en los nucleótidos -2864 a -1 (GPE) (Yiu y otros, Mol Ther 18:1076-1084, 2010; Lee y otros, Hepatology 56:1719-1729, 2012). En tercer lugar, el vector rAAV-GPE-G6PC contiene un intrón que está ausente del vector rAAV-G6Pasa. Ambos vectores suministraron eficientemente el transgén de G6Pasa-a al hígado y corrigieron GSD-Ia murino (Koeberl y otros, Mol Ther 16:665-672, 2008; Yiu y otros, Mol Ther 18:1076-1084, 2010; Lee y otros, Hepatology 56:1719-1729, 2012).

Se realizó un estudio comparativo para determinar qué vector, rAAV-G6Pasa o rAAV-GPE-G6PC, era más eficaz en el tratamiento de GSD-Ia. Los resultados demostraron de manera inequívoca que el vector rAAV-GPE-G6PC era más eficaz que el vector rAAV-G6Pasa en la corrección de GSD-Ia murina. Se determinó que se requirieron los elementos potenciadores corriente arriba del promotor mínimo G6PC para una expresión transgénica hepática eficiente (Lee y otros, Mol Genet Metab 10:275-280, 2013). Se llevaron a cabo estudios adicionales para determinar si el intrón contenido en el vector rAAV-GPE-G6PC desempeñaba un papel en la dirección de la expresión de G6Pasa-a hepática. Se generó un vector de rAAV bicatenario (denominado rAAV-miGPE-G6PC) que expresaba G6Pasa-a humana dirigida por el promotor mínimo G6PC en los nucleótidos -382 a -1, y que contenía el intrón presente en el vector rAAV-GPE-G6PC. Los resultados demostraron que el vector rAAV-GPE-G6PC fue más eficiente que el vector rAAV-miGPE-G6PC en el tratamiento de la GSD-Ia murina, apoyando la conclusión de que se requieren los elementos potenciadores corriente arriba del promotor mínimo G6PC para una expresión transgénica hepática eficiente (Lee y otros, Mol Genet Metab 10:275-280, 2013).

Los vectores de AAV recombinantes que comprenden un elemento promotor/potenciador de G6PC (GPE) se describen con más detalle en la publicación PCT núm. WO 2015/081101. Los vectores recombinantes incluyen un GPE, un intrón sintético y la región codificante de G6PC. La región codificante de G6PC está opcionalmente optimizada en codón para la expresión en células humanas. Los vectores recombinantes incluyen además la secuencia de ácidos nucleicos de relleno situada entre el promotor/potenciador de G6PC y el intrón, así como también entre el intrón y la secuencia codificante de G6PC; y secuencias de repetición terminal invertida (ITR) 5' y 3'.

Se describe en la publicación PCT núm. WO 2015/081101 que un AAV recombinante que expresa G6Pasa-a con el promotor/potenciador de G6PC (rAAV-GPE-G6PC) es significativamente más eficiente para dirigir *in vivo* la expresión transgénica hepática que otro AAV recombinante que expresa G6Pasa-a que tiene un promotor/potenciador alternativo (*es decir* el promotor de β -actina de pollo/potenciador de CMV). Durante un período de estudio de 24 semanas, los ratones con deficiencia de G6PC (un modelo para GSD-Ia) tratados con rAAV-GPE-G6PC exhibieron una normalización completa de la deficiencia de G6PC hepática, como lo demuestran los niveles normales de glucosa en sangre, metabolitos sanguíneos, glucógeno hepático y grasa hepática (ver además Yiu y otros, Mol Ther 18:1076-1084, 2010). Además, un estudio a más largo plazo de ratones G6pc^{-/-} tratados con rAAV-GPE-G6PC demostraron que la terapia génica mediada por rAAV-GPE-G6PC fue eficaz durante al menos 70-90 semanas en ratones que expresaban más del 3 % de G6Pasa- α hepática. En particular, los ratones tratados con rAAV-GPE-G6PC exhibieron un almacenamiento de grasa hepática normal, perfiles normales de metabolito y de tolerancia a la glucosa en sangre, niveles reducidos de insulina en sangre en ayunas y no presentaron evidencia de anomalías hepáticas, tal como adenoma hepatocelular (ver además Lee y otros, Hepatology 56:1719-1729, 2012).

En la publicación PCT núm. WO 2015/081101 se describe además el hallazgo de que los elementos potenciadores corriente arriba del promotor de G6PC son críticos para la expresión óptima de G6PC en un modelo animal de GSD-Ia. Específicamente, se demostró que el tratamiento con rAAV-GPE-G6PC, que comprende el promotor/potenciador de G6PC en los nucleótidos -2684 a -1 (en relación con el sitio de inicio de G6PC) produce niveles significativamente más altos de expresión de G6Pasa-a hepática, logró una mayor reducción en la acumulación de glucógeno hepático, y condujo a una mejor tolerancia del ayuno en un modelo de ratón de GSD-Ia, en comparación con un AAV recombinante que expresa G6Pasa-a que contiene solo un promotor/potenciador de G6PC mínimo de 383 pb (ver además Lee y otros, Mol Genet Metab. 110(3):275-280, 2013).

En la publicación PCT núm. WO 2015/081101 se describe además el hallazgo de que las secuencias de nucleótidos de relleno presentes entre el promotor/potenciador de G6PC y el intrón, así como también entre el intrón y la secuencia codificante de G6PC, son importantes para la transducción hepática y la expresión de G6Pasa-a. En particular, el AAV recombinante producido a partir del plásmido UF11-K29-G6PC, que carece de las secuencias de relleno, exhibió una actividad de G6Pasa de 7,3 nmol/min/mg. En comparación, el AAV recombinante producido a partir del plásmido UF11-GPE-G6PC, exhibió una actividad G6Pasa de 33,0 nmol/min/mg.

Además, los datos descritos en la publicación PCT núm. WO 2015/081101 demostraron que la optimización en codón de la secuencia codificante de G6PC aumentó la eficiencia de traducción aproximadamente de 1,5 a 2,5 veces, lo que dio como resultado una expresión de G6Pasa-a significativamente mayor en el hígado después de la administración de rAAV-co-GPE-G6PC (que contiene una secuencia de ácidos nucleicos de G6PC optimizada en codón), en comparación con la administración de rAAV-GPE-G6PC, que codifica G6PC de tipo silvestre.

Por lo tanto, el VAA recombinante que comprende el promotor/potenciador de G6PC en los nucleótidos -2684 a -1, un intrón sintético, las secuencias de relleno que flanquean el intrón y la región codificante de G6PC (de tipo silvestre u optimizada en codón) son elementos importantes para la expresión eficiente del transgén hepático y el tratamiento de GSD-la *in vivo*.

La presente descripción muestra por primera vez que la G6PC humana puede modificarse en posiciones específicas para mejorar la actividad de fosfohidrolasa de la enzima G6Pasa-a codificada. Las secuencias codificantes de G6Pasa-a modificadas pueden incorporarse en vectores de terapia génica de rAAV para mejorar la eficacia en el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno.

IV. Resumen de varias modalidades

En la presente descripción se describe que la enzima G6Pasa-a canina es más activa que la enzima G6Pasa-a humana. Un alineamiento de aminoácidos de las dos proteínas reveló que difieren en secuencia en 18 residuos. Para identificar mutantes de G6Pasa-a humana con actividad de fosfohidrolasa aumentada, se generaron mutantes que contenían al menos un aminoácido correspondiente de la G6Pasa-a canina.

En la presente descripción se proporcionan moléculas de ácido nucleico recombinantes, vectores de AAV y AAV recombinantes que pueden usarse en aplicaciones de terapia génica para el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno, específicamente GSD-la.

En algunas modalidades, se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una G6Pasa-a modificada, en donde la G6Pasa-a modificada comprende una sustitución de serina por cisteína en el aminoácido 298 de la G6Pasa-a humana (la secuencia de aminoácidos de la G6Pasa-a humana de tipo silvestre se expone en la presente descripción como la SEQ ID NO: 2). La G6Pasa-a modificada puede incluir modificaciones en residuos adicionales siempre que la proteína conserve la actividad enzimática. Por ejemplo, la G6Pasa-a modificada puede incluir sustituciones en otros residuos que difieren entre las secuencias de G6Pasa-a canina y humana, tales residuos incluyen las posiciones 3, 54, 139, 196, 199, 242, 247, 292, 301, 318, 324, 332, 347, 349, 350 y/o 353 de la G6Pasa- α humana (expuesta como la SEQ ID NO: 2). La Figura 1 muestra un alineamiento de las secuencias de la proteína G6Pasa- α humana y canina, y la Tabla 2 proporciona un resumen de las diferencias de aminoácidos entre la G6Pasa- α humana y canina. La presente descripción contempla sustituciones de nucleótidos que alteran la secuencia de aminoácidos en uno o más de los residuos enumerados anteriormente y en la Tabla 2.

En algunos ejemplos, la molécula de ácido nucleico codifica una G6Pasa-a modificada que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, y que tiene una sustitución de serina por cisteína en el aminoácido 298. En ejemplos particulares, la secuencia de aminoácidos de la G6Pasa-a modificada comprende o consiste en la SEQ ID NO: 8 (G6Pasa- α S298C humana). En otros ejemplos particulares, la secuencia de aminoácidos de la G6Pasa-a modificada comprende o consiste en la SEQ ID NO: 9 (G6Pasa- α S298C/A301V humana). En ejemplos no limitantes, la molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6 (G6PC humana modificada que codifica la G6Pasa- α S298C) o la SEQ ID NO: 7 (G6PC humana modificada optimizada en codón que codifica la G6Pasa- α S298C).

En la presente descripción se proporcionan además vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican la G6Pasa-a modificada. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico que codifica la G6Pasa-a modificada está unida operativamente a un promotor, tal como un promotor de G6PC. En algunos ejemplos, el promotor de G6PC es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los nucleótidos 182-3045 de la SEQ ID NO: 4 (promotor/potenciador de G6PC humano) o al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los nucleótidos 182-3045 de la SEQ ID NO: 5 (promotor/potenciador humano de G6PC optimizada en codón). En ejemplos no limitantes, el promotor de G6PC comprende los nucleótidos 182-3045 de la SEQ ID NO: 4 o los nucleótidos 182-3045 de la SEQ ID NO: 5.

En algunos ejemplos, el vector comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los nucleótidos 182-4441 de la SEQ ID NO: 4 o los nucleótidos 182-4441 de la SEQ ID NO: 5. En ejemplos específicos no limitantes, el vector comprende los nucleótidos 182-4441 de la SEQ ID NO: 4 o los nucleótidos 182-4441 de la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, el vector es un vector de AAV. El serotipo de AAV puede ser cualquier serotipo adecuado para el suministro de transgenes a un sujeto. En algunos ejemplos, el vector de AAV es un AAV de serotipo 8 (AAV8). En otros ejemplos, el vector de AAV es un vector de serotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 o 12 (es decir AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, AAV10, AAV11 o AAV12). Aún en otros ejemplos, el vector de AAV es un híbrido de dos o más serotipos de AAV (tales como, pero no se limitan a, AAV2/1, AAV2/7, AAV2/8 o AAV2/9). La selección del serotipo de AAV dependerá en parte del(de los) tipo(s) celular(es) a los que se dirige la terapia génica. Para el tratamiento de GSD-Ia, el hígado y el riñón son los órganos diana relevantes.

Cuando se usa un vector de AAV, el vector puede incluir repeticiones terminales invertidas (ITR). En algunas modalidades, el vector de AAV comprende una secuencia de nucleótidos al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a los nucleótidos 17-4819 de la SEQ ID NO: 4 o los nucleótidos 17-4819 de la SEQ ID NO: 5. En algunos ejemplos, el vector de AAV comprende los nucleótidos 17-4819 de la SEQ ID NO: 4 o los nucleótidos 17-4819 de la SEQ ID NO: 5.

En la presente descripción se proporcionan además células huésped aisladas que comprenden las moléculas de ácido nucleico o los vectores descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la célula huésped aislada puede ser una célula (o línea celular) apropiada para la producción de AAV recombinante (rAAV). En algunos ejemplos, la célula huésped es una célula de mamífero, tal como una célula HEK-293, BHK, Vero, RD, HT-1080, A549, Cos-7, ARPE-19 o MRC-5.

Se proporcionan además un rAAV que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en la presente descripción. En algunas modalidades, el rAAV es rAAV8 y/o rAAV2. Sin embargo, el serotipo de AAV puede ser cualquier otro serotipo de AAV adecuado, tal como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, AAV10, AAV11 o AAV12, o un híbrido de dos o más serotipos de AAV (tal como, pero no se limita a AAV2/1, AAV2/7, AAV2/8 o AAV2/9). Las composiciones que comprenden un rAAV descrito en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable también se proporcionan en la presente descripción. En algunas modalidades, las composiciones se formulan para la administración intravenosa o intramuscular. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración de rAAV pueden encontrarse, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2012/0219528.

Se proporcionan además métodos para tratar a un sujeto diagnosticado con una enfermedad por almacenamiento de glucógeno, que comprenden seleccionar un sujeto con GSD-Ia y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un rAAV (o una composición que comprende un rAAV) descrita en la presente descripción.

También se proporcionan en la presente descripción los métodos para promover la homeostasis de la glucosa; inhibir la hipoglucemia; inhibir o prevenir el desarrollo de adenoma hepatocelular (HCA); inhibir o prevenir el desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC); inhibir o prevenir la disfunción o insuficiencia renal; inhibir o prevenir el retraso del crecimiento; inhibir o prevenir la hepatomegalia; inhibir o prevenir la nefromegalia; inhibir o prevenir la hiperlipidemia; inhibir o prevenir la hipertensión pulmonar; o tratar, prevenir o inhibir cualquier otra complicación asociada con GSD-Ia, en un sujeto con una deficiencia de glucosa-6-fosfatasa-a (G6Pasa-a). En algunas modalidades, los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un rAAV (o una composición que comprende un rAAV) descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el sujeto con una deficiencia de G6Pasa-a es un sujeto que tiene GSD-Ia. Por tanto, en algunos ejemplos, el método incluye seleccionar un sujeto con GSD-Ia.

En algunas modalidades de los métodos descritos en la presente descripción, el rAAV se administra por vía intravenosa.

En algunas modalidades, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{10} a aproximadamente 1×10^{14} partículas virales (vp)/kg. En algunos ejemplos, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{11} a aproximadamente 8×10^{13} vp/kg o aproximadamente 1×10^{12} a aproximadamente 8×10^{13} vp/kg. En otros ejemplos, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{13} a aproximadamente 6×10^{13} vp/kg. En ejemplos específicos no limitantes, el rAAV se administra a una dosis de al menos aproximadamente 1×10^{10} , al menos aproximadamente 5×10^{10} , al menos aproximadamente 1×10^{11} , al menos aproximadamente 5×10^{11} , al menos aproximadamente 1×10^{12} , al menos aproximadamente 5×10^{12} , al menos aproximadamente 1×10^{13} , al menos aproximadamente 5×10^{13} , o al menos aproximadamente 1×10^{14} vp/kg. En otros ejemplos no limitantes, el rAAV se administra a una dosis de no más de aproximadamente 1×10^{10} , no más de aproximadamente 5×10^{10} , no más de aproximadamente 1×10^{11} , no más de aproximadamente 5×10^{11} , no más de aproximadamente 1×10^{12} , no más de aproximadamente 5×10^{12} , no más de aproximadamente 1×10^{13} , no más de aproximadamente 5×10^{13} , o no más de aproximadamente 1×10^{14} vp/kg. En un ejemplo no limitante, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{12} vp/kg. En otro ejemplo no limitante, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{11} vp/kg. El rAAV puede administrarse en una sola dosis o en múltiples dosis (tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 dosis) según sea necesario para obtener los resultados terapéuticos deseados.

V. Secuencias de G6PC/G6Pasa-a humanas modificadas

En la presente descripción se describe que la enzima G6Pasa-a canina es más activa que la enzima G6Pasa-a humana. Como se muestra en la Figura 1 y Tabla 2, las dos proteínas difieren en secuencia en 18 residuos. Mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio, se identificaron mutantes de G6Pasa-a humana con actividad de fosfohidrolasa aumentada. Los mutantes de G6Pasa-a humana que se generaron contenían uno o más aminoácidos correspondientes de G6Pasa-a canina en las posiciones 3, 54, 139, 196, 199, 242, 247, 292, 298, 301, 318, 324, 332, 347, 349, 350 y/o 353 de la SEQ ID NO: 2. La secuencia de G6Pasa-a humana y una secuencia consenso de G6Pasa-a humana/canina se exponen a continuación.

G6Pasa-a humana (SEQ ID NO: 2):

```

MEEGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDWF ILVSVIADLR NAFYVLFPIW FHLQEAVGIK      60
LLWVAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPSPSGHA      120
MGTAGVYYVM VTSTLSIFQG KIKPTYRFRCLNVILWLGFW AVQLNVCLSR IYLAHFPHQ      180
VVAGVLSGIA VAETFSHIHS IYNASLKKEYF LITFFLFSFA IGFYLLKGL GVDLLWTLEK      240
AQRWCEQPEW VHIDTTPFAS LLKNLGTFLG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WLPFRLSSIV      300
ASLVLLHVFD SLKPPSQVEL VFYVLSFCKS AVVPLASVSV IPYCLAQVLG QPHKKSL      357

```

Secuencia consenso de G6Pasa-a humana/canina (SEQ ID NO: 10):

```

MEXGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDWF ILVSVIADLR NAFYVLFPIW FHLXEAVGIK      60
LLWVAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPSPSGHA      120
MGTAGVYYVM VTSTLSIFXG KKKPTYRFRCLNVILWLGFW AVQLNVCLSR IYLAHFPHQ      180
VVAGVLSGIA VAETFXHIXS IYNASLKKEYF LITFFLFSFA IGFYLLKGL GVDLLWTLEK      240
AXRWCEQPEW VHIDTTPFAS LLKNLGTFLG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WXPFRLSXIV      300
XSLVLLHVFD SLKPPSQXEL VFYXLSFCKS AXVPLASVSV IPYCLAXVXX QPXKKSL      357

```

En algunas modalidades, se proporciona en la presente descripción una G6Pasa-a modificada que comprende la SEQ ID NO: 10, en donde X en el residuo de aminoácido 3 = K o E; X en el residuo de aminoácido 54 = R o Q; X en el residuo de aminoácido 139 = R o Q; X en el residuo de aminoácido 142 = K o I; X en el residuo de aminoácido 196 = R o S; X en el residuo de aminoácido 199 = Q o H; X en el residuo de aminoácido 242 = R o Q; X en el residuo de aminoácido 247 = R o Q; X en el residuo de aminoácido 292 = F o L; X en el residuo de aminoácido 298 = C o S; X en el residuo de aminoácido 301 = V o A; X en el residuo de aminoácido 318 = T o V; X en el residuo de aminoácido 324 = T o V; X en el residuo de aminoácido 332 = A o V; X en el residuo de aminoácido 347 = R o Q; X en el residuo de aminoácido 349 = F o L; X en el residuo de aminoácido 350 = D o G; o X en el residuo de aminoácido 353 = D o H, o cualquier combinación de estos.

En ejemplos particulares, la secuencia de G6Pasa-a modificada comprende una mutación S298C, o comprende las mutaciones S298C y A310V, como se expone a continuación. En ejemplos no limitantes, la secuencia de G6Pasa-a modificada comprende o consiste en la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9.

G6Pasa-a S298C humana (SEQ ID NO: 8):

```

MEEGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDWF ILVSVIADLR NAFYVLFPIW FHLQEAVGIK      60
LLWVAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPSPSGHA      120
MGTAGVYYVM VTSTLSIFQG KIKPTYRFRCLNVILWLGFW AVQLNVCLSR IYLAHFPHQ      180
VVAGVLSGIA VAETFSHIHS IYNASLKKEYF LITFFLFSFA IGFYLLKGL GVDLLWTLEK      240
AQRWCEQPEW VHIDTTPFAS LLKNLGTFLG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WLPFRLSCIV      300
ASLVLLHVFD SLKPPSQVEL VFYVLSFCKS AVVPLASVSV IPYCLAQVLG QPHKKSL      357

```

G6Pasa-a S298C/A310V humana (SEQ ID NO: 9):

```

MEEGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDWF ILVSVIADLR NAFYVLFPIW FHLQEAVGIK      60
LLWVAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPSPSGHA      120
MGTAGVYYVM VTSTLSIFQG KIKPTYRFRCLNVILWLGFW AVQLNVCLSR IYLAHFPHQ      180
VVAGVLSGIA VAETFSHIHS IYNASLKKEYF LITFFLFSFA IGFYLLKGL GVDLLWTLEK      240
AQRWCEQPEW VHIDTTPFAS LLKNLGTFLG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WLPFRLSCIV      300
VSLVLLHVFD SLKPPSQVEL VFYVLSFCKS AVVPLASVSV IPYCLAQVLG QPHKKSL      357

```

En algunas modalidades, la G6Pasa-a modificada que comprende una mutación S298C está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos expuesta a continuación.

G6PC S298C humana (SEQ ID NO: 6):

5

10

15

20

```

      ATG GAGGAAGGAA TGAATGTTCT CCATGACTTT GGGATCCAGT CAACACATTA CCTCCAGGTG AATTACCAAG
ACTCCCAGGA CTGGTTCATC TTGGTGTCCG TGATCGCAGA CCTCAGGAAT GCCTTCTACG TCCTCTTCCC CATCTGGTTC
CATCTTCAGG AAGCTGTGGG CATTAAACTC CTTTGGGTAG CTGTGATTGG AGACTGGGTC AACCTCGTCT TTAAGTGGAT
TCTCTTTGGA CAGCGTCCAT ACTGGTGGGT TTTGATACT GACTACTACA GCAACACTTC CGTGCCCCCTG ATAAAGCAGT
TCCTGTAAAC CTGTGAGACT GGACCAGGGA GCCCCCTGCG CCATGCCATG GGCACAGCAG GTGTATACTA CGTGATGGTC
ACATCTACTC TTTCATCTTT TCAGGGAAAG ATAAAGCCGA CCTACAGATT TCGGTGCTTG AATGTCATT TGTGGTTGGG
ATTCTGGGCT GTGCAGCTGA ATGTCTGTCT GTCACGAATC TACCTTGCTG CTCATTTTCC TCATCAAGTT GTTGCTGGAG
TCCTGTCAGG CATTGCTGTT GCAGAAACTT TCAGCCACAT CCACAGCATC TATAATGCCA GCCTCAAGAA ATATTTTCTC
ATTACCTTCT TCCTGTTTCC GTTCGCCATC GGATTTTATC TGCTGCTCAA GGGACTGGGT GTAGACCTCC TGTGGACTCT
GGAGAAAGCC CAGAGGTGGT GCGAGCAGCC AGAATGGGTC CACATTGACA CCACACCTTT TGCCAGCCTC CTCAAGAAC
TGGGCACGCT CTTTGGCCTG GGGCTGGCTC TCAACTCCAG CATGTACAGG GAGAGCTGCA AGGGGAAACT CAGCAAGTGG
CTCCCATTC GCCTCAGCTG CATTGTAGCC TCCCTCGTCC TCCTGCACGT CTTTGACTCC TTGAAACCCC CATCCCAAGT
CGAGCTGGTC TTCTACGTCT TGTCTTCTG CAAGAGTCCG GTAGTGCCCC TGGCATCCGT CAGTGTATC CCCTACTGCC
TCGCCCAGGT CCTGGGCCAG CCGCACAGA AGTCGTTGTA A

```

G6PC S298C humana optimizada en codón (SEQ ID NO: 7):

25

30

35

```

      ATG GAAAGAGGCA TGAACGTGCT GCACGACTTC GGCATCCAGA GCACCCACTA TCTGCAGGTC AACTACCAGG ACAGCCAGGA
CTGGTTCATC CTGGTGTCCG TGAICGCCGA CCTGCGGAAC GCCTTCTACG TGCTGTTCGC CATCTGGTTC CATCTGCAAG AAGCGTCCG
CATCAAGCTG CTGTGGGTGG CCGTATCGCG CGATTGGCTG AACCTGGTGT TCAAGTGGAT CCTGTTCGGC CAGCGGCCCT ATTGGTGGGT
GCTGGACACC GACTACTACA GCAACACCAG CGTGCCCCCTG ATCAAGCAGT TCCCCGTGAC CTGCGAGACA GGCCCTGGGT CTCCTTCTGG
CCACGCCATG GGAACAGCCG GCGTGTACTA CGTGATGGTC ACCAGCACCC TGAGCATCTT CCAGGGCAAG ATCAAGGCCA CCTACCGGTT
CCGGTGCCTG AACGTGATCC TGTGGCTGGG CTTCTGGGCC GTGCAGCTGA ACGTGTGCCT GAGCCGGATC TACCTGGCCG CCCACTTCCC
ACATCAAGTG GTGCGCGCGG TGCTGAGCGG AATCGCCCTG GCCGAGATAT TCAGCCACAT CCACAGCATC TACAACGCCA GCCTGAAGAA
GTACTTCTGT ATCACATTCT TTCGTTCAG CTTGCCATC GGCCTTCTAC TGCTGTGTA GGGCCTGGGC GTGGACCTCC TGTGGACCTC
GGAAAGGCC CAGCGTGGT GCGAGCAGCC CGAGTGGGTG CACATCGACA CCACCCCTT CGCCAGCCTG CTGAAGAAC TGGGCACCTC
GTTTGGACTG GGCCTGGCCC TGAACAGCAG CATGTACAGA GAGAGCTGCA AGGGCAAGCT GAGCAAGTGG CTGCCCTTCC GGCTGAGCTG
CATCGTGGCC AGCCTGGTGC TGCTGCAGCT GTTCGACAGC CTGAAGCCCC CCAGCCAGGT GGAACGTGGT TTTTACGTGC TGAGCTTCTG
CAAGAGCGCC GTGTGCCCC TGCCCTCCGT GTCTGTGATC CCTTACTGEC TGGCTCAGET GCTGGGCCAG CCCCACAAGA AGTCCCTCTG A

```

VI. AAV recombinante para aplicaciones de terapia génica

AAV pertenece a la familia *Parvoviridae* y el género *Dependovirus*. AAV es un virus pequeño, sin envoltura, que empaqueta un genoma de ADN monocatenario lineal. Tanto las cadenas sentido como antisentido de ADN de AAV se empaquetan en cápsides de AAV con la misma frecuencia.

El genoma de AAV se caracteriza por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean dos marcos de lectura abiertos (ORF). En el genoma de AAV2, por ejemplo, los primeros 125 nucleótidos del ITR son un palíndromo, que se pliega sobre sí mismo para maximizar el apareamiento de bases y forma una estructura de horquilla en forma de T. Las otras 20 bases de la ITR, denominadas la secuencia D, permanecen sin aparear. Las ITR son secuencias de acción cis importantes para la replicación del ADN de AAV; la ITR es el origen de la replicación y sirve como un cebador para la síntesis de la segunda cadena por la ADN polimerasa. El ADN bicatenario formado durante esta síntesis, que se denomina monómero en forma replicante, se usa para una segunda ronda de replicación por autocebado y forma un dímero en forma replicante. Estos productos intermedios bicatenario se procesan mediante un mecanismo de desplazamiento de cadena, lo que da como resultado un ADN monocatenario usado para el empaquetamiento y un ADN bicatenario usado para la transcripción. Dentro de la ITR se ubican los elementos de unión Rep y un sitio de resolución terminal (TRS). Estas características son usadas por la proteína reguladora viral Rep durante la replicación de AAV para procesar los productos intermedios bicatenarios. Además de su papel en la replicación de AAV, el ITR también es esencial para el empaquetamiento del genoma de AAV, la transcripción, la regulación negativa en condiciones no permisivas y la integración específica del sitio (Daya y Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008).

El ORF izquierdo de AAV contiene el gen Rep, que codifica cuatro proteínas - Rep78, Rep 68, Rep52 y Rep40. El ORF derecho contiene el gen de Cap, que produce tres proteínas de la cápside viral (VP1, VP2 y VP3). La cápside de AAV contiene 60 proteínas de la cápside viral dispuestas en una simetría icosaédrica. VP1, VP2 y VP3 están presentes en una relación molar 1:1:10 (Daya y Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008).

El VAA es actualmente uno de los virus más usados para terapia génica. Aunque el VAA infecta a los seres humanos y algunas otras especies de primates, no se sabe que cause enfermedades y provoca una respuesta

inmunitaria muy leve. Los vectores de terapia génica que utilizan AAV pueden infectar células tanto en división como quiescentes y persistir en un estado extracromosómico sin integrarse en el genoma de la célula huésped. Debido a las características ventajosas de AAV, la presente descripción contempla el uso de AAV para las moléculas de ácido nucleico recombinante y los métodos descritos en la presente descripción.

El AAV posee varias características deseables para un vector de terapia génica, incluida la capacidad de unirse y entrar a las células diana, entrar al núcleo, la capacidad de expresarse en el núcleo durante un período de tiempo prolongado y baja toxicidad. Sin embargo, el pequeño tamaño del genoma de AAV limita el tamaño del ADN heterólogo que puede incorporarse. Para minimizar este problema, se han construido vectores de AAV que no codifican Rep y el elemento de eficiencia de integración (IEE). Los ITR se mantienen ya que son señales *cis* necesarias para el empaquetamiento (Daya y Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008).

Los métodos para producir rAAV adecuados para terapia génica son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2012/0100606; 2012/0135515; 2011/0229971; y 2013/0072548; y Ghosh y otros, Gene Ther 13(4):321-329, 2006), y puede utilizarse con las moléculas de ácido nucleico recombinantes, los vectores y los métodos descritos en la presente descripción.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o modalidades particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse para limitar la descripción a las características o modalidades particulares descritas.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción y caracterización de mutantes de G6PC (G6Pasa-a) humanos para su uso en terapia génica mediada por AAV

Este ejemplo describe la generación de 18 mutantes de G6PC humanos y la identificación de mutantes de G6Pasa-a específicos con actividad de fosfohidrolasa aumentada.

Construcción de mutantes de G6PC

Para construir mutantes de G6PC humanos, se usó como una plantilla el vector pSVL, que comprende los nucleótidos 1 a 1074 del ADNc de G6PC humano (la región codificante completa, con el codón de iniciación ATG en los nucleótidos 1-3; SEQ ID NO: 11). Para la mutagénesis dirigida por PCR, la plantilla se amplificó mediante el uso de dos cebadores de PCR externos que coincidían con los nucleótidos 1 a 20 (sentido) y 1055 a 1074 (antisentido) que flanqueaban los cebadores mutantes antisentido y sentido de 20 nucleótidos de longitud con el codón a mutar en el medio (ver la Figura 4 y la Tabla 1 a continuación). La plantilla para el doble mutante hG6PC-S298C/A301V fue el mutante pSVL-hG6PC-S298C. Las secuencias mutadas se clonaron en pSVL y se verificaron mediante la secuenciación de ADN.

Tabla 1. Cambios de nucleótidos en mutantes de G6PC humanos

Mutación	Cambios de nucleótidos/codones	Secuencias en G6PC humano
R3K	GAA (R) → AAA (K)	nucleótidos 7-9
Q54R	CAG (Q) → CGT (R)	nucleótidos 160-162
Q139R	CAG (Q) → CGG (R)	nucleótidos 415-417
I142K	ATA (I) → AAA (K)	nucleótidos 424-426
S196R	AGC (S) → CGC (R)	Nucleótidos 586-588
H199Q	CAC (H) → CAG (Q)	nucleótidos 595-597
Q242R	CAG (Q) → AGG (R)	nucleótidos 724-726
Q247R	CAG (Q) → CGG (R)	nucleótidos 739-741
L292F	CTC (L) → TTC (F)	nucleótidos 874-876
S298C	TCT (S) → TGC (C)	nucleótidos 892-894
A301V	GCC (A) → GTG (V)	nucleótidos 901-903
V318T	GTC (V) → ACT (T)	nucleótidos 952-954
V324T	GTC (V) → ACC (T)	nucleótidos 970-972
V332A	GTA (V) → GCA (A)	nucleótidos 994-996
Q347R	CAG (Q) → CGG (R)	nucleótidos 1039-1041
L349F	CTG (L) → TTC (F)	nucleótidos 1045-1047

Continuación

Mutación	Cambios de nucleótidos/codones	Secuencias en G6PC humano
G350D	GGC (G) → GAC (D)	nucleótidos 1048-1050
H353D	CAC (H) → GAC (D)	nucleótidos 1057-1059

Expresión en células COS-1 y ensayos de fosfohidrolasa

Se cultivaron células COS-1 a 37 °C en medio esencial mínimo modificado con Dulbecco tamponado con HEPES suplementado con suero bovino fetal al 4 %. Los constructos de G6PC se transfectaron en células COS-1 mediante el método de DEAE-dextrano/cloroquina. Después de la incubación a 37 °C durante 2 días, los cultivos transfectados se recolectaron para determinar la actividad de fosfohidrolasa. Brevemente, se incubaron mezclas de reacción (50 µl) que contenían tampón cacodilato 50 mM, pH 6,5, G6P 10 mM y cantidades apropiadas de homogeneizados celulares a 37 °C durante 10 minutos como se describió previamente (Lei y otros, Science 262:580-583, 1993).

Análisis estadístico

La prueba t para muestras no apareadas se realizó mediante el uso del programa GraphPad Prism, versión 4 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los valores se consideraron estadísticamente significativos a $p < 0,05$.

Resultados

Las actividades de fosfohidrolasa de la G6Pasa-a humana y canina se compararon mediante ensayos de expresión *in vitro*. Los resultados demostraron que la enzima canina era aproximadamente 5 veces más activa que la enzima humana. Un alineamiento de secuencias de las secuencias canina y humana demostró que las dos enzimas difieren en 18 residuos de aminoácidos (Figura 1 y Tabla 2).

Tabla 2. Diferencias de aminoácidos entre la G6Pasa-a humana y canina

	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido
Canina	K3	R54	R139	K142	R196
Humana	E3	Q54	Q139	I142	S196
Canina	Q199	R242	R247	F292	C298
Humana	H199	Q242	Q247	L292	S298
Canina	V301	T318	T324	A332	R347
Humana	A301	V318	V324	V332	Q347
Canina	F349	D350	D353		
Humana	L349	G350	H353		

Para determinar qué sustituciones de aminoácidos dan como resultado un aumento de la actividad enzimática de la G6Pasa-a canina, se construyeron 18 mutantes de G6PC humana mediante mutagénesis dirigida al sitio. Cada mutante portaba uno de los aminoácidos correspondientes de la G6Pasa-a canina. Las actividades de fosfohidrolasa de los 18 mutantes de G6Pasa-a humana se examinaron mediante ensayos de expresión transitoria. Los resultados demostraron que el constructo de G6PC-S298C humana era la más activa, con una actividad 2,14 veces mayor que la actividad del constructo de G6PC-WT (Tabla 3). El mutante G6PC-A301V también fue más activo, siendo 1,35 veces más activo que el G6PC-WT. A continuación, se construyó un mutante doble S298C/A301V (hG6PC-S298C/A301V). Este doble mutante fue igualmente tan activo como el mutante hG6PC-S298C individual (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad de fosfohidrolasa de mutantes de G6PC humana

Construido de G6PC	Ubicación	Actividad de fosfohidrolasa (nmol/min/mg)
pSVL-hG6PC-WT		164,5 ± 9,5 (100 %)
pSVL-hG6PC-E3K	N-terminal	156,0 ± 6,3
pSVL-hG6PC-Q54R	C1	169,6 ± 7,3
pSVL-hG6PC-Q139R	C2	113,1 ± 6,7
pSVL-hG6PC-I142K	C2	141,0 ± 4,4
pSVL-hG6PC-S 196R	H5	90,5 ± 2,5
pSVL-hG6PC-H199Q	C3	154,0 ± 7,4
pSVL-hG6PC-Q242R	L3	174,5 ± 4
pSVL-hG6PC-Q247R	L3	143,8 ± 16,4
pSVL-hG6PC-L292F	H8	140,3 ± 20,3
pSVL-hG6PC-S298C	H8	351,8 ± 16,4 (214 %)
pSVL-hG6PC-A301V	H8	221,7 ± 12,5 (135 %)
pSVL-hG6PC-S298C/A301V	H8	353,7 ± 18,8 (215 %)
pSVL-hG6PC-V318T	L4	156,7 ± 16,3
pSVL-hG6PC-V324T	H9	117,6 ± 82
pSVL-hG6PC-V332A	H9	160,5 ± 13,1
pSVL-hG6PC-Q347R	C-terminal	162,5 ± 7,9
pSVL-hG6PC-L349F	C-terminal	186,4 ± 5,9 (113 %)
pSVL-hG6PC-G350D	C-terminal	146,6 ± 16,7
pSVL-hG6PC-H353D	C-terminal	164,7 ± 2,8

Actividad de fosfohidrolasa de células COS-1 transfectadas con un constructo de G6PC de tipo silvestre (WT) humana (h) o de mutante de hG6PC en un vector pSVL. Los datos representan la media ± SEM. H, L y C indican las ubicaciones de las mutaciones en las hélices 1 a 9, bucles luminales 1 a 4 o bucles citoplásmicos 1 a 4, respectivamente (Figura 2). Los números entre paréntesis son el % de actividad de hG6PC-WT. Los ensayos de fosfohidrolasa se realizaron por duplicado.

Se ha demostrado previamente que la integridad estructural de las hélices transmembrana es vital para la estabilidad y la actividad enzimática de G6PC, y los mutantes no helicoidales no juegan un papel esencial en la estabilidad de G6PC (Shieh y otros, J Biol Chem 277:5047-5053, 2002). De acuerdo con estas observaciones previas, las mutaciones de los residuos de aminoácidos en la hélice 8 de G6PC alteraron marcadamente la actividad enzimática.

Para confirmar adicionalmente la eficacia del constructo de hG6PC-S298C, se compararon las actividades de fosfohidrolasa de dos constructos de G6PC humana, pSVL-G6PC-WT y pSVL-G6PC-S298C. Los ensayos de expresión transitoria demostraron que el constructo pSVL-G6PC-S298C era 1,7 veces más eficaz que el constructo pSVL-G6PC (Tabla 4).

Los estudios han demostrado que las estrategias de optimización en codón pueden aumentar la eficiencia de la traducción (Huston y otros, Mol Ther 9:1867-1877, 2011). La G6PC humana optimizada en codón (co) es 1,46 veces más activa que el constructo G6PC-WT (Tabla 4). Para examinar el impacto de la optimización en codón, se construyó pSVL-co-G6PC-S298C, que expresa una G6PC-S298C humana optimizada en codón. Los ensayos de expresión transitoria demostraron que el constructo pSVL-co-G6PC-S298C era 2,9 veces más eficaz que el constructo pSVL-G6PC-WT (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad de fosfohidrolasa de hG6PC-WT, hG6PC-S298C, co-hG6PC, co-hG6PC-S298C y G6PC canina

Constructos de hG6PC	Actividad de fosfohidrolasa (nmol/min/mg)
pSVL-hG6PC-WT	131,1 ± 3,8 (100 %)
pSVL-hG6PC-S298C	223,1 ± 7,1 (170 %)
pSVL-co- hG6PC	191,5 ± 6,0 (146 %)
pSVL-co- hG6PC-S298C	382,8 ± 23,5 (292 %)
pSVL-G6PC canina	725,7 ± 66,5 (554 %)

Actividad de fosfohidrolasa de células COS-1 transfectadas con constructo de constructo hG6PC-WT, hG6PC-S298C, co-hG6PC, co-hG6PC-S298C o G6PC canina en un vector pSVL. Los datos representan la media ± SEM de tres experimentos independientes mediante el uso de tres lotes separados de cada constructo. Los ensayos de fosfohidrolasa se realizaron por duplicado. Los números entre paréntesis son el % de actividad de hG6PC-WT.

Se construyeron vectores AAV8-GPE-G6PC, AAV8-GPE-co-G6PC, AAV8-GPE-G6PC-S298C y AAV8-GPE-co-G6PC-S298C recombinantes. Se examinó la actividad de la G6Pasa hepática en ratones GSD-Ia (*G6pc*^{-/-}) infundidos con vectores AAV8-GPE-G6PC, AAV8-GPE-G6PC-S298C, AAV8-GPE-co-G6PC, o AAV8-GPE-co-G6PC-S298C. De acuerdo con estudios de expresión *in vitro*, los estudios *in vivo* demostraron que los vectores AAV8-GPE-G6PC-S298C y AAV8-co-G6PC-S298C dirigían la expresión hepática de G6PC que era 3,4 veces superior a la del vector AAV8-GPE-G6PC (Figura 3).

Ejemplo 2: Evaluación de la dosis mínima de vector necesaria para corregir la deficiencia hepática de G6Pasa-a

Este ejemplo describe estudios para determinar la dosis mínima necesaria para restaurar la actividad de G6Pasa-a a un nivel que previene el desarrollo de HCA/HCC y mantiene la homeostasis de la glucosa.

GSD-Ia se caracteriza por una alteración de la homeostasis de la glucosa y la complicación a largo plazo del adenoma hepatocelular (HCA) (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). El inventor ha demostrado previamente que los ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV8-G6PC que expresaban ≥ 3 % de la actividad hepática normal de G6Pasa-α (que es equivalente a ≥ 5 unidades de actividad de G6Pasa-α; 1 nmol/min/mg se define como una unidad de actividad de G6Pasa-a) mantienen la homeostasis de la glucosa hasta las P70-P90 semanas y no desarrollan HCA (Lee y otros, Hepatology 56:1719-1729, 2012; publicación PCT núm. WO 2015/081101).

El presente estudio se realizó mediante el uso de vectores de rAAV8 purificados y titulados con precisión (suministrados por Dimension Therapeutics, Cambridge, MA) para determinar la dosificación mínima de vector de rAAV necesaria para corregir la deficiencia de G6Pasa-α hepática mediante el uso de ratones *G6pc*^{-/-}. Los ratones *G6pc*^{-/-} de diez días de edad se infundieron con 5 x 10¹¹ vg/kg de rAAV8-co-G6PC o rAAV8-co-G6PC-S298C. A los 24 días de edad (2 semanas después de la infusión), la actividad hepática de G6Pasa-a en ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV-co-G6PC-S298C- y rAAV8-co-G6PC fue de 18,6 ± 1,1 y 7,7 ± 1,1 unidades, respectivamente (Figura 5).

Se ha demostrado que la eficiencia y la persistencia de la transferencia de genes hepáticos mediada por AAV son menores durante el desarrollo temprano porque la rápida tasa de proliferación hepatocelular asociada con el crecimiento del hígado puede diluir el número de células efectivamente infectadas con AAV (Yiu y otros, Mol Ther 18:1076-1084, 2010). En ratones *G6pc*^{-/-} de dos semanas de edad infundidos con 1,5 x 10¹³ vg/kg de rAAV-G6PC, la actividad hepática de G6Pasa-α fue de 174,0 ± 22,4 unidades a las 24 semanas de edad. En ratones *G6pc*^{-/-} de cuatro semanas de edad infundidos con 1 x 10¹³ vg/kg de rAAV-G6PC, la actividad de G6Pasa-a hepática fue de 335,6 ± 40,2 unidades a las 24 semanas de edad, que es 2,9 veces mayor que la actividad de G6Pasa-a en ratones infundidos a las 2 semanas de edad con la misma dosificación de vector.

Por lo tanto, se espera que si se infunde la misma dosificación de rAAV-co-G6PC-S298C en ratones *G6pc*^{-/-} de 4 semanas de edad, la actividad G6Pasa-α se restablecerá a 53,94 (18,6 x 2,9) unidades a las 24 semanas de edad, muy por encima de la actividad hepática mínima de G6Pasa-α (5 unidades) requerida para mantener la homeostasis de la glucosa y prevenir la formación de HCA/HCC. Esto también cumple con el requisito del ensayo clínico de terapia génica humana mediado por rAAV para el tratamiento de GSD-Ia, que requiere la administración de ≤ 1 x 10¹² vg/kg de AAV.

Para comparar la eficacia relativa de los cuatro vectores diferentes, se infunde a ratones *G6pc*^{-/-} de 10 días de edad con 5 x 10¹¹ vg/kg del vector rAAV8-G6PC o rAAV8-G6PC-S298C titulado con precisión y la actividad hepática de G6Pasa-α de los ratones *G6pc*^{-/-} tratados se examina a la edad de 24 días. Además, se infunden ratones *G6pc*^{-/-} de 10 días de edad con 5 x 10¹² vg/kg de rAAV8-G6PC, rAAV8-G6PC-S298C, rAAV8-co-G6PC o rAAV8-co-G6PC-S298C y se examinó la actividad de G6Pasa-a hepática de los ratones *G6pc*^{-/-} tratados a la edad de 12 semanas.

Los resultados de este estudio demostrarán la estabilidad de la expresión transgénica desde los 24 días hasta las 12 semanas de edad.

5 Los ratones *G6pc*^{-/-} sin tratar tienen una vida útil corta. Para determinar con mayor precisión la dosificación mínima de vector de rAAV requerida para corregir la deficiencia de G6Pasa-a hepática en ratones adultos, se usaron ratones L-*G6pc*^{-/-}, que tienen una supresión de G6Pasa específica de hígado y que sobreviven hasta la edad adulta, como se describe a continuación.

10 Los ratones *G6pc*^{fx/fx} contienen el exón 3 del gen *G6pc* flanqueado por sitios *loxP* (Peng y otros, Genesis 47:590-594, 2009). Los ratones *G6pc*^{fx/fx} se cruzaron con ratones SA^{creERT2/w} (Schuler y otros, Génesis 39:167-172, 2004), que expresan una Cre-recombinasa dependiente de tamoxifeno bajo el control del promotor de albúmina sérica para producir ratones *G6pc*^{fx/fx}.SA^{creERT2/w}. La inactivación de *G6pc* específica de hígado (L-*G6pc*^{-/-}) se generó por escisión mediada por tamoxifeno del exón 3 de *G6pc* en ratones *G6pc*^{fx/fx}.SA^{creERT2/w} de tres semanas de edad. Se espera que el 100 % de los ratones L-*G6pc*^{-/-} desarrollarán HCA/HCC a la edad de 54 semanas (51 semanas después de la escisión genética de *G6pc*).

15 Se trataron ratones L-*G6pc*^{-/-} de diez semanas de edad con 10¹² vg/kg de rAAV-G6PC. Los resultados mostraron que, a la edad de 18 semanas, la actividad de la G6Pasa-a hepática se restauró a 68,9 ± 12,8 unidades (Figura 6A). Los ratones tratados con AAV (ratones AAV) no exhibieron anomalías histológicas hepáticas excepto el almacenamiento leve de glucógeno (Figura 6B), y mostraron un perfil normal de tolerancia a la glucosa en ayunas (FGT) (Figura 6C). Además, los ratones AAV exhibieron un peso hepático normalizado (Figura 6D) y niveles hepáticos normalizados de glucógeno y triglicéridos (Figura 6E). Estos datos indican que es posible reducir a una dosificación más óptima para un ensayo de terapia génica clínica humana para el tratamiento de GSD-Ia.

20 Para examinar la dosis mínima de rAAV8-G6PC, rAAV8-co-G6PC, rAAV8-G6PC-S298C y rAAV8-co-G6PC-S298C requerida para corregir la deficiencia de G6Pasa-α hepática y prevenir el desarrollo de HCA/HCC, se infunden varias dosis (por ejemplo, 1 x 10¹⁰, 3 x 10¹⁰, 1 x 10¹¹, 3 x 10¹¹, 1 x 10¹², 3 x 10¹² y 1 x 10¹³) de cada vector en ratones L-*G6pc*^{-/-} de 10-12 semanas de edad. A las 54 semanas de edad, se mide la actividad de G6Pasa-a. También se miden y/o evalúan la histología hepática, FGT, peso del hígado y niveles hepáticos de glucógeno y triglicéridos.

30 Ejemplo 3: Tratamiento de GSD-Ia humana mediante terapia génica basada en AAV

Este ejemplo describe un método ilustrativo para el uso clínico de vectores de AAV que codifican G6PC modificada para el tratamiento de GSD-Ia.

35 Se selecciona a un paciente diagnosticado con GSD-Ia para el tratamiento. Por lo general, el paciente tiene al menos 18 años y puede o no haber tenido una exposición previa a la inmunomodulación. Al paciente se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un AAV recombinante que expresa G6PC modificada, tal como un rAAV que comprende la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, como se describe en la presente descripción. El AAV recombinante puede administrarse por vía intravenosa. Un médico puede seleccionar una dosis terapéutica apropiada. En algunos casos, la dosis terapéuticamente eficaz está en el intervalo de 1 x 10¹⁰ a 1 x 10¹⁴ partículas virales (vp)/kg, tal como aproximadamente 1 x 10¹¹ o 1 x 10¹² vp/kg. En la mayoría de los casos, al paciente se le administra una sola dosis. En ausencia de inmunomodulación, es probable que el paciente tolere solo una única infusión de rAAV. Si el sujeto ha tenido inmunomodulación previa a la exposición, pueden administrarse dos o más dosis. La salud del sujeto puede monitorearse a lo largo del tiempo para determinar la eficacia del tratamiento.

Listado de secuencias

50 <110> Los estados unidos de américa, representados por el secretario, departamento de salud y servicios humanos

<120> Vectores de virus adenoasociado que codifican g6pc modificada y usos de estos

55 <130> 4239-94138-02

<150> US 62/096,400

<151> 2014-12-23

60 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

65 <211> 357

<212> PRT

ES 2 824 829 T3

<213> Canis lupus

<400> 1

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

ES 2 824 829 T3

	Ala Val Gln Leu Asn Val Cys Leu Ser Arg Ile Tyr Leu Ala Ala His	165	170	175
5	Phe Pro His Gln Val Val Ala Gly Val Leu Ser Gly Ile Ala Val Ala	180	185	190
10	Glu Thr Phe Arg His Ile Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Ser Leu Lys Lys	195	200	205
	Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Phe Leu Phe Ser Phe Ala Ile Gly Phe Tyr	210	215	220
15	Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Val Asp Leu Leu Trp Thr Leu Glu Lys	225	230	235
20	Ala Arg Arg Trp Cys Glu Arg Pro Glu Trp Val His Ile Asp Thr Thr	245	250	255
25	Pro Phe Ala Ser Leu Leu Lys Asn Val Gly Thr Leu Phe Gly Leu Gly	260	265	270
	Val Thr Leu Asn Ser Ser Met Tyr Arg Glu Ser Cys Lys Gly Lys Leu	275	280	285
30	Ser Lys Trp Phe Pro Phe Arg Leu Ser Cys Ile Val Val Ser Leu Ile	290	295	300
35	Leu Leu His Leu Phe Asp Ser Leu Lys Pro Pro Ser Gln Thr Glu Leu	305	310	315
40	Ile Phe Tyr Thr Leu Ser Phe Cys Lys Ser Ala Ala Val Pro Leu Ala	325	330	335
	Ser Val Ser Leu Ile Pro Tyr Cys Leu Ala Arg Val Phe Asp Gln Pro	340	345	350
45	Asp Lys Lys Ser Leu	355		
50	<210> 2 <211> 357 <212> PRT <213> Homo sapiens			
55	<400> 2			
	Met Glu Glu Gly Met Asn Val Leu His Asp Phe Gly Ile Gln Ser Thr	1	5	10
60				15
65				

ES 2 824 829 T3

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

ES 2 824 829 T3

	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Ser	Met	Tyr	Arg	Glu	Ser	Cys	Lys	Gly	Lys	Leu	
			275					280					285				
5	Ser	Lys	Trp	Leu	Pro	Phe	Arg	Leu	Ser	Ser	Ile	Val	Ala	Ser	Leu	Val	
		290					295					300					
10	Leu	Leu	His	Val	Phe	Asp	Ser	Leu	Lys	Pro	Pro	Ser	Gln	Val	Glu	Leu	
	305					310					315					320	
15	Val	Phe	Tyr	Val	Leu	Ser	Phe	Cys	Lys	Ser	Ala	Val	Val	Pro	Leu	Ala	
					325					330					335		
20	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Tyr	Cys	Leu	Ala	Gln	Val	Leu	Gly	Gln	Pro	
				340					345					350			
25	His	Lys	Lys	Ser	Leu												
				355													
	<210> 3																
	<211> 7671																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia artificial																
	<220>																
30	<223> Constructo sintético (pTR-GPE-G6PC humana)																
	<220>																
	<221> misc_característica																
	<222> (17)..(163)																
	<223> Repetición terminal invertida																
35	<220>																
	<221> misc_característica																
	<222> (182)..(3045)																
	<223> GPE																
40	<220>																
	<221> misc_característica																
	<222> (3051)..(3184)																
	<223> Secuencia de relleno																
45	<220>																
	<221> misc_característica																
	<222> (3185)..(3321)																
	<223> Intrón																
50	<220>																
	<221> misc_característica																
	<222> (3322)..(3367)																
	<223> Secuencia de relleno																
55	<220>																
	<221> misc_característica																
	<222> (3368)..(4441)																
	<223> secuencia codificante de G6PC humana																
60	<220>																
	<221> misc_característica																
	<222> (4674)..(4819)																
	<223> Repetición terminal invertida																
65	<400> 3																

ES 2 824 829 T3

	gggggggggg	gggggggggt	ggccactccc	tctctgcgcg	ctcgcctcgt	cactgaggcc	60
	gggcgaccaa	aggtcgcccg	acgcccgggc	tttgcccggg	cggcctcagt	gagcgagcga	120
5	gcgcgcagag	agggagtggc	caactccatc	actaggggtt	cctagatctg	aattcggtac	180
	ccctttgaga	atccacggtg	tctcgatgca	gtcagctttc	taacaagctg	gggcctcacc	240
	tgttttccca	cggataaaaa	cgtgctggag	gaagcagaaa	ggggctggca	ggtggaaaga	300
10	tgaggaccag	ctcatcgtct	catgactatg	aggttgctct	gatccagagg	gtccccctgc	360
	ctggtggccc	accgccagga	agactcccac	tgtccctgga	tgcccagagt	gggatgtcaa	420
	ctccatcact	tatcaactcc	ttatccatag	gggtattctt	cctgaggcgt	ctcagaaaac	480
15	agggccctcc	ccatatgctg	accacataat	agaaccctc	ccaactcaga	gaccctggct	540
	gctagctgcc	ctggcatgac	ccagacagtg	gcctttgtat	atgttttttag	actcaccttg	600
	actcacctct	gaccatagaa	actctcatcc	cagaggtcac	tgcaatagtt	actccacaac	660
20	agaggcttat	ctgggtagag	ggaggctccc	tacctatggc	ccagcagccc	tgacagtgca	720
	gatcacatat	acccacagcc	ccagcactgc	ctgccacgca	tgggcttact	ttacaccac	780
	ccacagtcat	caacacatta	cctgctctcc	aagggttaggc	gtggcaggag	aagtttgctt	840
25	ggaccagcag	aaaccatgca	gtcaaggaca	actggagtca	gcatgggctg	ggtgcgagcc	900
	cttggtgggg	tggggaggag	actccaggtc	atacctcctg	gaggatgttt	taatcatttc	960
	cagcatggaa	tgctgtcaac	ttttgccaca	gattcattag	ctctgagttt	cttttttctg	1020
30	tccccagcta	ccccttacat	gtcaatatgg	acttaatgat	gggaaattca	ggcaagtttt	1080
	taaacatttt	attccccctg	gctcttatcc	tcaaaaaatg	catgaatttg	gaggcagtg	1140
35	ctcatgcctg	taatcccaat	gctttgctag	gttgaggcgg	gaggatcact	tgaagccagg	1200
	aatttgagac	cagcctgggc	cgcatagtga	gaccccgttt	ctacaaaaat	aaataaataa	1260
	ataataaata	atagtgatat	gaagcatgat	taaatagccc	tatttttttaa	aatgcatgag	1320
40	ttcgttacct	gattcattcc	ctggttccct	tcacagtcct	ccgtgaccca	agtgttaggg	1380
	ttttggtctc	tctactattt	gtaggctgat	atatagtata	cacacacaca	cacacacaca	1440
	tatacacaca	cacagtgtat	cttgagcttt	cttttgtata	tctacacaca	tatgtataag	1500
45	aaagctcaag	atatagaagc	cctttttcaa	aaataactga	aagtttcaaa	ctctttaagt	1560
	ctccagttac	cattttgctg	gtattcttat	ttggaaccat	acattcatca	tattgttgca	1620
	cagtaagact	atacatcat	tattttgctt	aaacgtatga	gttaaaacac	ttggccaggc	1680
50							
55							
60							
65							

ES 2 824 829 T3

	atggtggttc acacctgtaa tcccagagct ttgggaagcc aagactggca gatctcttga	1740
	gctcaggaat tcaagaccag cctgggcaac atggaaaaac cccatctcta caaaagatag	1800
5	aaaaattagc caggcatggt ggcgtgtgcc tgtgggtcca gctactcagg aggctgaggt	1860
	gggaggatca cattagccca ggagggtgag gctgcagtga gccgtgatta tgccactgca	1920
	ctccagcctg ggagacagag tgagaccctg tttcaaaaaa aagagagaga aaatttaaaa	1980
10	aagaaaacaa caccaagggc tgtaacttta aggtcattaa atgaattaat cactgcattc	2040
	aaaaacgatt actttctggc cctaagagac atgaggccaa taccaggaag ggggttgatc	2100
	tcccaaacca gaggcagacc ctagactcta atacagttaa ggaaagacca gcaagatgat	2160
15	agtccccaat acaatagaag ttactatatt ttatttgttg tttttctttt gttttgtttt	2220
	gttttgtttt gttttgtttt agagactggg gtcttgctcg attgcccagg ctgtagtgca	2280
	gcggtgggac aatagctcac tgcagactcc aactcctggg ctcaagcaat cctcctgcct	2340
20	cagcctcctg aatagctggg actacaaggg tacaccatca cacacaccaa aacaattttt	2400
	taaatttttg tgtagaaacg agggctcttc tttgttgccc aggctggtct ccaactcctg	2460
	gcttcaaggg atcctccac ctcagcctcc caaattgctg ggattacagg tgtgagccac	2520
25	cacaaccagc cagaacttta ctaattttta aattaagaac ttaaaacttg aatagctaga	2580
	gcaccaagat ttttctttgt ccccaaataa gtgcagttgc aggcatagaa aatctgacat	2640
	ctttgcaaga atcatcgtgg atgtagactc tgtcctgtgt ctctggcctg gtttcgggga	2700
30	ccaggagggc agacccttgc actgccaaga agcatgcca agttaatcat tggccctgct	2760
	gagtacatgg ccgatcaggc tgtttttgtg tgccctgttt tctattttac gtaaataacc	2820
	ctgaacatgt ttgcatcaac ctactggtga tgcaccttg atcaatacat tttagacaaa	2880
35	cgtgggtttt gagtccaaag atcagggtcg ggttgacctg aatactggat acagggcata	2940
	taaaacaggg gcaaggcaca gactcatagc agagcaatca ccaccaagcc tggaataact	3000
	gcaagggctc tgctgacatc ttcctgaggt gccaaaggaa tgaggtctag agaagcttta	3060
40	ttgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag tgcttctgac acaacagtct	3120
	cgaacttaag ctgcagtgac tctcttaagg tagccttgca gaagttggtc gtgaggcact	3180
45	gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gttaaggag accaatagaa actgggcttg	3240
	tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac tgacatccac	3300
	tttgccttcc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta aggccctgca	3360
	ggccaccatg gaggaaggaa tgaatgttct ccatgacttt gggatccagt caacacatta	3420
50	cctccaggtg aattaccaag actcccagga ctggttcato ttggtgtccg tgatcgcaga	3480
	cctcaggaat gccttctacg tcctcttccc catctgggtc catcttcagg aagctgtggg	3540
55		
60		
65		

ES 2 824 829 T3

	cattaaactc ctttgggtag ctgtgattgg agactggctc aacctcgtct ttaagtggat	3600
	tctcttttga cagcgtccat actgggtgggt tttggatact gactactaca gcaacacttc	3660
5	cgtgcccctg ataaagcagt tccctgtaac ctgtgagact ggaccaggga gcccctctgg	3720
	ccatgccatg ggcacagcag gtgtatacta cgtgatggtc acatctactc tttccatctt	3780
	tcagggaag ataaagccga cctacagatt tcggtgcttg aatgtcattt tgtggttggg	3840
10	attctgggct gtgcagctga atgtctgtct gtcacgaatc taccttgctg ctcatcttcc	3900
	tcatcaagtt gttgctggag tcctgtcagg cattgctggt gcagaaactt tcagccacat	3960
	ccacagcatc tataatgccg gcctcaagaa atattttctc attaccttct tcctgttcag	4020
15	cttcgccatc ggattttatc tgctgctcaa gggactgggt gtagacctcc tgtggactct	4080
	ggagaaagcc cagaggtggg gcgagcagcc agaatgggtc cacattgaca ccacaccctt	4140
	tgccagcctc ctcaagaacc tgggcacgct ctttggcctg gggtggctc tcaactccag	4200
20	catgtacagg gagagctgca aggggaaact cagcaagtgg ctcccattcc gcctcagctc	4260
	tattgtagcc tccctcgtcc tcctgcacgt ctttgactcc ttgaaacccc catcccaagt	4320
	cgagctggct ttctacgtct tgtccttctg caagagtgcg gtagtgcccc tggcatccgt	4380
25	cagtgtcatc ccctactgcc tcgcccaggt cctgggccag ccgcacaaga agtcgttgta	4440
	agcggccgcg gggatccaga catgataaga tacattgatg agtttgga aaccacaact	4500
	agaatgcagt gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta	4560
30	accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag	4620
	gttcaggggg aggtgtggga ggttttttag tcgaccatgc tggggagaga tctaggaacc	4680
35	cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgogctcgc tcgctcactg aggcgcgccg	4740
	ggcaaagccc gggcgctcgg cgacctttgg tcgcccggcc tcagtgcgag agcgagcgcg	4800
	cagagagggg gtggccaacc cccccccccc ccccctgca gccctgcatt aatgaatcgg	4860
40	ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcttat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga	4920
	ctcgctgogc tcggctcgtc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat	4980
	acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca	5040
45	aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc	5100
	tgacgagcat caaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaacccga caggactata	5160
	aagataaccg gcgtttcccc ctggaagctc cctogtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc	5220
50	gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc	5280
	acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	5340
	acccccggtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	5400
55	ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag	5460

60

65

ES 2 824 829 T3

	gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct acactagaag	5520
	gacagtatgtt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag	5580
5	ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgtt ttttttgttt gcaagcagca	5640
	gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	5700
	cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gatttttggtc atgagattat caaaaaggat	5760
10	cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga	5820
	gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gcacctatct cagcgatctg	5880
	tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctctg tagataacta cgatacggga	5940
15	gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc	6000
	agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggcggag cgcagaagtg gtccctgaac	6060
	tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc	6120
20	agttaaatag ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc	6180
	gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc	6240
	catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt	6300
25	ggccgcagtg ttatcaacta tgggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc	6360
	atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagt	6420
	tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg gcgccatag	6480
30	cagaacttta aaagtgtca tcatggaaa acgttctctg gggcgaaaac tctcaaggat	6540
	cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccaactcg gcacccaact gatcttcage	6600
	atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa	6660
35	aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta	6720
	ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa	6780
	aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga	6840
40	aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct	6900
	cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccg agacggtcac	6960
	agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcggt cagcgggtgt	7020
45	tggcgggtgt cggggtctgc ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtga	7080
	ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggaaatt	7140
	gtaaacgtta atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcatTTTTT	7200
50	aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg	7260
	ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc	7320
	aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaata	7380
55	agtttttttg ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaatcgga accctaaagg gagccccga	7440
	tttagagctt gacggggaaa gccggcgaaac gtggcgagaa aggaaggga gaaagcgaaa	7500
60	ggagcgggag ctagggcgct ggcaagtgtg gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc	7560
	gccgcgctta atgcgcgct acagggcgcg tcgcgccatt cgcattcag gctacgcaac	7620
	tgttggaag ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac gccaggctgc a	7671
65		

<210> 4
 <211> 7671
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Constructo sintético (pTR-GPE-G6PC-S298C humana)
 <220>
 10 <221> misc_característica
 <222> (17)..(163)
 <223> Repetición terminal invertida
 <220>
 15 <221> misc_característica
 <222> (182)..(3045)
 <223> GPE
 <220>
 20 <221> misc_característica
 <222> (3051)..(3184)
 <223> Secuencia de relleno
 <220>
 25 <221> misc_característica
 <222> (3185)..(3321)
 <223> Intrón
 <220>
 30 <221> misc_característica
 <222> (3322)..(3367)
 <223> Secuencia de relleno
 <220>
 35 <221> misc_característica
 <222> (3368)..(4441)
 <223> secuencia codificante de G6PC S298C humana
 <220>
 40 <221> misc_característica
 <222> (4259)..(4261)
 <223> Cambio de codón
 <220>
 45 <221> misc_característica
 <222> (4674)..(4819)
 <223> Repetición terminal invertida
 <400> 4
 50
 55
 60
 65

ES 2 824 829 T3

	gggggggggg gggggggggt ggccactccc tctctcgcg ctcgctcgct cactgaggcc	60
	gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc ttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga	120
5	gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt cctagatctg aattcggtag	180
	ccctttgaga atccacggtg tctcgatgca gtcagctttc taacaagctg gggcctcacc	240
	tgttttccca cggataaaaa cgtgctggag gaagcagaaa ggggctggca ggtggaaaga	300
10	tgaggaccag ctcatcgtct catgactatg aggttgctct gatccagagg gtccccctgc	360
	ctggtggccc accgccagga agactcccac tgtccctgga tgcccagagt gggatgtcaa	420
	ctccatcact tatcaactcc ttatccatag gggatttctt cctgaggcgt ctcaaaaaac	480
15	agggccctcc ccatatgctg accacataat agaaccctc ccaactcaga gaccctggct	540
	gctagctgcc ctggcatgac ccagacagtg gcctttgtat atgttttttag actcaccttg	600
	actcacctct gaccatagaa actctcatcc cagaggtcac tgcaatagtt actccacaac	660
20	agaggcttat ctgggtagag ggaggtctcc tacctatggc ccagcagccc tgacagtgca	720
	gatcacatat accccacgcc ccagcactgc ctgccacgca tgggcttact ttacaccac	780
	ccacagtcat caacacatta cctgctctcc aaggttaggc gtggcaggag aagtttgctt	840
25	ggaccagcag aaaccatgca gtcaaggaca actggagtca gcatgggctg ggtgcgagcc	900
	cttggtgggg tggggaggag actccaggtc atacctctg gaggatgttt taatcatttc	960
	cagcatggaa tgctgtcaac ttttgccaca gattcattag ctctgagttt cttttttctg	1020
30	tccccagcta ccccttacat gtcaatatgg acttaatgat gggaaattca ggcaagtttt	1080
	taaacatttt attccccctg gctcttatcc tcaaaaaatg catgaatttg gaggcagtgg	1140
35	ctcatgcctg taatcccaat gctttgctag gttgaggcgg gaggatcact tgaagccagg	1200
	aatttgagac cagcctgggc cgcatagtga gaccccgttt ctacaaaaat aaataaataa	1260
	ataataaata atagtgatat gaagcatgat taaatagccc tatttttttaa aatgcatgag	1320
40	ttcgttacct gattcattcc ctggttcctt tcacagtcct ccgtgaccca agtggttaggg	1380
	ttttggtctc tctactatct gtagctgat atatagtata cacacacaca cacacacaca	1440
	tatacacaca cacagtgtat cttgagcttt cttttgtata tctacacaca tatgtataag	1500
45	aaagctcaag atatagaagc cctttttcaa aaataactga aagtttcaa ctctttaagt	1560
	ctccagttac cattttgctg gtattcttat ttggaacct acattcatca tattgttgca	1620
	cagtaagact atacattcat tattttgctt aaacgtatga gttaaaaacac ttggccaggc	1680
50	atggtgggtc acacctgtaa tcccagagct ttgggaagcc aagactggca gatctcttga	1740
	gctcaggaat tcaagaccag cctgggcaac atggaaaaac cccatctcta caaaagatag	1800
	aaaaattagc caggcatggg ggcgtgtgcc tgtggtccca gctactcagg aggctgaggt	1860
55	gggaggatca cattagccca ggaggttgag gctgcagtga gccgtgatta tgccactgca	1920
60		
65		

ES 2 824 829 T3

	ctccagcctg	ggagacagag	tgagaccctg	tttcaaaaaa	aagagagaga	aaatttaaaa	1980
	aagaaaacaa	caccaagggc	tgtaacttta	aggtcattaa	atgaattaat	cactgcattc	2040
5	aaaaacgatt	actttctggc	cctaagagac	atgaggccaa	taccaggaag	ggggttgatc	2100
	tcccaaacca	gaggcagacc	ctagactcta	atacagttaa	ggaaagacca	gcaagatgat	2160
	agtccccaat	acaatagaag	ttactatatt	ttatttgttg	tttttctttt	gttttgtttt	2220
10	gttttgtttt	gttttgtttt	agagactggg	gtcttgctcg	attgcccagg	ctgtagtgca	2280
	gcggtgggac	aatagctcac	tgcagactcc	aactcctggg	ctcaagcaat	cctcctgcct	2340
	cagcctcctg	aatagctggg	actacaaggg	tacaccatca	cacacaccaa	aacaattttt	2400
15	taaatttttg	tgtagaaacg	agggctctgc	tttggtgccc	aggctggtct	ccaactcctg	2460
	gcttcaaggg	atcctcccac	ctcagcctcc	caaattgctg	ggattacagg	tgtgagccac	2520
	cacaaccagc	cagaacttta	ctaattttta	aattaagaac	ttaaaaacttg	aatagctaga	2580
20	gcaccaagat	ttttctttgt	ccccaaataa	gtgcagttgc	aggcatagaa	aatctgacat	2640
	ctttgcaaga	atcatcgttg	atgtagactc	tgtcctgtgt	ctctggcctg	gtttcgggga	2700
25	ccaggagggc	agacccttgc	actgccaaag	agcatgccaa	agttaatcat	tggccctgct	2760
	gagtacatgg	ccgatcaggc	tgtttttgtg	tgctgttttt	tctattttac	gtaaatcacc	2820
	ctgaacatgt	ttgcatcaac	ctactggtga	tgcacctttg	atcaatacat	tttagacaaa	2880
30	cgtgggtttt	gagtccaaag	atcaggggctg	ggttgacctg	aatactggat	acagggcata	2940
	taaaacaggg	gcaaggcaca	gactcatagc	agagcaatca	ccaccaagcc	tggaataact	3000
	gcaagggctc	tgctgacatc	ttcctgaggt	gccaaaggaa	tgaggtctag	agaagcttta	3060
35	ttgcggtagt	ttatcacagt	taaattgcta	acgcagtcag	tgcttctgac	acaacagtct	3120
	cgaacttaag	ctgcagtgac	tctcttaagg	tagccttgca	gaagttggtc	gtgaggcact	3180
	gggcaggtaa	gtatcaaggt	tacaagacag	gtttaaggag	accaatagaa	actgggcttg	3240
40	tcgagacaga	gaagactctt	gcgtttctga	taggcacctc	ttggtcttac	tgacatccac	3300
	tttgcctttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	acagctctta	aggccctgca	3360
45	ggccaccatg	gaggaaggaa	tgaatgttct	ccatgacttt	gggatccagt	caacacatta	3420
	cctccaggtg	aattaccaag	actcccagga	ctggttcac	ttggtgtccg	tgatcgcaga	3480
	cctcaggaat	gccttctacg	tcctcttccc	catctggttc	catcttcagg	aagctgtggg	3540
50	cattaaactc	ctttgggtag	ctgtgattgg	agactggctc	aacctcgtct	ttaagtggat	3600
	tctctttgga	cagcgtccat	actggtggtt	tttgataact	gactactaca	gcaacacttc	3660
	cgtgcccttg	ataaagcagt	tcctgtaac	ctgtgagact	ggaccaggga	gcccctctgg	3720
55	ccatgccatg	ggcacagcag	gtgtatacta	cgtgatggtc	acatctactc	tttccatctt	3780
60							
65							

ES 2 824 829 T3

	tcagggaaag ataaagccga cctacagatt tcggtgcttg aatgtcattt tgtgggtggg	3840
	attctgggct gtgcagctga atgtctgtct gtcacgaatc taccttgctg ctcatcttcc	3900
5	tcatcaagtt gttgctggag tcctgtcagg cattgctggt gcagaaactt tcagccacat	3960
	ccacagcatc tataatgccg gcctcaagaa atattttctc attaccttct tcctgttcag	4020
	cttcgccatc ggattttatc tgctgctcaa gggactgggt gtagacctcc tgtggactct	4080
10	ggagaaagcc cagaggtggg gcgagcagcc agaatgggtc cacattgaca ccacaccctt	4140
	tgccagcctc ctcaagaacc tgggcacgct ctttggcctg gggctggctc tcaactccag	4200
	catgtacagg gagagctgca aggggaaact cagcaagtgg ctcccattcc gcctcagctg	4260
15	cattgtagcc tcctcgtcc tcctgcacgt ctttgactcc ttgaaacccc catcccaagt	4320
	cgagctggtc ttctacgtct tgtccttctg caagagtgcg gtagtgcccc tggcatccgt	4380
	cagtgtcatc ccctactgcc tcgcccaggt cctgggccag ccgcacaaga agtcgttgta	4440
20	agcggccgcg gggatccaga catgataaga tacattgatg agtttgaca aaccacaact	4500
	agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta	4560
	accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag	4620
25	gttcaggggg aggtgtggga ggttttttag tcgaccatgc tggggagaga tctaggaacc	4680
	cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgtctgc tcgctcactg aggcgcgcgc	4740
	ggcaaagccc gggcgctcgg cgacctttgg tcgcccggcc tcagtgcgcg agcgagcgcg	4800
30	cagagaggga gtggccaacc ccccccccc ccccttgca gccctgcatt aatgaatcgg	4860
	ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tgggcgtctc tccgcttctc cgtcactga	4920
35	ctcgtgcgc tcggtcgttc ggtgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat	4980
	acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca	5040
	aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt ttccataggg tccgcccccc	5100
40	tgacgagcat caaaaaatc gacgtcgaag tcagaggtgg cgaaaccgga caggactata	5160
	aagataaccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc	5220
	gcttacccga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc	5280
45	acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	5340
	acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	5400
	ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag	5460
50	gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag	5520
	gacagtatct ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag	5580
	ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca	5640
55	gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	5700
60		
65		

ES 2 824 829 T3

	cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gatttttggtc atgagattat caaaaaggat	5760
	cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga	5820
5	gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg	5880
	tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga	5940
	gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc	6000
10	agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac	6060
	tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagtccgcc	6120
	agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc	6180
15	gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc	6240
	catgttggtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttggtca gaagtaagtt	6300
20	ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc	6360
	atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg	6420
	tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataatacgg cgccacatag	6480
25	cagaacttta aaagtgtcga tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat	6540
	cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc	6600
	atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa	6660
30	aaaggggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta	6720
	ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa	6780
	aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga	6840
35	aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc ctttctgtct	6900
	cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccg agacggtcac	6960
40	agcttgctctg taagcggatg cggggagcag acaagcccg cagggcgcggt cagcgggtgt	7020
	tggcgggtgt cggggtggc ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca	7080
	ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggaaatt	7140
45	gtaaacgtta atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcatTTTTT	7200
	aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg	7260
	ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc	7320
50	aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaata	7380
	agtttttttg ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaatacga accctaaagg gagccccga	7440
	tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaaggga gaaagcgaaa	7500
55	ggagcgggag ctaggcggtt ggcaagtgtg gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc	7560
	gccgcgctta atgcgccgct acagggcgcg tcgcgccatt cgccattcag gctacgcaac	7620
60	tgttgggaag ggcgatcggg cggggcctct tcgctattac gccaggctgc a	7671

65

5	<p><210> 5 <211> 7671 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
10	<p><220> <223> Constructo sintético (pTR-GPE-co-G6PC-S298C)</p> <p><220> <221> misc_característica <222> (17)..(163) <223> Repetición terminal invertida</p>	
15	<p><220> <221> misc_característica <222> (182)..(3045) <223> GPE</p>	
20	<p><220> <221> misc_característica <222> (3051)..(3184) <223> Secuencia de relleno</p>	
25	<p><220> <221> misc_característica <222> (3185)..(3321) <223> Intrón</p>	
30	<p><220> <221> misc_característica <222> (3322)..(3367) <223> Secuencia de relleno</p>	
35	<p><220> <221> misc_característica <222> (3368)..(4441) <223> secuencia codificante de G6PC humana optimizada en codón</p>	
40	<p><220> <221> misc_característica <222> (4259)..(4261) <223> Cambio de codón</p>	
45	<p><220> <221> misc_característica <222> (4674)..(4819) <223> Repetición terminal invertida</p>	
50	<p><400> 5</p> <p> gggggggggg gggggggggtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc 60 gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga 120 gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actagggggtt cctagatctg aattcggtac 180 ccctttgaga atccacggtg tctcgatgca gtcagctttc taacaagctg gggcctcacc 240 </p>	
60		
65		

ES 2 824 829 T3

	tgttttccca	cggataaaaa	cgtgctggag	gaagcagaaa	ggggctggca	ggtggaaga	300
	tgaggaccag	ctcatcgtct	catgactatg	aggttgctct	gatccagagg	gtccccctgc	360
5	ctggtggccc	accgccagga	agactccac	tgtccctgga	tgccagagt	gggatgtcaa	420
	ctccatcact	tatcaactcc	ttatccatag	gggtattctt	cctgaggcgt	ctcagaaaac	480
	agggccctcc	ccatatgctg	accacataat	agaaccctc	ccaactcaga	gaccctggct	540
10	gctagctgcc	ctggcatgac	ccagacagtg	gcctttgtat	atgtttttag	actcaccttg	600
	actcacctct	gaccatagaa	actctcatcc	cagaggtcac	tgcaatagtt	actccacaac	660
	agaggcttat	ctgggtagag	ggaggctccc	tacctatggc	ccagcagccc	tgacagtgca	720
15	gatcacatat	accccacgcc	ccagcactgc	ctgccacgca	tgggcttact	ttacaccac	780
	ccacagtcac	caacacatta	cctgctctcc	aaggttaggc	gtggcaggag	aagtttgctt	840
	ggaccagcag	aaaccatgca	gtcaaggaca	actggagtca	gcatgggctg	ggtgcgagcc	900
20	cttggtgggg	tggggaggag	actccaggtc	atacctcctg	gaggatgttt	taatcatttc	960
	cagcatggaa	tgctgtcaac	ttttgccaca	gattcattag	ctctgagttt	cttttttctg	1020
	tccccagcta	ccccttacat	gtcaatatgg	acttaatgat	gggaaattca	ggcaagtttt	1080
25	taaacatttt	attccccctg	gctcttatcc	tcaaaaaatg	catgaatttg	gaggcagtgg	1140
	ctcatgcctg	taatcccaat	gctttgctag	gttgaggcgg	gaggatcact	tgaagccagg	1200
	aatttgagac	cagcctgggc	cgcatagtga	gaccccgttt	ctacaaaaat	aaataaataa	1260
30	ataataaata	atagtgatat	gaagcatgat	taaatagccc	tattttttta	aatgcatgag	1320
	ttcgttacct	gattcattcc	ctggttcctt	tcacagtcct	ccgtgaccca	agtgttaggg	1380
	ttttggtctc	tctactattt	gtaggctgat	atatagtata	cacacacaca	cacacacaca	1440
35	tatacacaca	cacagtgtat	cttgagcttt	cttttgtata	tctacacaca	tatgtataag	1500
	aaagctcaag	atatagaagc	cctttttcaa	aaataactga	aagtttcaaa	ctctttaagt	1560
	ctccagttac	cattttgctg	gtattcttat	ttggaaccat	acattcatca	tattgttgca	1620
40	cagtaagact	atacattcat	tattttgctt	aaacgtatga	gttaaaacac	ttggccaggc	1680
	atggtggttc	acacctgtaa	tcccagagct	ttggaagcc	aagactggca	gatctcttga	1740
45	gctcaggaat	tcaagaccag	cctgggcaac	atggaaaaac	cccatctcta	caaaagatag	1800
	aaaaattagc	caggcatggg	ggcgtgtgcc	tgtggtccca	gctactcagg	aggctgaggt	1860
	gggaggatca	cattagccca	ggagggttag	gctgcagtga	gccgtgatta	tgccactgca	1920
50	ctccagcctg	ggagacagag	tgagaccctg	tttcaaaaaa	aagagagaga	aaatttaaaa	1980
	aagaaaacaa	caccaagggc	tgtaacttta	aggtcattaa	atgaattaat	cactgcattc	2040
	aaaaacgatt	actttctggc	cctaagagac	atgaggccaa	taccaggaag	ggggttgatc	2100
55	tcccaaacca	gaggcagacc	ctagactcta	atacagttta	ggaaagacca	gcaagatgat	2160
60							
65							

ES 2 824 829 T3

	agcccccaat acaatagaag ttactatatt ttatttggtg tttttctttt gttttgtttt	2220
	gttttgtttt gttttgtttt agagactggg gtcttgctcg attgcccagg ctgtagtgca	2280
5	gcggtgggac aatagctcac tgcagactcc aactcctggg ctcaagcaat cctcctgcct	2340
	cagcctcctg aatagctggg actacaaggg tacaccatca cacacaccaa aacaattttt	2400
	taaatttttg tgtagaaacg agggctcttg tttgttgccc aggctggtct ccaactcctg	2460
10	gcttcaaggg atcctccac ctcagcctcc caaattgctg ggattacagg tgtgagccac	2520
	cacaaccagc cagaacttta ctaattttaa aattaagaac ttaaaacttg aatagctaga	2580
	gcaccaagat ttttctttgt ccccaaataa gtgcagttgc aggcatagaa aatctgacat	2640
15	ctttgcaaga atcatcgtgg atgtagactc tgtcctgtgt ctctggcctg gtttcgggga	2700
	ccaggagggc agacccttgc actgccaaga agcatgccaa agttaatcat tggccctgct	2760
	gagtacatgg ccgatcaggc tgtttttgtg tgcctgtttt tctattttac gtaaaccacc	2820
20	ctgaacatgt ttgcatcaac ctactggtga tgcaccttg atcaatacat tttagacaaa	2880
	cgtgggtttt gagtccaaag atcagggtg ggttgacctg aatactggat acagggcata	2940
	taaaacaggg gcaaggcaca gactcatagc agagcaatca ccaccaagcc tggaataact	3000
25	gcaagggctc tgctgacatc ttcctgaggt gccaaaggaa tgaggtctag agaagcttta	3060
	ttgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag tgcttctgac acaacagtct	3120
30	cgaacttaag ctgcagtgac tctcttaagg tagccttgca gaagttggtc gtgaggcact	3180
	gggcaggtaa gtatcaaggc tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg	3240
	tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcacctt ttggtcttac tgacatccac	3300
35	tttgcccttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta aggccctgca	3360
	ggccaccatg gaagagggca tgaacgtgct gcacgacttc ggcacccaga gcaaccacta	3420
	tctgcaggtc aactaccagg acagccagga ctgggtcatc ctggtgtccg tgatcgccga	3480
40	cctgcggaac gccttctacg tgctgttccc catctggttc catctgcaag aagccgtcgg	3540
	catcaagctg ctgtgggtgg ccgtgatcgg cgattggctg aacctggtgt tcaagtggat	3600
	cctgttcggc cagcggccct attggtgggt gctggacacc gactactaca gcaaccaccg	3660
45	cgtgccctg atcaagcagt tccccgtgac ctgcgagaca ggcctggct ctccttctgg	3720
	ccacgccatg ggaacagccg gcgtgtacta cgtgatggc accagcacc tgagcatctt	3780
	ccagggcaag atcaagccca cctaccggtt ccggtgcctg aacgtgatcc tgtggctggg	3840
	cttctgggcc gtgcagctga acgtgtgcct gagccggatc tacctggccg cccacttccc	3900
	acatcaagtg gtggccggcg tgctgagcgg aatcgccgtg gccgagacat tcagccacat	3960
55	ccacagcatc tacaacgccg gcctgaagaa gtacttcctg atcacattct ttctgttcag	4020
60		
65		

ES 2 824 829 T3

	cttcgccatc	ggcttctacc	tgctgctgaa	gggcctgggc	gtggacctgc	tgtggaccct	4080
	ggaaaaggcc	cagcgggtgt	gcgagcagcc	cgagtgggtg	cacatcgaca	ccacccccct	4140
5	cgccagcctg	ctgaagaacc	tgggcaccct	gtttggactg	ggcctggccc	tgaacagcag	4200
	catgtacaga	gagagctgca	agggcaagct	gagcaagtgg	ctgcccttcc	ggctgagctg	4260
	catcgtggcc	agcctggtgc	tgctgcacgt	gttcgacagc	ctgaagcccc	ccagccaggt	4320
10	ggaactgggtg	ttttacgtgc	tgagcttctg	caagagcgcc	gtggtgcccc	tggcctccgt	4380
	gtctgtgatc	ccctactgcc	tggctcaggt	gctgggccag	ccccacaaga	agtcctctctg	4440
	agcggcccg	gggatccaga	catgataaga	tacattgatg	agtttggaca	aaccacaact	4500
15	agaatgcagt	gaaaaaaatg	ctttatttgt	gaaatttgtg	atgctattgc	tttatttcta	4560
	accattataa	gctgcaataa	acaagttaac	aacaacaatt	gcattcattt	tatgtttcag	4620
	gttcaggggg	aggtgtggga	ggttttttag	tcgaccatgc	tggggagaga	tctaggaacc	4680
20	cctagtgatg	gagttggcca	ctccctctct	gcgcgctcgc	tcgctcactg	aggccgcccg	4740
	ggcaaagccc	gggcgtcggg	cgaccttttg	tcgcccggcc	tcagtgcgag	agcgagcgcg	4800
	cagagaggga	gtggccaacc	cccccccccc	ccccctgca	gccctgcatt	aatgaatcgg	4860
25	ccaacgcgcg	gggagaggcg	gtttgcgtat	tgggcgctct	tccgcttccct	cgctcactga	4920
	ctcgctgcgc	tcggtcgttc	ggctgcggcg	agcggatatca	gctcactcaa	aggcggtaat	4980
	acggttatcc	acagaatcag	gggataacgc	aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	5040
30	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	gctggcggtt	ttccataggc	tccgcccccc	5100
	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	tcagaggtgg	cgaaacccga	caggactata	5160
	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgacctgcc	5220
35	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	ttcggaagc	gtggcgcttt	ctcaatgctc	5280
	acgctgtagg	tatctcagtt	cggtgtaggt	cgttcgctcc	aagctgggct	gtgtgcacga	5340
	accccccggt	cagcccgacc	gctgcgcctt	atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	5400
40	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	agccactggt	aacaggatta	gcagagcgag	5460
	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	5520
45	gacagtatct	ggtatctgcg	ctctgctgaa	gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	5580
	ctcttgatcc	ggcaaaaaaa	ccaccgctgg	tagcgggtgg	ttttttgttt	gcaagcagca	5640
	gattacgcgc	agaaaaaaaag	gatctcaaga	agatcccttg	atcttttcta	cggggtctga	5700
50	cgctcagtg	aacgaaaact	cacgttaagg	gattttggtc	atgagattat	caaaaaggat	5760
	cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	5820
	gtaaaacttg	tctgacagtt	accaatgctt	aatcagtgag	gcacctatct	cagcgatctg	5880
55	tctatttcgt	tcatccatag	ttgcctgact	ccccgctgtg	tagataacta	cgatacggga	5940
60							
65							

ES 2 824 829 T3

	gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct caccggctcc	6000
	agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac	6060
5	tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc	6120
	agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cagctcgtc	6180
	gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc	6240
10	catgtttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt	6300
	ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc	6360
	atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagt	6420
15	tatgcccgcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag	6480
	cagaacttta aaagtgtca tcattgaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat	6540
20	cttaccgctg ttgagatcca gttcgaatga acccactcgt gcacccaact gatcttcagc	6600
	atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa	6660
	aaaggggaata agggcgacac ggaaatgtg aataactcata ctcttccttt ttcaatatta	6720
25	ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa	6780
	aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga	6840
	aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct	6900
30	cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac	6960
	agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgctg cagcgggtgt	7020
	tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtga	7080
35	ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggaaatt	7140
	gtaaacgtta atattttgtt aaaattcgcg ttaaatTTTT gttaaatacag ctcatTTTT	7200
	aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagatagg	7260
40	ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc	7320
	aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaata	7380
45	agtttttttg ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaatacga accctaagag gagccccga	7440
	tttagagctt gacggggaaa gccggcgaaac gtggcgagaa aggaaggga gaaagcgaaa	7500
	ggagcgggcg ctaggcgct ggcaagtgtg gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacacc	7560
50	gccgcgctta atgcgcgct acagggcgcg tcgcgccatt cgccattcag gctacgcaac	7620
	tgttgggaag ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac gccaggctgc a	7671

55 <210> 6
 <211> 1074
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 6

65

ES 2 824 829 T3

	atggaggaag gaatgaatgt tctccatgac tttgggatcc agtcaacaca ttacctccag	60
	gtgaattacc aagactccca ggactggttc atcttgggtgt ccgtgatcgc agacctcagg	120
5	aatgccttct acgtcctctt ccccatctgg ttccatcttc aggaagctgt gggcattaaa	180
	ctcctttggg tagctgtgat tggagactgg ctcaacctcg tctttaagtg gattctcttt	240
	ggacagcgtc catactggtg ggttttggat actgactact acagcaacac ttccgtgccc	300
10	ctgataaagc agttccctgt aacctgtgag actggaccag ggagcccctc tggccatgcc	360
	atgggcacag caggtgtata ctacgtgatg gtcacatcta ctctttccat ctttcaggga	420
	aagataaagc cgacctacag atttcggtgc ttgaatgtca ttttgtggtt gggattctgg	480
15	gctgtgcagc tgaatgtctg tctgtcacga atctaccttg ctgctcattt tcctcatcaa	540
	gttgttgctg gagtccctgc aggcattgct gttgcagaaa ctttcagcca catccacagc	600
20	atctataatg ccagcctcaa gaaatatttt ctcatcact tcttcctggt cagcttcgcc	660
	atcggatttt atctgctgct caagggactg ggtgtagacc tcctgtggac tctggagaaa	720
	gccagaggt ggtgcgagca gccagaatgg gtccacattg acaccacacc ctttgccagc	780
25	ctcctcaaga acctgggcac gctctttggc ctggggctgg ctctcaactc cagcatgtac	840
	agggagagct gcaaggggaa actcagcaag tggtcccat tccgcctcag ctgcattgta	900
	gcctccctcg tcctcctgca cgtctttgac tccttgaaac ccccatccca agtcgagctg	960
30	gtcttctacg tcttgtcctt ctgcaagagt gcggtagtgc ccctggcatc cgtcagtgtc	1020
	atcccctact gcctcgccca ggtcctgggc cagccgcaca agaagtcggt gtaa	1074

35 <210> 7
 <211> 1074
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Polinucleótido sintético

<400> 7

45	atggaagagg gcatgaacgt gctgcacgac ttcggcatcc agagcaccca ctatctgcag	60
	gtcaactacc aggacagcca ggactggttc atcctgggtgt ccgtgatcgc cgacctgcgg	120
	aacgccttct acgtgctggt ccccatctgg ttccatctgc aagaagccgt cggcatcaag	180
50	ctgctgtggg tggccgtgat cggcgattgg ctgaacctgg tgttcaagtg gatcctgttc	240
	ggccagcggc cctattggtg ggtgctggac accgactact acagcaacac cagcgtgccc	300
	ctgatcaagc agttccccgt gacctgcgag acaggccctg gctctccttc tggccacgcc	360

55

60

65

ES 2 824 829 T3

atgggaacag ccggcggtgta ctacgtgatg gtcaccagca ccctgagcat cttccagggc 420
 aagatcaagc ccacctaccg gttccggtgc ctgaacgtga tcctgtggct gggcttctgg 480
 5 gccgtgcagc tgaacgtgtg cctgagccgg atctacctgg ccgcccactt cccacatcaa 540
 gtggtggccg gcgtgctgag cggaatcgcc gtggccgaga cattcagcca catccacagc 600
 atctacaacg ccagcctgaa gaagtacttc ctgatcacat tctttctgtt cagcttcgcc 660
 10 atcggcttct acctgctgct gaagggcctg ggcgtggacc tgctgtggac cctggaaaag 720
 gcccagcggg ggtgagcagc gcccgagtgg gtgcacatcg acaccacccc cttcgccagc 780
 ctgctgaaga acctgggcac cctgtttgga ctgggcctgg ccctgaacag cagcatgtac 840
 15 agagagagct gcaagggcaa gctgagcaag tggtgtccct tccggctgag ctgcatcgtg 900
 gccagcctgg tgctgctgca cgtgttcgac agcctgaagc cccccagcca ggtggaactg 960
 20 gtgttttacg tgctgagctt ctgcaagagc gccgtggtgc ccctggcctc cgtgtctgtg 1020
 atcccctact gcctggctca ggtgctgggc cagccccaca agaagtcctt ctga 1074

<210> 8
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Polipéptido sintético
 <400> 8

35 Met Glu Glu Gly Met Asn Val Leu His Asp Phe Gly Ile Gln Ser Thr
 1 5 10 15
 His Tyr Leu Gln Val Asn Tyr Gln Asp Ser Gln Asp Trp Phe Ile Leu
 20 25 30
 40 Val Ser Val Ile Ala Asp Leu Arg Asn Ala Phe Tyr Val Leu Phe Pro
 35 40 45
 45 Ile Trp Phe His Leu Gln Glu Ala Val Gly Ile Lys Leu Leu Trp Val
 50 55 60
 50 Ala Val Ile Gly Asp Trp Leu Asn Leu Val Phe Lys Trp Ile Leu Phe
 65 70 75 80
 Gly Gln Arg Pro Tyr Trp Trp Val Leu Asp Thr Asp Tyr Tyr Ser Asn
 85 90 95
 55 Thr Ser Val Pro Leu Ile Lys Gln Phe Pro Val Thr Cys Glu Thr Gly
 100 105 110

60

65

ES 2 824 829 T3

	Pro Gly Ser Pro Ser Gly His Ala Met Gly Thr Ala Gly Val Tyr Tyr	115	120	125
5	Val Met Val Thr Ser Thr Leu Ser Ile Phe Gln Gly Lys Ile Lys Pro	130	135	140
10	Thr Tyr Arg Phe Arg Cys Leu Asn Val Ile Leu Trp Leu Gly Phe Trp	145	150	155
	Ala Val Gln Leu Asn Val Cys Leu Ser Arg Ile Tyr Leu Ala Ala His	165	170	175
15	Phe Pro His Gln Val Val Ala Gly Val Leu Ser Gly Ile Ala Val Ala	180	185	190
20	Glu Thr Phe Ser His Ile His Ser Ile Tyr Asn Ala Ser Leu Lys Lys	195	200	205
25	Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Phe Leu Phe Ser Phe Ala Ile Gly Phe Tyr	210	215	220
	Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Val Asp Leu Leu Trp Thr Leu Glu Lys	225	230	235
30	Ala Gln Arg Trp Cys Glu Gln Pro Glu Trp Val His Ile Asp Thr Thr	245	250	255
35	Pro Phe Ala Ser Leu Leu Lys Asn Leu Gly Thr Leu Phe Gly Leu Gly	260	265	270
	Leu Ala Leu Asn Ser Ser Met Tyr Arg Glu Ser Cys Lys Gly Lys Leu	275	280	285
40	Ser Lys Trp Leu Pro Phe Arg Leu Ser Cys Ile Val Ala Ser Leu Val	290	295	300
45	Leu Leu His Val Phe Asp Ser Leu Lys Pro Pro Ser Gln Val Glu Leu	305	310	315
	Val Phe Tyr Val Leu Ser Phe Cys Lys Ser Ala Val Val Pro Leu Ala	325	330	335
50	Ser Val Ser Val Ile Pro Tyr Cys Leu Ala Gln Val Leu Gly Gln Pro	340	345	350
55	His Lys Lys Ser Leu	355		
60	<210> 9 <211> 357 <212> PRT <213> Secuencia artificial			
65	<220> <223> Polipéptido sintético			
	<400> 9			

ES 2 824 829 T3

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

ES 2 824 829 T3

	Tyr	Phe	Leu	Ile	Thr	Phe	Phe	Leu	Phe	Ser	Phe	Ala	Ile	Gly	Phe	Tyr
	210					215						220				
5	Leu	Leu	Leu	Lys	Gly	Leu	Gly	Val	Asp	Leu	Leu	Trp	Thr	Leu	Glu	Lys
	225					230					235					240
10	Ala	Gln	Arg	Trp	Cys	Glu	Gln	Pro	Glu	Trp	Val	His	Ile	Asp	Thr	Thr
					245					250					255	
15	Pro	Phe	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Asn	Leu	Gly	Thr	Leu	Phe	Gly	Leu	Gly
				260					265					270		
20	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Ser	Met	Tyr	Arg	Glu	Ser	Cys	Lys	Gly	Lys	Leu
		275						280					285			
25	Ser	Lys	Trp	Leu	Pro	Phe	Arg	Leu	Ser	Cys	Ile	Val	Val	Ser	Leu	Val
	290						295					300				
30	Leu	Leu	His	Val	Phe	Asp	Ser	Leu	Lys	Pro	Pro	Ser	Gln	Val	Glu	Leu
	305					310				315						320
35	Val	Phe	Tyr	Val	Leu	Ser	Phe	Cys	Lys	Ser	Ala	Val	Val	Pro	Leu	Ala
					325					330					335	
40	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Tyr	Cys	Leu	Ala	Gln	Val	Leu	Gly	Gln	Pro
				340					345					350		
45	His	Lys	Lys	Ser	Leu											
			355													
50	<210> 10															
	<211> 357															
55	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
60	<220>															
	<223> Polipéptido sintético															
65	<220>															
	<221> misc_característica															
	<222> (3)..(3)															
	<223> Xaa = Lys o Glu															
70	<220>															
	<221> misc_característica															
	<222> (54)..(54)															
	<223> Xaa = Arg o Gln															
75	<220>															
	<221> misc_característica															
	<222> (139)..(139)															
	<223> Xaa = Arg o Gln															
80	<220>															
	<221> misc_característica															
	<222> (142)..(142)															
	<223> Xaa = Lys o Ile															
85	<220>															

	<221> misc_característica
	<222> (196)..(196)
	<223> Xaa = Arg o Ser
5	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (199)..(199)
	<223> Xaa = Gln o His
10	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (242)..(242)
	<223> Xaa = Arg o Gln
15	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (247)..(247)
	<223> Xaa = Arg o Gln
20	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (292)..(292)
	<223> Xaa = Phe o Leu
25	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (298)..(298)
	<223> Xaa = Cys o Ser
30	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (301)..(301)
	<223> Xaa = Val o Ala
35	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (318)..(318)
	<223> Xaa = Thr o Val
40	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (324)..(324)
	<223> Xaa = Thr o Val
45	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (332)..(332)
	<223> Xaa = Ala o Val
50	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (347)..(347)
	<223> Xaa = Arg o Gln
55	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (349)..(349)
	<223> Xaa = Phe o Leu
60	<220>
	<221> misc_característica
	<222> (350)..(350)
	<223> Xaa = Asp o Gly
65	<220>
	<221> misc_característica

ES 2 824 829 T3

<222> (353)..(353)

<223> Xaa = Asp o His

<400> 10

5 Met Glu Xaa Gly Met Asn Val Leu His Asp Phe Gly Ile Gln Ser Thr
1 5 10 15

10 His Tyr Leu Gln Val Asn Tyr Gln Asp Ser Gln Asp Trp Phe Ile Leu
20 25 30

15 Val Ser Val Ile Ala Asp Leu Arg Asn Ala Phe Tyr Val Leu Phe Pro
35 40 45

Ile Trp Phe His Leu Xaa Glu Ala Val Gly Ile Lys Leu Leu Trp Val
50 55 60

20 Ala Val Ile Gly Asp Trp Leu Asn Leu Val Phe Lys Trp Ile Leu Phe
65 70 75 80

25 Gly Gln Arg Pro Tyr Trp Trp Val Leu Asp Thr Asp Tyr Tyr Ser Asn
85 90 95

30 Thr Ser Val Pro Leu Ile Lys Gln Phe Pro Val Thr Cys Glu Thr Gly
100 105 110

Pro Gly Ser Pro Ser Gly His Ala Met Gly Thr Ala Gly Val Tyr Tyr
115 120 125

35 Val Met Val Thr Ser Thr Leu Ser Ile Phe Xaa Gly Lys Xaa Lys Pro
130 135 140

40 Thr Tyr Arg Phe Arg Cys Leu Asn Val Ile Leu Trp Leu Gly Phe Trp
145 150 155 160

Ala Val Gln Leu Asn Val Cys Leu Ser Arg Ile Tyr Leu Ala Ala His
165 170 175

45 Phe Pro His Gln Val Val Ala Gly Val Leu Ser Gly Ile Ala Val Ala
180 185 190

ES 2 824 829 T3

	Glu Thr Phe Xaa His Ile Xaa Ser Ile Tyr Asn Ala Ser Leu Lys Lys	
	195 200 205	
5	Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Phe Leu Phe Ser Phe Ala Ile Gly Phe Tyr	
	210 215 220	
10	Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Val Asp Leu Leu Trp Thr Leu Glu Lys	
	225 230 235	
15	Ala Xaa Arg Trp Cys Glu Xaa Pro Glu Trp Val His Ile Asp Thr Thr	
	245 250 255	
20	Pro Phe Ala Ser Leu Leu Lys Asn Leu Gly Thr Leu Phe Gly Leu Gly	
	260 265 270	
25	Leu Ala Leu Asn Ser Ser Met Tyr Arg Glu Ser Cys Lys Gly Lys Leu	
	275 280 285	
30	Ser Lys Trp Xaa Pro Phe Arg Leu Ser Xaa Ile Val Xaa Ser Leu Val	
	290 295 300	
35	Leu Leu His Val Phe Asp Ser Leu Lys Pro Pro Ser Gln Xaa Glu Leu	
	305 310 315 320	
40	Val Phe Tyr Xaa Leu Ser Phe Cys Lys Ser Ala Xaa Val Pro Leu Ala	
	325 330 335	
45	Ser Val Ser Val Ile Pro Tyr Cys Leu Ala Xaa Val Xaa Xaa Gln Pro	
	340 345 350	
50	Xaa Lys Lys Ser Leu	
	355	
55	<210> 11	
	<211> 1074	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
60	<400> 11	
65	atggaggaag gaatgaatgt tctccatgac ttggggatcc agtcaacaca ttacctccag	60
	gtgaattacc aagactccca ggactgggtc atcttggtgt ccgtgatcgc agacctcagg	120
	aatgccttct acgtcctctt ccccatctgg ttccatcttc aggaagctgt gggcattaaa	180
	ctcctttggg tagctgtgat tggagactgg ctcaacctcg tctttaagtg gattctcttt	240
	ggacagcgtc catactggtg ggttttggat actgactact acagcaacac ttccgtgccc	300
	ctgataaagc agttccctgt aacctgtgag actggaccag ggagcccctc tggccatgcc	360

ES 2 824 829 T3

	atgggcacag caggtgtata ctacgtgatg gtcacatcta ctctttccat ctttcagggg	420
	aagataaagc cgacctacag atttcggtgc ttgaatgtca ttttgtggtt gggattctgg	480
5	gctgtgcagc tgaatgtctg tctgtcacga atctaccttg ctgctcattt tcctcatcaa	540
	gttggtgctg gagtcctgtc aggcattgct gttgcagaaa ctttcagcca catccacagc	600
	atctataatg ccagcctcaa gaaatatttt ctcattacct tcttcctggt cagcttcgcc	660
10	atcggatttt atctgctgct caagggactg ggtgtagacc tcctgtggac tctggagaaa	720
	gccagaggt ggtgcgagca gccagaatgg gtccacattg acaccacacc ctttgccagc	780
	ctcctcaaga acctgggcac gctctttggc ctggggctgg ctctcaactc cagcatgtac	840
15	agggagagct gcaaggggaa actcagcaag tggtcccat tccgcctcag ctctattgta	900
	gcctccctcg tcctcctgca cgtctttgac tccttgaaac ccccatccca agtcgagctg	960
	gtcttctacg tcttgtcctt ctgcaagagt gcggtagtgc ccctggcatc cgtcagtgtc	1020
20	atcccctact gcctcgccca ggtcctgggc cagccgcaca agaagtcgtt gtaa	1074

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una glucosa-6-fosfatasa-a (G6Pasa-a) modificada, en donde la secuencia de aminoácidos de la G6Pasa-a modificada se expone como la SEQ ID NO: 2 y comprende una sustitución de serina por cisteína en el aminoácido 298.
2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de la G6Pasa-a modificada comprende o consiste en la SEQ ID NO: 8.
3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.
4. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. El vector de la reivindicación 4, en donde la molécula de ácido nucleico que codifica la G6Pasa-a modificada está unida operativamente a un promotor.
6. El vector de la reivindicación 4, en donde el promotor comprende un promotor de G6PC.
7. El vector de la reivindicación 4, en donde el promotor de G6PC comprende los nucleótidos 182-3045 de la SEQ ID NO: 4 o los nucleótidos 182-3045 de la SEQ ID NO: 5.
8. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 4-7, que comprende los nucleótidos 182-4441 de la SEQ ID NO: 4 o los nucleótidos 182-4441 de la SEQ ID NO: 5.
9. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en donde el vector es un vector de virus adenoasociado (AAV).
10. El vector de la reivindicación 9, en donde, vector de AAV es un vector de AAV de serotipo 8 (AAV8).
11. El vector de la reivindicación 9 o 10, que comprende los nucleótidos 17-4819 de la SEQ ID NO: 4 o los nucleótidos 17-4819 de la SEQ ID NO: 5.
12. Una célula huésped aislada que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el vector de cualquiera de las reivindicaciones 4-11.
13. Un AAV recombinante (rAAV) que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
14. Un rAAV de la reivindicación 13, en donde el rAAV es rAAV8.
15. Una composición que comprende el rAAV de la reivindicación 13 o 14 en un portador farmacéuticamente aceptable.
16. La composición de la reivindicación 15 formulada para administración intravenosa.
17. El rAAV de la reivindicación 13 o 14 o la composición de la reivindicación 15 o 16 para su uso en un método para tratar a un sujeto diagnosticado con una enfermedad por almacenamiento de glucógeno, que comprende seleccionar un sujeto con la enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo Ia (GSD-Ia) y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del rAAV de la reivindicación 13 o 14, o la composición de la reivindicación 15 o la reivindicación 16.
18. El rAAV de la reivindicación 13 o 14 o la composición de la reivindicación 15 o 16 para su uso en un método para promover la homeostasis de la glucosa; inhibir la hipoglucemia; inhibir o prevenir el desarrollo de adenoma hepatocelular (HCA); inhibir o prevenir el desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC); o inhibir o prevenir la disfunción o insuficiencia renal en un sujeto con una deficiencia de glucosa-6-fosfatasa-a (G6Pasa-a), que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del rAAV de la reivindicación 13 o 14, o la composición de reivindicación 15 o la reivindicación 16.
19. El rAAV o la composición para el uso de la reivindicación 18 en donde el sujeto con una deficiencia de G6Pasa-a tiene GSD-Ia.
20. El rAAV o la composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 17-19, en donde el rAAV se administra por vía intravenosa.

- 5
21. El rAAV o la composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 17-20, en donde el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{10} a aproximadamente 1×10^{14} partículas virales (vp)/kg.
 22. El rAAV o la composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 17-21, en donde la administración del rAAV comprende la administración de una dosis única de rAAV.
 23. El rAAV o la composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 17-21, en donde la administración del rAAV comprende la administración de múltiples dosis de rAAV.

Canina
Humana

Canina
Humana

Canina
Humana

Canina
HumanaCanina
HumanaCanina
Humana

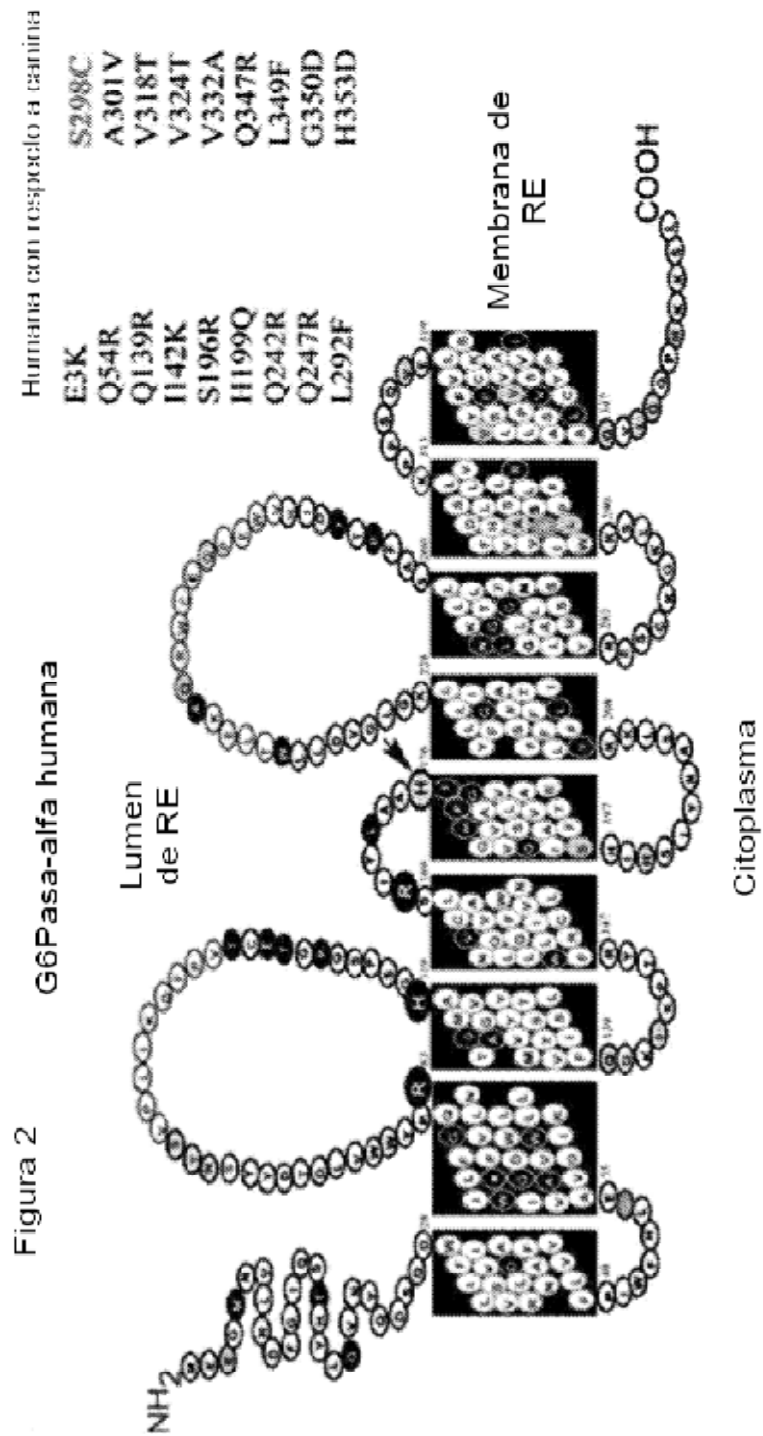


Figura 3

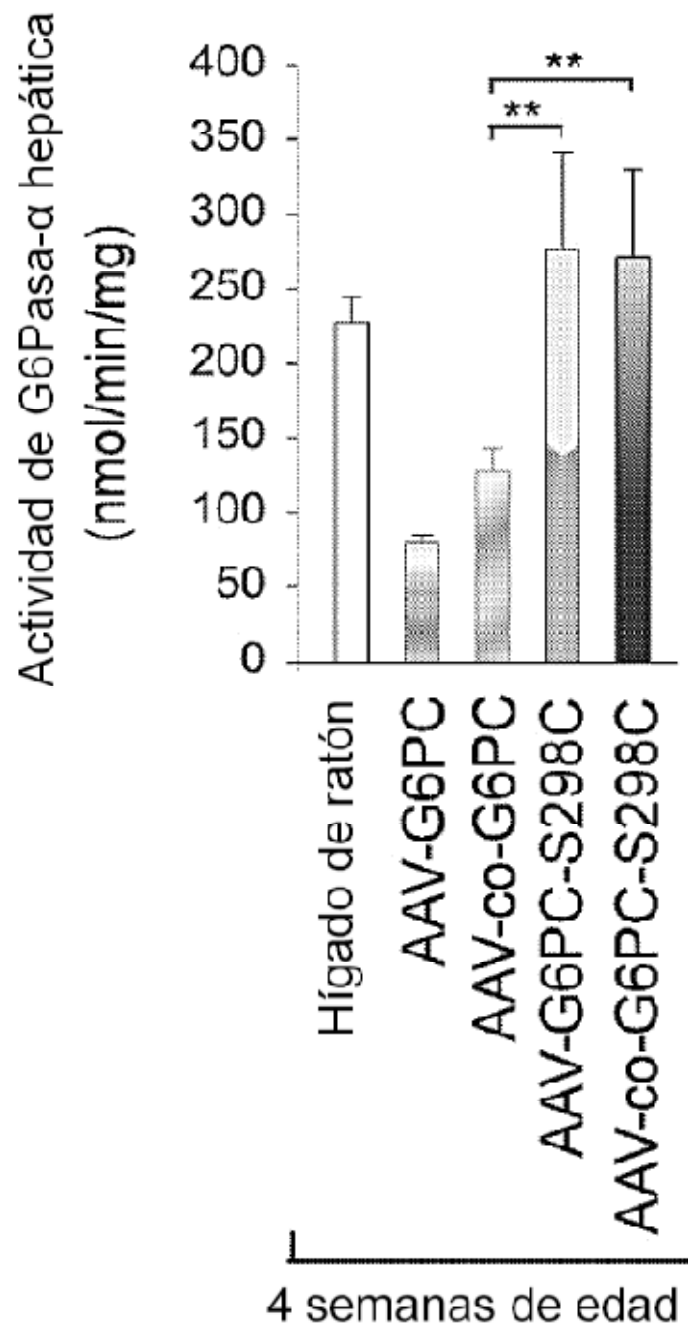


Figura 4

E3K: GAA-AAA (nt 7-9)
 ATGGAGGAGG GAATGAATGT TCTCCATGAC TTTGGGATCC ASTCAACACA TTACCTCCAG G6PC--60
 GTGAATTACC AAGACTOCCA GGACTGGTTC ATCTTGGTGT CCGTGATCGC AGACCTCAGG G6PC--120

Q54R: CAG-CGT (nt 160-162)
 AATGCCTTCT ACGTCTCTT CCCCATCTGG TTCCATCTTC AGGAAGCTGT GGGCATTAAA G6PC--180
 CTCCTTTGGG TAGCTGTGAT TGGAGACTGG CTCACCTCG TCTTTAAGTG GATTCTCTTT G6PC--240
 GGACAGCGTC CATACTGGTG GGTTTTGGAT ACTGACTACT ACAGCAACAC TTCCGTGCCC G6PC--300
 CTGATAAAGC AGTTCCCTGT AACCTGTGAG ACTGGACCAG GGAGCCCCTC TGGCCATGCC G6PC-360

Q139R: CAG-CGG (nt 415-417)
 ATGGGCACAG CAGGTGTATA CTACGTGATG GTCACATCTA CTCTTCCAT CTTTCAGGGA G6PC-420

I142K: ATA-AAA (nt 424-426)
 AAGATAAGC CGACCTACAG ATTTCGGTGC TTGAATGTCA TTTTGTGGTT GGGATTCTGG G6PC--480
 GCTGTGCAGC TGAATGTCTG TCTGTCACGA ATCTACCTTG CTGCTCATT TOCTCATCAA G6PC-540

S196R: AGC-CGC (nt 586-588) H199Q: CAC-CAG (nt 595-597)
 GTTGTGCTG GAGTCTCTG AGGCATTGCT GTTGACAGAA CTTTCAGCA CATCCTCAGC G6PC--600
 ATCTATAATG CCAGCCTCAA GAAATATTT CTCATTACCT TCTTCTCTGT CAGCTTCGCC G6PC--660
 ATCGGATTTT ATCTGCTGCT CAAGGGAAGT GGTGTAGACC TCCTGTGGAC TCTGGAGAAA G6PC-720

Q242R: CAG-AGG (nt 724-726); Q247R: CAG-CGG (nt 739-741)
 GCCCAGAGGT GGTGCGAGCA GCCAGAATGG GTCCACATTG ACACCACACC CTTTGCCAGC G6PC--780
 CTCCTCAAGA AACTGGGCAC GCTCTTTGGC CTGGGGCTGG CTCTCAACTC CAGCATGTAC G6PC-840

L292F: CTC-TTC (nt 874-876); S298C: TCT-TGC (nt 892-894)
 AGGGAGAGCT GCAAGGGGAA ACTCAGCAAG TGGCTGCCAT TCCGCCCTCAG CTCTATTGTA G6PC-900

A301V: GCC-CTG (nt 901-903) V318T: GTC-ACT (nt 952-954)
 GCTTCCCTCG TCTCTCTGCA CGTCTTTGAC TCCTTGAAAC CCCCATCCCA AGTCSAGCTG G6PC-960

V324T: GTC-ACC (nt 970-972); V332A (GTA-GCA) (nt 994-996)
 GTCTTCTACG TCTGTCTCTT CTGCAAGAGT GCGGTAGTGC CCCTGGCATC CGTCAGTGTC G6PC-1020

Q347R: CAG-CGG; L349F: CTG-TTC; G350D: GGC-GAC; H353D: CAC-GAC
 ATCCCTACT GCTCGCCCA GGTCTGGGC CAGCCGCACA AGAAGTCGTT GTAA G6PC-1074
 (SEQ ID NO: 11)

Q347R: CAG-CGG (nt 1039-1041)
L349F: CTG-TTC (nt 1045-1047)
G350D: GGC-GAC (nt 1048-1050)
H353D: CAC-GAC (nt 1057-1059)

Figura 5

