



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



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

⑮ Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2015 PCT/US2015/067338**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16106303**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2015 E 15830932 (8)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3236984**

⑭ Título: **Vectores de virus adenoasociado que codifican G6PC modificada y usos de estos**

⑩ Prioridad:

23.12.2014 US 201462096400 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.05.2021

⑬ 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**

⑭ Inventor/es:

CHOU, JANICE J.

⑭ 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- α (G6Pasa- α 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- α , 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 hipoglucemias en ayunas, retraso del crecimiento, hepatomegalia, nefromegalía, hiperlipidemia, hiperuricemia y academia láctica (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010).

Actualmente no existe cura para la GSD-Ia. La hipoglucemias 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-I 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 Inherit Metab Dis 28:153-162, 2005).

40 Aunque se han realizado previamente estudios de terapia génica mediante el uso de virus adenoasociados (AAV) recombinantes que portan G6Pasa- α en modelos animales de GSD-Ia, ninguno ha sido capaz de corregir completamente la deficiencia de G6Pasa- α 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- α canina es más activa que la enzima G6Pasa- α humana. Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las dos proteínas reveló que difieren principalmente en 18 residuos. Para identificar mutantes de G6Pasa- α humana con actividad de fosfohidrolasa aumentada, se generaron mutantes que contienen uno o dos aminoácidos correspondientes de la G6Pasa- α canina.

55 En la presente descripción se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una G6Pasa- α modificada. En algunas modalidades, la G6Pasa- α modificada comprende una sustitución de serina por cisteína en el aminoácido 298 de la G6Pasa- α humana, tal como la G6Pasa- α 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.

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

65 Se proporcionan además AAV recombinantes (rAAV) que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican la G6Pasa- α 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.

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

10 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.

15 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.

20 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.

20 Breve descripción de los dibujos

25 **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.

30 **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.

35 **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. ** $P < 0,005$.

40 **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.

45 **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. ** $P < 0,005$.

50 **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. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$.

55 Listado de secuencias

60 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:

65 **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:

5 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.

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

15 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.

20 **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:

25 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
 30 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.

35 **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.

40 **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

45 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

50	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
55	G6Pasa- α	glucosa-6-fosfatasa- α
	G6PC	glucosa-6-fosfatasa, subunidad catalítica
	G6PT	transportador de glucosa-6-fosfato
	GPE	Promotor/potenciador de G6PC
	GSD	enfermedad por almacenamiento de glucógeno
60	HCA	adenoma hepatocelular
	HCC	carcinoma hepatocelular
	ITR	repetición terminal invertida
	ORF	marco de lectura abierto
	rAAV	AAV recombinante
	SEM	error estándar de la media
65	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).

5 10 Para facilitar la revisión de las diversas modalidades de la descripción, se proporcionan las explicaciones siguientes de términos específicos:

15 **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).

20 **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.

25 **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.

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

35 **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 hipoglucemias severas en ayunas asociadas con la acumulación de glucógeno y grasa en el hígado y los riñones.

40 **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.

45 **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 hipoglucemias en ayunas, retraso del crecimiento, hepatomegalia, nefromegalía, hiperlipidemia, hiperuricemia y academia láctica (Chou y otros, Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). Actualmente no existe cura para la GSD-Ia.

50 **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.

55 **Replicación 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.

60 **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.

- 5 **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).
- 10 **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.
- 15 **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.
- 20 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.
- 25 **Prevenir, tratar o mejorar una enfermedad:** "Prevenir" una enfermedad (tal como GSD-1a) 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.
- 30 **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.
- 35 **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.
- 40 **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.
- 45 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).
- 50 **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).
- 55 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.

5 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.

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

15 **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.

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

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

30 **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.

35 **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.

40 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.

45 III. Introducción

50 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).

55 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-1a y perros GSD-1a. 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-1a 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-1a. 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-1a 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-1a 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-1a) 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-a 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-1a. 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-1a, 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-1a *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-1a.

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-1a, el hígado y el riñón son los órganos diana relevantes.

5 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.

10 15 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.

20 25 30 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.

35 Se proporcionan además métodos para tratar a un sujeto diagnosticado con una enfermedad por almacenamiento de glucógeno, que comprenden seleccionar un sujeto con GSD-1a y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un rAAV (o una composición que comprende un rAAV) descrita en la presente descripción.

40 45 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 nefromegalía; inhibir o prevenir la hiperlipidemia; inhibir o prevenir la hipertensión pulmonar; o tratar, prevenir o inhibir cualquier otra complicación asociada con GSD-1a, 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-1a. Por tanto, en algunos ejemplos, el método incluye seleccionar un sujeto con GSD-1a.

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

55 60 65 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.

65 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):

10	MEEGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDW ^F ILVSVIADLR NAFYVL ^F PIW FHLQEAVGIK	60
	LLWAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPGSPSGHA	120
	MGTAGVYYVM VTSTLSIFQG KIKPTYRFRC LNVILWLGF ^W AVQLNVCLSR IYLAAHFPHQ	180
15	VVAGVLSGIA VAETFSHHS IYNASLKKYF LITFFLFSFA IGFYLLLKGL GVDLLWTLEK	240
	AQRWCEQPEW VHIDTPFAS LLKNLGT ^L FG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WLPFRLSIV	300
	ASLVLLHVFD SLKPPSQVEL VFYVLSFCKS AVVPLASVSV IPYCLAQVLG QPHKKSL	357

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

25	MEXGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDW ^F ILVSVIADLR NAFYVL ^F PIW FHLXEAVGIK	60
	LLWAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPGSPSGHA	120
	MGTAGVYYVM VTSTLSIFXG KXKPTYRFRC LNVILWLGF ^W AVQLNVCLSR IYLAAHFPHQ	180
	VVAGVLSGIA VAETFXHHS IYNASLKKYF LITFFLFSFA IGFYLLLKGL GVDLLWTLEK	240
	AXRWCEQPEW VHIDTPFAS LLKNLGT ^L FG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WXPFRLSIV	300
30	XSLVLLHVFD SLKPPSQXEL VFYXLSFCKS AXVPLASVSV IPYCLAXVXX QPKKSL	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):

50	MEEGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDW ^F ILVSVIADLR NAFYVL ^F PIW FHLQEAVGIK	60
	LLWAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPGSPSGHA	120
	MGTAGVYYVM VTSTLSIFQG KIKPTYRFRC LNVILWLGF ^W AVQLNVCLSR IYLAAHFPHQ	180
	VVAGVLSGIA VAETFSHHS IYNASLKKYF LITFFLFSFA IGFYLLLKGL GVDLLWTLEK	240
	AQRWCEQPEW VHIDTPFAS LLKNLGT ^L FG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WLPFRLS ^{CIV}	300
55	ASLVLLHVFD SLKPPSQVEL VFYVLSFCKS AVVPLASVSV IPYCLAQVLG QPHKKSL	357

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

60	MEEGMNVLHD FGIQSTHYLQ VNYQDSQDW ^F ILVSVIADLR NAFYVL ^F PIW FHLQEAVGIK	60
	LLWAVIGDW LNLVFKWILF GQRPYWWVLD TDYYSNTSVP LIKQFPVTCE TGPGSPSGHA	120
	MGTAGVYYVM VTSTLSIFQG KIKPTYRFRC LNVILWLGF ^W AVQLNVCLSR IYLAAHFPHQ	180
	VVAGVLSGIA VAETFSHHS IYNASLKKYF LITFFLFSFA IGFYLLLKGL GVDLLWTLEK	240
	AQRWCEQPEW VHIDTPFAS LLKNLGT ^L FG LGLALNSSMY RESCKGKLSK WLPFRLS ^{CIV}	300
65	<u>V</u> SLVLLHVFD 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 ATG GAGGAAGGAA TGAATGTTCT CCATGACTT GGGATCCAGT CAACACATTA CCTCCAGGTG AATTACCAAG
 ACTCCCAGGA CTGGTTCATC TTGGTGTCCG TGATCGCAGA CCTCAGGAAT GCCTCTACG TCCTCTTCCC CATCTGGTC
 10 CATCTTCAGG AAGCTGTGGG CATTAAACTC CTTGGGTAG CTGTGATTGG AGACTGGCTC AACCTCGTCT TAAAGTGGAT
 TCTCTTGGA CAGCGTCCAT ACTGGTGGGT TTTGGATACT GACTACTACA GCAACACTC CGTGCCTCTG ATAAAGCAGT
 TCCCTGTAAAC CTGTGAGACT GGACCAAGGAA GCCCCTCTGG CCATGCCATG GGACACAGAG GTGTATACTA CGTGATGGTC
 ACATCTACTC TTTCCATCTT TCAGGGAAAG ATAAAGCGA CCTACAGATT TCGGTGCTTG AATGTCAATT TGTGGTGGG
 ATTCTGGGCT GTGCAGCTGA ATGTCTGCT GTACAGAATC TACCTTGCTG CTCATTTCC TCATCAAGTT GTTGCTGGAG
 15 TCCTGTCAAGG CATTGCTGTT GCAGAACACTT TCAGCCACAT CCACAGCAGC TATAATGCCA GCCTCAAGAA ATATTTCTC
 ATTACCTCTC TCCTGTTCAG CTCGCCATC GGATTTCATC TGCTGCTCAA GGGACTGGGT GTAGACCTCC TGTGGACTCT
 GGAGAAAGCC CAGAGGGGT GCGAGCAGCC AGAATGGGTG CACATTGACA CCACACCCCT TGCCAGCCTC CTCAAGAAC
 TGGGCACGCT CTTTGGGCTG GGGCTGGCTC TCAACTCCAG CATGTACAGG GAGAGCTCCA AGGGGAAACT CAGCAAGTGG
 20 CTCCCATTC GCCTCAGCTG CATTGAGCC TCCCTCGCC TCCTGCACGT CTTGACTCC TTGAAACCCC CATCCAAAGT
 CGAGCTGGTC TTCTACGTCT TGTCCCTGCT CAAGAGTGC GTAGTGCCTT TGGCATCCGT CAGTGTCAATC CCCTACTGCC
 TCGCCCAGGT CCTGGGCCAG CGGCACAAGA AGTCGTTGTA A

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

25 ATG GAAAGGGCA TGAACGTCGCT 3CACGACTTC GGACATCCAGA GCACCCACTA TCTGCAGGTC AACTACCAGG ACAGCCAGGA
 CTGGTTCACTC CTGGTGTCCG TGATGGCGGA CCTCCGGAAAC GCCTCTACG TGCTGTTCCC CATCTGGTC CACATGCAAG AAGCCCTGG
 CATCAAGCTG CTGIGGGTGG CGATGATCGG CGATGGCTG AACCTGGTGT TCAAGTGGAT CCTGTTGGC CAGCGCCCTT ATTGGTGGG
 GCTGGACACC GACTACTACA GCAACACAG CGTGCCTCTG ATCAAGCAGT TCCCGGTGAC CTGCGAGACA GGGCCTGGCT CTCCTCTGG
 30 CCACCCATG GGAAACAGCC CGCGTACTA CGTGATGGTC ACCACAGCAGC TGACCATCT CCAAGGCAAG ATCAAGGCCA CCTACCGTT
 CCGGTGCTG AACATGATCC TGTGGCTGGG CCTCTGGGCC GTGCGACTGA ACGTGTCCT GAGCGGATC TACCTGGCCG CCCACTTCCC
 ACATCAAGTG GTGCCGGCG TGCTGAGCGG AATGCCGTG GCCGAGACAT TCAGCCACAT CCACAGCAGC TACAACGCCA GCCTGAACAA
 GTACTCTCTG ATCACATTCT TTCTGTTCACT CTCGCCATC GGCTCTTACG TGCTGCTGAA GGGCTGGGCT GTGGACCTCC TGTGGACCC
 35 GGAAAGGCC CAGGGTGGT GCGAGCAGCC CGAGTGGGTG CACATGACA CCACCCCTT CGCCAGCCTG CTGAAGAAC TGGGCACCC
 GTTTGGACTG GGCGTGGCCC TGAAACAGCG CATGTACAGA GAGAGCTGAA AGGGCAAGCT GAGCAAGTGG CTGGCCTTCC GGCTGAGCTG
 CTCATGTCGCC AGCGTGGTC TGCTGACAGC CTGAAGGCC CCAGCCAGGT GGAACGGTGG TTTTACGTGC TGAGCTTGT
 CAAGAGGCC GTGCGTGGCCC TGGCGTCCGT 3CTGTGATC CCCTACTGCC TGGCTCAGCT GCTGGGCCAG CCCCACAAGA AGTCCCTCTG A

VI. AAV recombinante para aplicaciones de terapia génica

- 40 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.
- 45 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).
- 50 60 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).
- 65 65 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

5 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.

10 5 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).

15 10 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.

20 15 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.

25 Ejemplos

30 20 Ejemplo 1: Construcción y caracterización de mutantes de G6PC (G6Pasa-a) humanos para su uso en terapia génica mediada por AAV

35 25 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.

35 Construcción de mutantes de G6PC

40 30 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.

45 40 Tabla 1. Cambios de nucleótidos en mutantes de G6PC humanos

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

5 Expresión en células COS-1 y ensayos de fosfohidrolasa

10 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 transfecaron 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).

15 Análisis estadístico

20 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

25 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).

30 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		

50 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).

55

60

65

Tabla 3. Actividad de fosfohidrolasa de mutantes de G6PC humana

	Constructo de G6PC	Ubicación	Actividad de fosfohidrolasa (nmol/min/mg)
5	pSVL-hG6PC-WT		164,5 ± 9,5 (100 %)
10	pSVL-hG6PC-E3K	N-terminal	156,0 ± 6,3
15	pSVL-hG6PC-Q54R	C1	169,6 ± 7,3
20	pSVL-hG6PC-Q139R	C2	113,1 ± 6,7
25	pSVL-hG6PC-I142K	C2	141,0 ± 4,4
30	pSVL-hG6PC-S 196R	H5	90,5 ± 2,5
35	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).

60

65

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)
5	pSVL-hG6PC-WT	131,1 ± 3,8 (100 %)
10	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-1a (*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-1a 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 rAAV8-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 rAAV8-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 rAAV8-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 rAAV8-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-1a, 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 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*).

20 20 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-1a.

25 25 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-a 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 30 Ejemplo 3: Tratamiento de GSD-1a 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-1a.

35 35 Se selecciona a un paciente diagnosticado con GSD-1a 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
55	
60	
65	

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

15 Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Phe Leu Phe Ser Phe Ala Ile Gly Phe Tyr
 210 215 220

20 Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Val Asp Leu Leu Trp Thr Leu Glu Lys
 225 230 235 240

25 Ala Arg Arg Trp Cys Glu Arg Pro Glu Trp Val His Ile Asp Thr Thr
 245 250 255

30 Pro Phe Ala Ser Leu Leu Lys Asn Val Gly Thr Leu Phe Gly Leu Gly
 260 265 270

35 Val Thr Leu Asn Ser Ser Met Tyr Arg Glu Ser Cys Lys Gly Lys Leu
 275 280 285

40 Ser Lys Trp Phe Pro Phe Arg Leu Ser Cys Ile Val Val Ser Leu Ile
 290 295 300

45 Leu Leu His Leu Phe Asp Ser Leu Lys Pro Pro Ser Gln Thr Glu Leu
 305 310 315 320

Ile Phe Tyr Thr Leu Ser Phe Cys Lys Ser Ala Ala Val Pro Leu Ala
 325 330 335

50 Ser Val Ser Leu Ile Pro Tyr Cys Leu Ala Arg Val Phe Asp Gln Pro
 340 345 350

55 Asp Lys Lys Ser Leu
 355

60 <210> 2
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

His Lys Lys Ser Leu
 355

25 <210> 3
 <211> 7671
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Constructo sintético (pTR-GPE-G6PC humana)

35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (17)..(163)
 <223> Repetición terminal invertida

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

	ggggggggggg ggggggggtt ggccactccc tctctgcgcg ctgcgtcgct cactgaggcc	60
	gggcgaccaa aggtcgcccg acgccccggc tttgccccggg cggcctcagt gagcgagcga	120
5	gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt cctagatctg aattcggtac	180
	ccctttgaga atccacggtg tctcgatgca gtcagcttc taacaagctg gggcctcacc	240
	tgttttccca cggataaaaaa cgtgctggag gaagcagaaa ggggctggca ggtggaaaga	300
10	tgaggaccag ctcatcgct catgactatg aggttgctct gatccagagg gtccccctgc	360
	ctgggtggccc accgcagga agactccac tgtccctgga tgcccagagt gggatgtcaa	420
	ctccatcact tatcaactcc ttatccatag gggtattctt cctgaggcgt ctcagaaaac	480
15	agggccctcc ccatatgctg accacataat agaaccctc ccaactcaga gaccctggct	540
	gctagctgcc ctggcatgac ccagacagtg gcctttgtat atgttttag actcaccttg	600
	actcacctct gaccatagaa actctcatcc cagaggtcac tgcaatagtt actccacaac	660
20	agaggcttat ctgggttagag ggaggctccc tacctatggc ccagcagccc tgacagtgca	720
	gatcacatata accccacgcc ccagcactgc ctgccacgca tgggcttact ttacacccac	780
25	ccacagtcac caacacatta cctgctctcc aaggtaggc gtggcaggag aagtttgctt	840
	ggaccagcag aaaccatgca gtcaaggaca actggagtca gcatggctg ggtgcgagcc	900
	cttgggtgggg tggggaggag actccaggc atacccctg gaggatgtt taatcatttc	960
30	cagcatggaa tgctgtcaac ttttgcaca gattcattag ctctgagttt ctttttctg	1020
	tccccagcta ccccttacat gtcaatatgg acttaatgat gggaaattca ggcaagttt	1080
	taaacatttt attccccctg gctcttatcc taaaaaatg catgaattt gaggcagtgg	1140
35	ctcatgcctg taatccaat gctttgctag gttgaggcgg gaggatcact tgaagccagg	1200
	aatttgagac cagcctgggc cgcatagtga gaccccgaaa ctacaaaaat aaataaataa	1260
	ataataaata atagtgatata gaagcatgat taaaatgccc tattttttaa aatgcatgag	1320
40	ttcggttacct gattcattcc ctgggtcctt tcacagtccct ccgtgaccca agtgttaggg	1380
	ttttggtctc tctactattt gtaggctgat atatagtata cacacacaca cacacacaca	1440
	tatacacaca cacagtgtat cttagcttt cttttgtata tctacacaca tatgtataag	1500
45	aaagctcaag atatagaagc ctttttcaa aaataactga aagtttcaaa ctctttaagt	1560
	ctccagttac cattttgctg gtattcttat ttgaaaccat acattcatca tattgttgca	1620
	cagtaagact atacattcat tattttgctt aaacgtatga gttaaaacac ttggccagcc	1680
50		

55

60

65

	atggtggttc acacctgtaa tcccagagct ttgggaagcc aagactggca gatctttga	1740
5	gctcaaggaat tcaagaccag cctggcaac atggaaaaac ccaatctcta caaaagatag	1800
	aaaaatttagc caggcatggt ggcgtgtgcc tgggtccca gctactcagg aggctgaggt	1860
	gggaggatca cattagccca ggaggtttag gctgcagtga gccgtgatta tgccactgca	1920
	ctccagcctg ggagacagag tgagaccctg tttcaaaaaa aagagagaga aaatttaaaa	1980
10	aagaaaacaa caccaagggc tgtaactta aggtcattaa atgaattaa cactgcattc	2040
	aaaaacgatt actttctggc cctaaagagac atgaggccaa taccaggaag ggggttgatc	2100
	tcccaaacca gaggcagacc ctagactcta atacagttaa ggaaagacca gcaagatgat	2160
15	agtccccat acaatagaag ttactatatt ttatgttg ttttctttt gttttgtttt	2220
	gttttgtttt agagactggg gtcttgctcg attgcccagg ctgttagtgca	2280
	gcgggtggac aatagctcac tgcagactcc aactcctggg ctcaagcaat cctcctgcct	2340
20	cagcctcctg aatagctggg actacaaggg tacaccatca cacacaccaa aacaattttt	2400
	taaattttt tctatggggc aggggtttgc tttgttgcggc aggctgtct ccaactcctg	2460
	gtttcaaggg atcctccac ctcagcctcc caaattgtcg ggattacagg tgtgagccac	2520
25	cacaaccagc cagaacttta ctaattttaa aattaagaac ttaaaacttg aatagctaga	2580
	gcaccaagat ttttctttgt ccccaataa gtgcagttgc aggcatagaa aatctgacat	2640
	cttgcaaga atcatcggtt atgttagactc tgcctgtgt ctctggcctg gttcgggga	2700
30	ccaggaggc agacccttgc actgccaaga agcatgccaa agttaatcat tggccctgt	2760
	gagttacatgg ccgatcaggc tgggtttgtg tgactgtttt tctatttac gtaaatcacc	2820
	ctgaacatgt ttgcataac ctactggta tgacactttg atcaatacat tttagacaaa	2880
35	cgtggttttt gagtccaaag atcagggctg ggtgacctg aatactggat acagggcata	2940
	taaaacaggg gcaaggcaca gactcatgc agagcaatca ccaccaagcc tggataact	3000
	gcaagggctc tgctgacatc ttccctgaggt gccaaggaaa tgaggtctag agaagctta	3060
40	ttgcggtagt ttatcacagt taaattgtca acgcagtcag tgcttctgac acaacagtct	3120
	cgaacttaag ctgcagtgac tctcttaagg tagccttgca gaagttggc tgaggcact	3180
	gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggttg	3240
45	tgcagacaga gaagacttt gcgttctga taggcaccta ttggtcttac tgacatccac	3300
	tttgccttgc tctccacagg tgcactcc cagttcaatt acagcttta aggcctgca	3360
	ggccaccatg gaggaaggaa tgaatgtct ccatgacttt gggatccagt caacacatta	3420
50	cctccaggtg aattaccaag actcccagga ctggttcatc ttgggtcccg tgatcgcaga	3480
	cctcaggaat gccttctacg tcctttcccc catctggttc catcttcagg aagctgtggg	3540
55		
60		

ES 2 824 829 T3

ES 2 824 829 T3

	gtatgttaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct acactagaag	5520
5	gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttccggaaaaa gagttggtag	5580
	ctcttgcattt ggcaaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt tttttgttt gcaagcagca	5640
	gattacgcgc agaaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggctgaa	5700
10	cgctcagttt aacgaaaact cacgttaagg gatTTTggtc atgagattat caaaaaggat	5760
	cttcacccatg atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga	5820
	gtaaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gacccatct cagcgatctg	5880
15	tctatttgcg tcatccatag ttgcctgact ccccgctgt tagataacta cgatacggga	5940
	gggcttacca tctggccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct caccggctcc	6000
	agatttatca gcaataaaacc agccagccgg aaggcccgag cgcagaagtg gtcctgcaac	6060
20	tttattccgc tccatccagt ctattaaattt tgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc	6120
	agttaatagt ttgcgcacg ttgttgcatt tgctacaggc atcgtgggtg caccgtcg	6180
	gtttggatg gcttcattca gctccgggtc ccaacgatca aggcgagttt catgatcccc	6240
25	catgttgcg aaaaaagccg ttagctcattt cggctctccg atcgttgtca gaagtaagtt	6300
	ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcaactgcat aattcttta ctgtcatgcc	6360
	atccgttaaga tgctttctg tgactggta gtactcaacc aagtcatctt gagaatagtg	6420
	tatgcggcga ccgagttgtc ttgcggccgc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag	6480
30	cagaacttta aaagtgcctca tcattggaaa acgttctcg gggcgaaaaac tctcaaggat	6540
	cttaccgcgt ttgagatcca gttcgatgtt acccactcgat gcacccaaact gatctcagc	6600
	atcttttact ttcaccagcg ttctgggtg agccaaaaca ggaaggccaa atgcccacaa	6660
35	aaagggaaata agggcgacac ggaaatgtt aataactcata ctttccctt ttcaatatta	6720
	ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatatac atatttgaat gtatttagaa	6780
	aaataaaacaa ataggggttc cgcgcacatt tccccggaaa gtgccacctg acgtctaaga	6840
40	aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc ctttcgtct	6900
	cgcgcggttc ggtgatgacg gtggaaaacct ctgacacatg cagctcccg agacggtcac	6960
	agcttgtctg taagccgtt ccgggagcag acaagccgtt cagggcgcgt cagcgggtgt	7020
45	tggcggtgtt cggggctggc ttaactatgc ggcacatcag cagattgtac tgagagtgca	7080
	ccatatgcgg tggaaatac cgcacagatg ctggaaaggaga aaataccgca tcaggaaatt	7140
	gtaaacgtta atattttttt aaaaattcgctt taaaattttt gttaaatcgtt ctatTTTT	7200
50	aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg	7260
	ttgagtgtt ttccagttt gacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaaacgtc	7320
	aaagggcgaa aaaccgtctt tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatca	7380
55	agttttttgg ggtcgagggtt ccgtaaagca ctaaatcgga accctaaagg gagcccccgaa	7440
	ttagagctt gacggggaaa gcccggaaac gtggcgagaa aggaaggaa gaaagcgaaa	7500
	ggagcggggcg ctagggcgctt ggcaagtgtt ggcgtcacgc tgcgcgttaac caccacaccc	7560
60	gcccgcgtta atgcgcgcgtt acagggcgcg tgcgcgttacc cgcatttcg gctacgcaac	7620
	tgttgggaag ggcgtatcggtt ggcggccatc tgcgttattac gccaggctgc a	7671

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

60

65

ES 2 824 829 T3

	gggggggggg ggggggggtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc	60
	gggcgaccaa aggtcgcccc acgcggggc tttgccccggg cggcctcagt gagcgagcga	120
5	gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actaggggtt cctagatctg aattcggtac	180
	cccttgcaga atccacgggtg tctcgatgca gtcagcttc taacaagctg gggcctcacc	240
	tgtttccca cggataaaaaa cgtgctggag gaagcagaaa ggggctggca ggtggaaaga	300
10	tgaggaccag ctcatcgctc catgactatg aggttgctct gatccagagg gtccccctgc	360
	ctgggtggccc accggccagga agactcccac tgccttcgtt tgcccgaggt gggatgtcaa	420
	ctccatcaact tatcaactcc ttatccatag ggttattctt cctgaggcgt ctcagaaaac	480
15	aggggccctcc ccatatgctg accacataat agaacccttc ccaactcaga gaccctggct	540
	gctagctgcc ctggcatgac ccagacagtgc gcctttgtat atgttttag actcaccttg	600
	actcacctct gaccatagaa actctcatcc cagaggtcac tgcaatagtt actccacaac	660
20	agaggcttat ctgggttagag ggaggctccc tacctatggc ccagcagccc tgacagtca	720
	gatcacatata accccacgccc ccagcactgc ctgccacgca tgggcttact ttacacccac	780
25	ccacagtcac caacacattha cctgtctcc aagggttaggc gtggcaggag aagtttgctt	840
	ggaccagcag aaaccatgca gtcaaggaca actggagtca gcatgggctg ggtgcgagcc	900
	cttgggtgggg tggggaggag actccaggtc atacctcctg gaggatgtt taatcatttc	960
30	cagcatggaa tgctgtcaac tttgccaca gattcattag ctctgagttt ctttttctg	1020
	tccccagcta ccccttacat gtcaatatgg acttaatgtat gggaaattca ggcaagttt	1080
	taaacatttt attccccctg gcttttatcc tcaaaaaatg catgaatttg gaggcagtgg	1140
35	ctcatgcctg taatcccaat gctttgctag gttgaggcgg gaggatcaact tgaaggccagg	1200
	aatttgagac cagcctgggc cgcatagtga gaccccggtt ctacaaaaat aaataaataa	1260
	ataataaata atagtgtat gaagcatgtat taaatagccc tatttttaa aatgcgtat	1320
40	ttcggttaccc gattcattcc ctgggttccct tcacagtccct ccgtgaccga agtgttaggg	1380
	ttttggtctc tctactatcc gtaggctgat atatagtata cacacacaca cacacacaca	1440
	tatacacaca cacagtgtat cttgagcttt cttttgtata tctacacaca tatgtataag	1500
45	aaagctcaag atatagaagc ctttttcaa aaataactga aagtttcaa ctcttaagt	1560
	ctccagttac cattttgctg gtattctt tggaaaccat acattcatca tattgttgca	1620
	cagtaagact atacattcat tattttgctt aaacgtatga gttaaaacac ttggccaggc	1680
50	atgggtggttc acacctgtaa tcccagagct ttgggaagcc aagactggca gatctcttga	1740
	gctcaggaat tcaagaccag cctggcaac atggaaaaac cccatctcta caaaagatag	1800
	aaaaattagc caggcatggt ggcgtgtgcc tgggtccca gctactcagg aggctgaggt	1860
55	gggaggatca cattagccca ggaggtttag gctgcagtga gccgtgatta tgccactgca	1920
60		

ES 2 824 829 T3

	ctccagcctg ggagacagag tgagaccctg tttcaaaaaa aagagagaga aaattaaaaa	1980
	aagaaaacaa caccaaggc tgtaactta aggtcattaa atgaattaat cactgcattc	2040
5	aaaaacgatt actttctggc cctaagagac atgaggccaa taccaggaag ggggttgc	2100
	tcccaaaccg gaggcagacc cttagactcta atacagttaa ggaaagacca gcaagatgat	2160
10	agtccccaaat acaatagaag ttactatatt ttatttgtt gttttttt gttttgtttt	2220
	gttttgtttt gttttgtttt agagactggg gtttgtctg attgcccagg ctgttagtgca	2280
	gcgggtggac aatagctcac tgcagactcc aactcctggg ctcaagcaat cctcctgcct	2340
15	cagcctcctg aatagctggg actacaaggg tacaccatca cacacaccaa aacaattttt	2400
	taaattttt gtagaaacg agggtcttgc tttgttgcagg aggctggctc ccaactcctg	2460
	gtttcaaggg atcctccac ctcagcctcc caaattgctg ggattacagg tgtgagccac	2520
20	cacaaccaggc cagaacttta ctaattttaa attaagaac ttaaaacttg aatagctaga	2580
	gcaccaagat ttttcttgc ccccaaataa gtgcagttgc aggcatagaa aatctgacat	2640
	cttgcaaga atcatcgtgg atgtagactc tgcctgtgt ctctggctg gtttgggg	2700
25	ccaggaggc agacccttgc actgccaaga agcatgccaat gtttttttgc tggccctgct	2760
	gagtacatgg ccgatcaggc ttttttttgc tgcctgtttt tctattttac gtaaatcacc	2820
	ctgaacatgt ttgcataac ctactggta tgcaccccttgc atcaatacat ttttagacaaa	2880
30	cgtggggggg gatccaaag atcaggcgtg gtttttttgc aataactggat acaggcata	2940
	taaaacaggg gcaaggcaca gactcatagc agagcaatca ccaccaagcc tggataact	3000
	gcaaggggctc tgctgacatc ttcctgggtt gccaaggaaa tgaggtctag agaagcttta	3060
35	ttgcggtagt ttatcacagt taaatttgcata acgcagtcag tgcttctgac acaacagtct	3120
	cgaacttaag ctgcagtgac tctctttaagg tagccttgca gaagttggc gtgaggcact	3180
40	gggcaggtaa gatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaataagaa actggccttgc	3240
	tcgagacaga gaagactttt gctttctga taggcaccta ttggcttac tgacatccac	3300
	tttgccttgc tctccacagg tgcactcc cagttcaattt acagcttta aggccctgca	3360
45	ggccaccatg gaggaaggaa tgaatgttcc ccatgactttt gggatccagt caacacatta	3420
	cctccaggtaa aattaccaag actcccaggta ctggttcatc ttgggttccg tgatcgaga	3480
	cctcaggaaat gccttctacg tctcttccc catctggttc catcttcaagg aagctgtggg	3540
50	cattaaactc ctttgggttag ctgtgattgg agactggcgc aacctgtct ttaagtggat	3600
	tctctttggaa cagcgtccat actgggggtt ttggataact gactactaca gcaacacttc	3660
	cgtggccctg ataaaggcagt tccctgttaac ctgtgagact ggaccaggaa gcccctctgg	3720
55	ccatgccatg ggcacagcag gtgtatacta cgtgtggc acatctactc ttccatctt	3780
60		
65		

ES 2 824 829 T3

	tcagggaaag ataaagccga cctacagatt tcggtgctt aatgtcat tt tgtgggg 3840
	attctgggct gtgcagctga atgtctgtct gtcacgaatc taccttgctg ctcattttcc 3900
5	tcatcaagtt gttgctggag tcctgtcagg cattgctgtt gcagaaactt tcagccacat 3960
	ccacagcatc tataatgcca gcctcaagaa atatttctc attaccttct tcctgttcag 4020
	cttcgccatc ggattttatc tgctgctcaa gggactgggt gtagacctcc tgtggactct 4080
10	gagagaaagcc cagaggtggt gcgagcagcc agaatgggc cacattgaca ccacaccctt 4140
	tgccagccctc ctcaagaacc tgggcacgct ctttggcctg gggctggctc tcaactccag 4200
	catgtacagg gagagctgca agggaaaact cagcaagtgg ctcccattcc gcctcagctg 4260
15	cattgttagcc tccctcgctcc tccctgacgt ctttgactcc ttgaaacccc catccaaagt 4320
	cgagctggtc ttctacgtct tgccttctg caagagtgcg gtagtgcccc tggcatccgt 4380
	cagtgtcatc ccctactgccc tcccccaggc cctgggcccag ccgcacaaga agtcgttgta 4440
20	agcggcccgcg gggatccaga catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact 4500
	agaatgcagt gaaaaaaaaatg ctttattttgt gaaatttggat atgctattgc tttattttgt 4560
25	accattataa gctgcaataaa acaagttAAC aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag 4620
	gttcagggggg aggtgtggga ggttttttag tcgaccatgc tggggagaga tcttaggaacc 4680
	cctagtgtatg gagttggcca ctccctatctat ggcgcgtcgc tcgctcactg aggcccgg 4740
30	gcaaaagcccc gggcgctggg cgacccttgg tgcggccggcc tcagtgagcg agcgagcg 4800
	cagaggggaa gtggccaaacc ccccccccccc cccccctgca gcccgtcatt aatgaatcgg 4860
	ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat tggcgctct tccgcttctcg ctgcactga 4920
35	ctcgctgcgc tcggcgttcc ggctgcggcg agcggatca gctcactcaa aggccgtaat 4980
	acggttatcc acagaatcaag gggataacgc agaaaaaaac atgtgagcaa aaggccagca 5040
	aaaggccagg aaccgtaaaa agggccgtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc 5100
40	tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtgg cgaaacccga caggactata 5160
	aagataccag gcgtttcccc ctggaaagctc cctcgctgcgc ttcctgttc cgaccctgcc 5220
	gcttaccggaa tacctgtccg ctttctccc ttccggaaagc gtggcgctt ctcaatgtc 5280
45	acgctgttagg tatctcagtt cggctgttaggt cggtcgctcc aagctgggt gtgtgcacga 5340
	ccccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgcttt agtccaaccc 5400
	gttaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggattt gcagagcg 5460
50	gtatgttaggc ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct acactagaag 5520
	gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttccggaaaaa gagttggtag 5580
	ctcttgcattcc ggcaaaacaaa ccaccgcgtgg tagcgggtggt tttttgttt gcaagcagca 5640
55	gattacgcgc agaaaaaaaaag gatctcaaga agatcctttt atctttctta cggggctgtga 5700
60	

	cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggc atgagattat caaaaaggat	5760
	cttcacctag atcccttaa attaaaaatg aagtttaaa tcaatctaaa gtatatatga	5820
5	gtaaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gcacccatct cagcgatctg	5880
	tctatccgt tcataccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgataacggg	5940
10	gggcttacca tctggccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgat caccggctcc	6000
	agatttatca gcaataaacc agccagccgg aaggggccgag cgccagaatg gtcctgcaac	6060
	tttatccgccc tccatccagt ctattaattt gttccggaa gctagagtaa gtagttcgcc	6120
15	agttaatagt ttgcgcacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc	6180
	gtttggatgt gcttcattca gctccgggttc ccaacgatca aggcgagatc catgatcccc	6240
	catgttgc aaaaaagccgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgta gaagtaagtt	6300
20	ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattcttta ctgtcatgcc	6360
	atccgtaaaga tgctttctg tgactggta gtactcaacc aagtcttct gagaatagtg	6420
	tatgcggcga ccgagttgtc cttggccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag	6480
25	cagaacttta aaagtgcgtca tcattggaaa acgttctcg gggcgaaaac tctcaaggat	6540
	cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgtc acccactcgat gcacccaaact gatcttcagc	6600
	atctttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgcccggaaa	6660
30	aaagggaaata agggcgacac ggaaatgtt aataactcata ctcttcctt ttcaatatta	6720
	ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa	6780
	aaataaaacaa ataggggttc cgccacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga	6840
35	aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgat atcacgaggc ccttcgtct	6900
	cgccgcgttgc ggtgtatgcgtc gtgaaaacctt ctgacacatcg cagctccgg agacgggtcac	6960
40	agcttgcgtc taagcggatc ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt	7020
	tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcacatcgag cagattgtac tgagagtgc	7080
	ccatatgcgg tggaaatac cgacacatcg cgttaaggaga aaataccgca tcaggaaatt	7140
45	gtaaacgtta atatttgtt aaaattcggt taaaattttt gttaaatcgat ctcatttttt	7200
	aaccaatagg ccgaaatcggt caaaatccct tataatcaa aagaatagac cgagataggg	7260
	ttgagtttgc ttccagtttgc gaacaagagt ccactattaa agaacgtggc ctccaaacgtc	7320
50	aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatac	7380
	agtttttgg ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaatcggtt accctaaagg gagccccgg	7440
	tttagagctt gacggggaaa gccggcgaaac gtggcgagaa aggaaggaa gaaagcgaaa	7500
55	ggagcggcgct tagggcgct ggcaagtgtc gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc	7560
	gccgcgtta atgcgcgcgt acagggcgatc tcgcgcattt cggcatttcag gctacgcaac	7620
60	tgttggaaag ggcgatcggt gcccgcctt tcgcgttattac gccaggctgc a	7671

5 <210> 5
 <211> 7671
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Constructo sintético (pTR-GPE-co-G6PC-S298C)
 <220>
 15 <221> misc_característica
 <222> (17)..(163)
 <223> Repetición terminal invertida
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (182)..(3045)
 <223> GPE
 20 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3051)..(3184)
 <223> Secuencia de relleno
 25 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3185)..(3321)
 <223> Intrón
 30 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3322)..(3367)
 <223> Secuencia de relleno
 35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3368)..(4441)
 <223> secuencia codificante de G6PC humana optimizada en codón
 40 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (4259)..(4261)
 <223> Cambio de codón
 45 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (4674)..(4819)
 <223> Repetición terminal invertida
 50 <400> 5
 55 gggggggggg ggggggggtt ggccactccc tctctgcgcg ctgcgtcgct cactgaggcc
 gggcgaccaa aggtcgcccg acgccccggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgcgcga
 gcgcgagag agggagtgcc caactccatc actaggggtt cctagatctg aattcggtag
 ccctttgaga atccacggtg tctcgatgca gtcagcttca taacaagctg gggcctcacc
 60
 120
 180
 240

ES 2 824 829 T3

	tgtttccca	cgataaaaaa	cgtgcggag	gaagcagaaa	ggggctggca	ggtggaaaga	300	
	tgaggaccag	ctcatcgct	catgactatg	aggttgtct	gatccagagg	gtccccctgc	360	
5	ctggggccc	accgccagga	agactccac	tgtccctgga	tgcccagagt	gggatgtcaa	420	
	ctccatca	tatcaactcc	ttatccatag	ggtttatttt	cctgaggcgt	ctcagaaaac	480	
	agggccctcc	ccatatgctg	accacataat	agaacccctc	ccaactcaga	gaccctggct	540	
10	gctagctgcc	ctggcatgac	ccagacagtg	gcctttgtat	atgttttag	actcacattg	600	
	actcacctct	gaccatagaa	actctcatcc	cagaggtcac	tgcaatagtt	actccacaac	660	
	agaggcttat	ctgggttagag	ggaggctccc	tacctatggc	ccagcagccc	tgacagtgca	720	
15	gatcacat	accccacgccc	ccagca	ctgcccacgca	tgggcttact	ttacacccac	780	
	ccacagtca	caacacatta	cctgctctcc	aaggtaggc	gtggcaggag	aagtttgc	840	
20	ggaccagcag	aaaccatgca	gtcaaggaca	actggagtca	gcatgggctg	ggtgcgagcc	900	
	tttggtgggg	tggggaggag	actccaggtc	ataccctctg	gaggatgttt	taatcatttc	960	
	cagcatggaa	tgctgtcaac	ttttgccaca	gattcattag	ctctgagttt	ctttttctg	1020	
25	tcccccagcta	cccccttacat	gtcaatatgg	acttaatgat	gggaaattca	ggcaagtttt	1080	
	taaacat	tttccccc	gtcttatcc	tcaaaaaatg	catgaattt	gaggcagtgg	1140	
	atcatgcctg	taatccaaat	gtttgctag	gttgaggcgg	gaggatca	tgaaggcagg	1200	
30	aatttgagac	cagcctgggc	cgcata	gtga	gaccccg	tttacaaaat	aaataaataa	1260
	ataataaaata	atagtgata	gaagcatgat	taaaatgccc	tat	ttttaaaat	aatgc	1320
	ttcggttac	tttgcattcc	ctgggtc	ttt	tcacagt	ccgtgaccca	agtgttaggg	1380
35	ttttggtctc	tctactat	tttgcgtat	atatagtata	cacaca	caca	caca	1440
	tatacacaca	cacagtgtat	cttgc	gtttgtata	tctac	acaca	cata	1500
	aaagctcaag	atatagaagc	ccttttcaa	aaataactga	aagttcaaa	ctcttta	aaatgt	1560
40	ctccagttac	cattttgtc	gtattttat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1620
	cagtaagact	atacattcat	tat	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1680
	atgggtgttc	acac	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	tttgc	1740
45	gctcaggaat	tcaagaccag	cctggcaac	atggaaaaac	cccatctct	caaaagatag	1800	
	aaaaatttagc	caggcatggt	ggcgtgtgcc	tgtggccca	gctactcagg	aggctgaggt	1860	
	ggggaggatca	cattagccca	ggagggtttag	gctgc	gctgc	gctgc	gctgc	1920
50	ctccagctg	ggagacagag	tgagacc	tttcaaaaaa	aagagagaga	aaat	ttaaaa	1980
	aagaaaaacaa	caccaaggc	tgtaacttta	aggcattaa	atgat	atgat	atgat	2040
	aaaaacgatt	actttctggc	cctaagagac	atgaggccaa	tcc	agg	agg	2100
55	tcccaa	acca	gaggcagacc	ctagactcta	atac	atac	atac	2160
60								

ES 2 824 829 T3

	agtccccaat acaatagaag ttactatat ttatttgtt gttttcttt gttttgtttt	2220
	gttttgtttt gttttgtttt agagactggg gtattgtcg attgcccagg ctgttagtgca	2280
5	gcgggtggac aatacgctcac tgcagactcc aactcctggg ctcaagcaat cctcctgcct	2340
	cagcctcctg aatacgctggg actacaaggg tacaccatca cacacaccaa aacaattttt	2400
10	taaattttt gtagaaacg agggtcttgc tttgttgcaggctgtct ccaactcctg	2460
	gcttcaggg atcctccac ctcagcctcc caaattgtcg ggattacagg tgtgagccac	2520
	cacaaccaggc cagaacttta ctaattttaa aattaagaac ttaaaacttg aatacgtaga	2580
15	gcaccaagat ttttcttgc ccccaaataa gtgcagttgc aggcatagaa aatctgacat	2640
	ctttgcaaga atcatcggtt atgttagactc tgcctgtgt ctctggcctg gtttcgggaa	2700
	ccaggaggc agacccttgc actgccaaga agcatgccaat gatataatcat tggccctgct	2760
20	gagttacatgg ccgatcaggc tggtttgtg tgcctgttt tctattttac gtaaatcacc	2820
	ctgaacatgt ttgcacatcaac ctactggtga tgcaccccttgc atcaatacat ttttagacaaa	2880
	cgtggttttt gagtccaaag atcaggggctg gtttgcacctg aatactggat acagggcata	2940
25	taaaacaggg gcaaggcaca gactcatagc agagcaatca ccaccaagcc tggaataact	3000
	gcaaggggctc tgctgacatc ttcctgaggt gccaaggaaa tgaggcttag agaagcttta	3060
	ttgcggtagt ttatcacagt taaatttgcta acgcagtcag tgcttctgac acaacagtct	3120
30	cgaacttaag ctgcagtgac tctcttaagg tagccttgca gaagttggcgt gtgaggcact	3180
	gggcaggtaa gatcaaggt tacaagacag gttttaggag accaatagaa actgggcttgc	3240
	tcgagacaga gaagacttgc gctttctgac taggcaccta ttggcttac tgacatccac	3300
35	tttgccttgc tctccacagg tgcactcc cagttcaattt acagcttcaaggccctgca	3360
	ggccaccatg gaagaggcata tgaacgtgct gcacgacttc ggcacccaga gcacccacta	3420
	tctgcaggc aactaccagg acagccagga ctggttcatc ctgggttccg tgatcgccga	3480
40	cctgcggAAC gccttctacg tgctgttccc catctggttc catctgcaag aagccgtcg	3540
	catcaagctg ctgtgggtt ccgtgatcgg cgattggctg aacctgggt tcaagtggat	3600
	cctgttccgc cagccggccctt attgggtt gctggacacc gactactaca gcaacaccag	3660
45	cgtgcccctg atcaagcagt tccccgtgac ctgcgagaca ggcctggct ctccttctgg	3720
	ccacgcccattt ggaacagcccg gctgttacta cgtgatggc accagcaccc tgagcatctt	3780
50	ccagggcaag atcaagccca cctaccgggtt ccgggtccctg aacgtgatcc tggctgggg	3840
	cttctggggcc gtcagctga acgtgtgcctt gagccggatc tacctggccg cccacttccc	3900
	acatcaagtg gtggccggcg tgctgagcgg aatcgccgtg gccgagacat tcagccacat	3960
55	ccacagcatc tacaacgcca gcctgaagaa gtacttcctg atcacattct ttctgttcag	4020
60		
65		

ES 2 824 829 T3

	cttcgccatc ggcttctacc tgctgctgaa gggcctggc gtggacctgc tgtggaccct	4080
	gaaaaaggcc cagcggttgt gcgagcagcc cgagtgggtg cacatcgaca ccacccctt	4140
5	cgcctggctg ctgaagaacc tgggcaccct gttggactg ggcctggccc tgaacacgag	4200
	catgtacaga gagagctgca agggcaagct gagcaagtgg ctgccttcc ggctgagctg	4260
	catcggtggcc agcctggtgc tgctgcacgt gttcgacagc ctgaagcccc ccagccaggt	4320
10	ggaactggtg ttttacgtgc tgagcttctg caagagcgcc gtggtgcccc tggcctccgt	4380
	gtctgtgatc ccctactgcc tggctcaggt gctggccag ccccacaaga agtccctctg	4440
	agcgcccgcg gggatccaga catgataaga tacattgatg agtttgacca aaccacaact	4500
15	agaatgcagt gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta	4560
	accattataa gctgcaataa acaagttAAC aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag	4620
	gttcagggggg aggtgtggga ggttttttag tcgaccatgc tggggagaga tcttaggaacc	4680
20	cctagtgtatc gagttggcca ctccctatct gcgatcgac tcgctcactg aggccgcccc	4740
	ggcaaagccc gggcgtcgcc cgacccttgg tcgccccggcc tcagtgagcg agcgagcg	4800
25	cagagagggg gtggccaacc ccccccccccc ccccccgtca gccctgcatt aatgaatcg	4860
	ccaaacgcgcg gggagagggcg gtttgcgtat tggcgctct tccgcttcct cgctcactga	4920
	ctcgctgcgc tcggcgttcc ggctgcggcg agcggtatca gctcaactaa aggccgtaat	4980
30	acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca	5040
	aaaggccagg aaccgtaaaa aggcccggtt gctggcggtt ttccatagc tccgcccccc	5100
	tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata	5160
35	aagataccag gcgttcccc ctggaagctc cctcgctgcgc tctcctgttc cgaccctgcc	5220
	gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttccggaaagc gtggcgctt ctcaatgctc	5280
	acgctgttagg tatctcagtt cggtgttaggt cttcgctcc aagctggct gtgtgcacga	5340
40	accccccgtt cagccccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgcttg agtccaaccc	5400
	ggtaagacac gacttacgc cactggcagc agccactggt aacaggattt gcagagcgag	5460
	gtatgttagc ggtgctacag agttctgaa gtggtggct aactacggct acactagaag	5520
45	gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttccggaaaaa gagttggtag	5580
	ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggttgt tttttgttt gcaagcagca	5640
	gattacgcgc agaaaaaaaaa gatctcaaga agatccttgc atctttctt cggggctgtga	5700
50	cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gatttggtc atgagattat caaaaaggat	5760
	ttcaccttag atccctttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga	5820
	gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag gcacctatct cagcgatctg	5880
55	tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggg	5940
60		

65

	gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gacccacgct caccggctcc	6000
	agatttatca gcaataaaacc agccagccgg aagggccagc cgccagaatgt gtcctgcaac	6060
5	tttatccgccc tccatccagt ctattaattt ttgccggaa gctagatgaa gtagttcgcc	6120
	agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgcctt tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc	6180
	gtttggatg gtttcattca gctccgggttc ccaacgatca aggcgagttt catgatcccc	6240
10	catgttgc aaaaaagcgg ttagctcattt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt	6300
	ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcaactgcatt aattctctta ctgtcatgcc	6360
15	atccgtttaa tgctttctg tgactggatgta gtactcaacc aagtcaattt gagaatagt	6420
	tatgcggcga ccgagttgtctt cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag	6480
	cagaacttta aaagtgcgtca tcattggaaa acgttctcg gggcgaaaac tctcaaggat	6540
20	cttaccgcgtg ttgagatcca gttcgatgtt acccaactcgat gcacccaaact gatcttcagc	6600
	atctttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgcccggaaa	6660
	aaagggaaaatggcggacac ggaaatgtt aataactcata ctcttccttt ttcaatattt	6720
25	ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtattttagaa	6780
	aaataaaacaa ataggggttc cgccacatt tccccggaaa gtgccacctg acgtctaaga	6840
	aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgct	6900
30	cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctccgg agacggtcac	6960
	agcttgcgtg taagcggatg ccgggagcag acaagccgt cagggcgcgt cagcgggtgt	7020
	tggcgggtgt cgccccgtggc ttaactatgc ggcacatcagag cagattgtac tgagagtgc	7080
35	ccatatgcgg tggaaataac cgccacatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggaaattt	7140
	gtaaacgtta atatttgtt aaaattcgcg ttaaaatttt gttaaatcag ctcatttttt	7200
	aaccaatagg ccgaaatcggtt caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg	7260
40	ttgagtgttgc ttccagtttgc gaacaagagt ccactattaa agaacgtggc ctccaaacgtc	7320
	aaagggcgaa aaaccgtcta tcaggccgtt ggcccactac gtgaaccatc accctaattca	7380
45	agttttttgg ggtcgagggtt ccgtaaagca ctaaatcggtt accctaaagg gagccccggaa	7440
	tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaaggaa gaaagcgaaa	7500
	ggagcggcgccctt ctagggcgctt ggcaagtgtt ggggtcacgc tgccgttaac caccacaccc	7560
50	ggccgcgttta atgcgcccgtt acagggcgccgtt tgccgttattt cggccatttca gctacgcaac	7620
	tgttggaaag ggcgatcggtt gggggccctt tggcttatttac gccaggctgc a	7671
	<210> 6	
55	<211> 1074	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 6	

ES 2 824 829 T3

	atggaggaag gaatgaatgt tctccatgac tttggatcc agtcaacaca ttacccatccag	60
	gtgaattacc aagactccca ggactgggtc atcttgggtgt ccgtgatcgc agacccatcagg	120
5	aatgccttct acgtccttctt ccccatctgg ttccatcttc aggaagctgt gggcattaaa	180
	ctcccttggg tagctgtat tggagactgg ctcaacccctcg tctttaagtg gattctttt	240
	ggacagcgctc catactggtg ggttttggat actgactact acagcaacac ttccgtgccc	300
10	ctgataaagc agttccctgt aacctgtgag actggaccag ggagccccc tggccatgcc	360
	atgggcacag caggtgtata ctacgtgatg gtcacatcta ctctttccat ctttcaggaa	420
15	aagataaagc cgacccatcag atttcggtgc ttgaatgtca ttttgggtt gggattctgg	480
	gctgtgcagc tgaatgtctg tctgtcacga atctacccctg ctgctcattt tcctcatcaa	540
	gttggcgtgctg gagtcctgtc aggcatgtc gttgcagaaa ctttcagccca catccacagc	600
20	atctataatg ccagcctcaa gaaatatttt ctcatcattt tcttcctgtt cagcttcgccc	660
	atcggtttt atctgctgtc caagggactg ggtgttagacc tcctgtggac tctggagaaa	720
	gcccgaggt ggtgcgagca gccagaatgg gtccacattt acaccacacc ctttgcagc	780
25	ctcctcaaga acctggcac gctctttggc ctggggctgg ctctcaactc cagcatgtac	840
	aggagagct gcaaggggaa actcagcaag tggctccat tccgcctcag ctgcattgtat	900
	gcctccctcg tcctcctgca cgtctttgac tccttggaaac ccccatccca agtcgagctg	960
30	gtcttctacg tcttgcctt ctgcaagat gcggttagtgc ccctggcatc cgtcagtgtc	1020
	atccccctact gcctcgccca ggtcttggc cagccgcaca agaagtcgtt gtaa	1074
	<210> 7	
35	<211> 1074	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 7	
	atggaaagg gcatgaacgt gctgcacgac ttccggcatcc agagcacccca ctatctgcag	60
45	gtcaactacc aggacagccca ggactgggtc atcttgggtgt ccgtgatcgc cgacccatcgg	120
	aaccccttctt acgtgtttt ccccatctgg ttccatcttc aagaagccgt cggcatcaag	180
50	ctgctgtggg tggccgtgtat cggcgattgg ctgaacccctgg tggtaagtg gatcctgttc	240
	ggccagcgcc cctattgggt ggtgcgtggac accgactact acagcaacac cagcgtgccc	300
	ctgatcaagc agttccctgtt gacccgtgag acaggccctg gctctccatc tggccacgccc	360
55		
60		
65		

ES 2 824 829 T3

	atgggaacag ccggcgtgta ctacgtgatg gtcaccagca ccctgagcat cttccaggc	420
	aagatcaagc ccacacctacg gttccggtgc ctgaacgtga tcctgtggct gggcttctgg	480
5	gccgtgcagc tgaacgtgtg cctgagccgg atctacctgg ccgcccactt cccacatcaa	540
	gtgggtggccg gcgtgcttag cgaaatcgcc gtggccgaga cattcagcca catccacagc	600
10	atctacaacg ccagcctgaa gaagtacttc ctgatcacat tctttctgtt cagcttcgccc	660
	atcggcttct acctgctgct gaagggcctg ggcgtggacc tgctgtggac cctggaaaag	720
	gcccagcggt ggtgcgagca gcccaggtgg gtgcacatcg acaccacccc cttegcagc	780
15	ctgctgaaga acctggcac cctgtttgga ctgggcctgg ccctgaacag cagcatgtac	840
	agagagagct gcaaggccaa gctgagcaag tggctgccc tccggcttag ctgcacatcg	900
	gccagcctgg tgctgctgca cgtgttcgac agcctgaagc cccccagcca ggtgaaactg	960
20	gtgttttacg tgctgagctt ctgcaagagc gccgtggtgc ccctggcctc cgtgtctgtg	1020
	atccccctact gcctggctca ggtgctggc cagccccaca agaagtccct ctga	1074
	<210> 8	
25	<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
5	Val	Met	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Ser	Ile	Phe	Gln	Gly	Lys	Ile	Lys	Pro
															130	135
10	Thr	Tyr	Arg	Phe	Arg	Cys	Leu	Asn	Val	Ile	Leu	Trp	Leu	Gly	Phe	Trp
															145	150
15	Ala	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Cys	Leu	Ser	Arg	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ala	His
															165	170
20	Phe	Pro	His	Gln	Val	Val	Ala	Gly	Val	Leu	Ser	Gly	Ile	Ala	Val	Ala
															180	185
25	Glu	Thr	Phe	Ser	His	Ile	His	Ser	Ile	Tyr	Asn	Ala	Ser	Leu	Lys	Lys
															195	200
30	Tyr	Phe	Leu	Ile	Thr	Phe	Phe	Leu	Phe	Ser	Phe	Ala	Ile	Gly	Phe	Tyr
															210	215
35	Leu	Leu	Leu	Lys	Gly	Leu	Gly	Val	Asp	Leu	Leu	Trp	Thr	Leu	Glu	Lys
															225	230
40	Ala	Gln	Arg	Trp	Cys	Glu	Gln	Pro	Glu	Trp	Val	His	Ile	Asp	Thr	Thr
															245	250
45	Pro	Phe	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Asn	Leu	Gly	Thr	Leu	Phe	Gly	Leu	Gly
															260	265
50	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Ser	Met	Tyr	Arg	Glu	Ser	Cys	Lys	Gly	Lys	Leu
															275	280
55	Ser	Lys	Trp	Leu	Pro	Phe	Arg	Leu	Ser	Cys	Ile	Val	Ala	Ser	Leu	Val
															290	295
60	Leu	Leu	His	Val	Phe	Asp	Ser	Leu	Lys	Pro	Pro	Ser	Gln	Val	Glu	Leu
															305	310
65	Val	Phe	Tyr	Val	Leu	Ser	Phe	Cys	Lys	Ser	Ala	Val	Val	Pro	Leu	Ala
															325	330
70	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Tyr	Cys	Leu	Ala	Gln	Val	Leu	Gly	Gln	Pro
															340	345
75	His	Lys	Lys	Ser	Leu											
															355	
80	<210>	9														
	<211>	357														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
85	<220>															
	<223>	Polipéptido sintético														
90	<400>	9														

ES 2 824 829 T3

Met	Glu	Glu	Gly	Met	Asn	Val	Leu	His	Asp	Phe	Gly	Ile	Gln	Ser	Thr
1															15
5															
His	Tyr	Leu	Gln	Val	Asn	Tyr	Gln	Asp	Ser	Gln	Asp	Trp	Phe	Ile	Leu
															30
						20									
10															
Val	Ser	Val	Ile	Ala	Asp	Leu	Arg	Asn	Ala	Phe	Tyr	Val	Leu	Phe	Pro
															45
						35									
15															
Ile	Trp	Phe	His	Leu	Gln	Glu	Ala	Val	Gly	Ile	Lys	Leu	Leu	Trp	Val
															50
						50									
Ala	Val	Ile	Gly	Asp	Trp	Leu	Asn	Leu	Val	Phe	Lys	Trp	Ile	Leu	Phe
															65
						65									
20															
Gly	Gln	Arg	Pro	Tyr	Trp	Trp	Val	Leu	Asp	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Asn
															85
						85									
															90
25															
Thr	Ser	Val	Pro	Leu	Ile	Lys	Gln	Phe	Pro	Val	Thr	Cys	Glu	Thr	Gly
															100
						100									
															105
															110
30															
Pro	Gly	Ser	Pro	Ser	Gly	His	Ala	Met	Gly	Thr	Ala	Gly	Val	Tyr	Tyr
															115
						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
						145									150
															155
															160
40															
Ala	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Cys	Leu	Ser	Arg	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ala	His
															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															

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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Polipéptido sintético

60 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Lys o Glu

65 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (54)..(54)
 <223> Xaa = Arg o Gln

70 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (139)..(139)
 <223> Xaa = Arg o Gln

75 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (142)..(142)
 <223> Xaa = Lys o Ile

80 <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			

20

Ile	Trp	Phe	His	Leu	Xaa	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	Leu	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	Xaa	Gly	Lys	Xaa	Lys	Pro
			130			135				140					

50

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

55

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

60

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

65

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
 225 230 235 240

Ala Xaa Arg Trp Cys Glu Xaa 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 Xaa Pro Phe Arg Leu Ser Xaa Ile Val Xaa Ser Leu Val
 290 295 300

Leu Leu His Val Phe Asp Ser Leu Lys Pro Pro Ser Gln Xaa Glu Leu
 305 310 315 320

30 Val Phe Tyr Xaa Leu Ser Phe Cys Lys Ser Ala Xaa Val Pro Leu Ala
 325 330 335

35 Ser Val Ser Val Ile Pro Tyr Cys Leu Ala Xaa Val Xaa Xaa Gln Pro
 340 345 350

40 Xaa Lys Lys Ser Leu
 355

45 <210> 11
 <211> 1074
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11

50 atggaggaag gaatgaatgt tctccatgac tttggatcc agtcaacaca ttacccatcc 60
 gtgaattacc aagactccca ggactggttc atcttggtgt ccgtgatcgc agacccatcagg 120
 aatgccttct acgtccttct ccccatctgg ttccatcttc aggaagctgt gggcattaaa 180
 55 ctcccttggg tagctgtgtat tggagactgg ctcaacctcg tcttaagtg gattctcttt 240
 ggacagcgctc catactggtg ggtttggat actgactact acagcaacac ttccgtgccc 300
 ctgataaaagc agttccctgt aacctgtgag actggaccag ggagcccttc tggccatgcc 360

60

65

ES 2 824 829 T3

	atgggcacag caggtgtata ctacgtatg gtcacatcta ctcttccat ctttcaggga	420
	aagataaagc cgacacctacag atttcggtgc ttgaatgtca ttttgtggtt gggattctgg	480
5	gctgtgcagc tgaatgtctg tctgtcacga atctaccttgc tgctcattt tcctcatcaa	540
	gttggctgtc gagtcctgtc aggcatgtc gttgcagaaa ctttcagcca catccacagc	600
10	atctataatg ccagcctcaa gaaatatttt ctcattacct ttttctgtt cagcttcgccc	660
	atcggatttt atctgctgct caagggactg ggtgttagacc tcctgtggac tctggagaaa	720
	gcccgaggt ggtgcgagca gccagaatgg gtccacattt acaccacacc ctttgcgc	780
15	ctcctcaaga acctggcac gctcttggc ctggggctgg ctctcaactc cagcatgtac	840
	agggagagct gcaaggggaa actcagcaag tggctccat tcggctcag ctctattgtt	900
	gcctccctcg tcctcctgca cgtcttgac tccttggaaac ccccatccca agtcgagctg	960
20	gtcttctacg ttttgcctt ctgcaagagt gcggtagtgc ccctggcatc cgtcaagtgtc	1020
	atccccctact gcctcgccca ggtcctggc cagccgcaca agaagtcgtt gtaa	1074

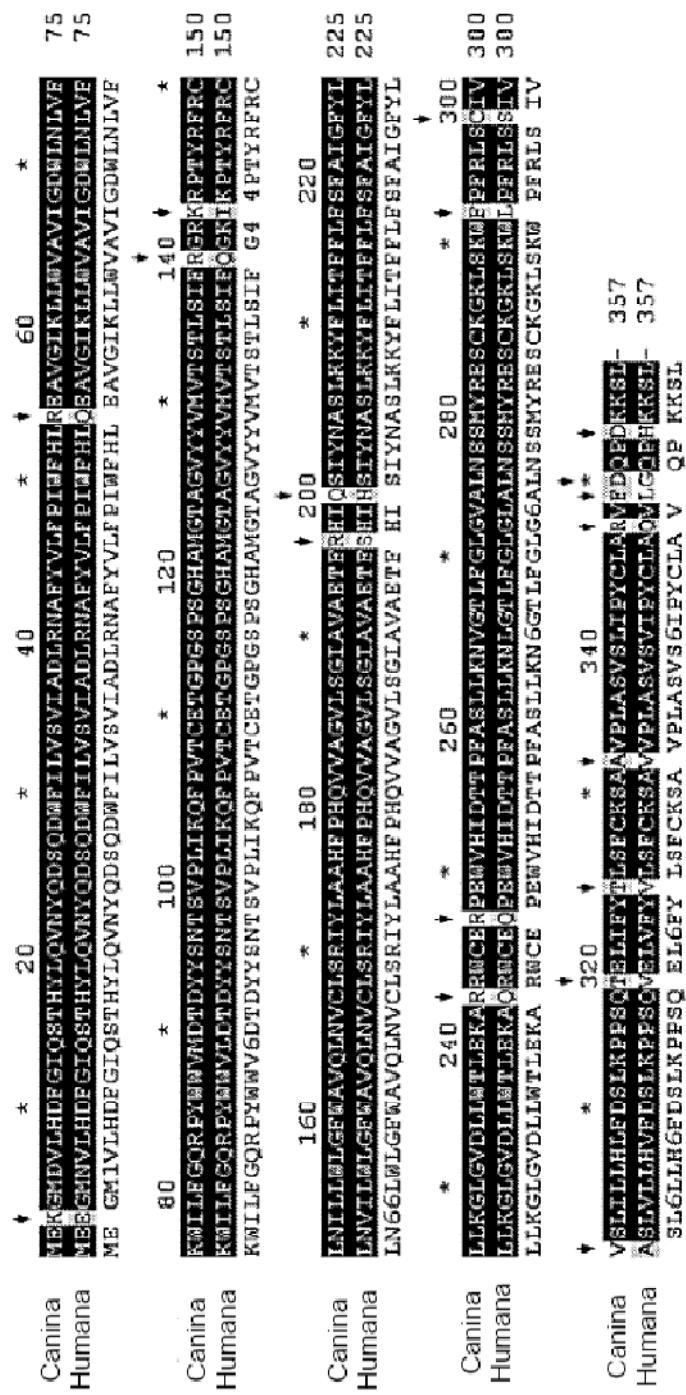
REIVINDICACIONES

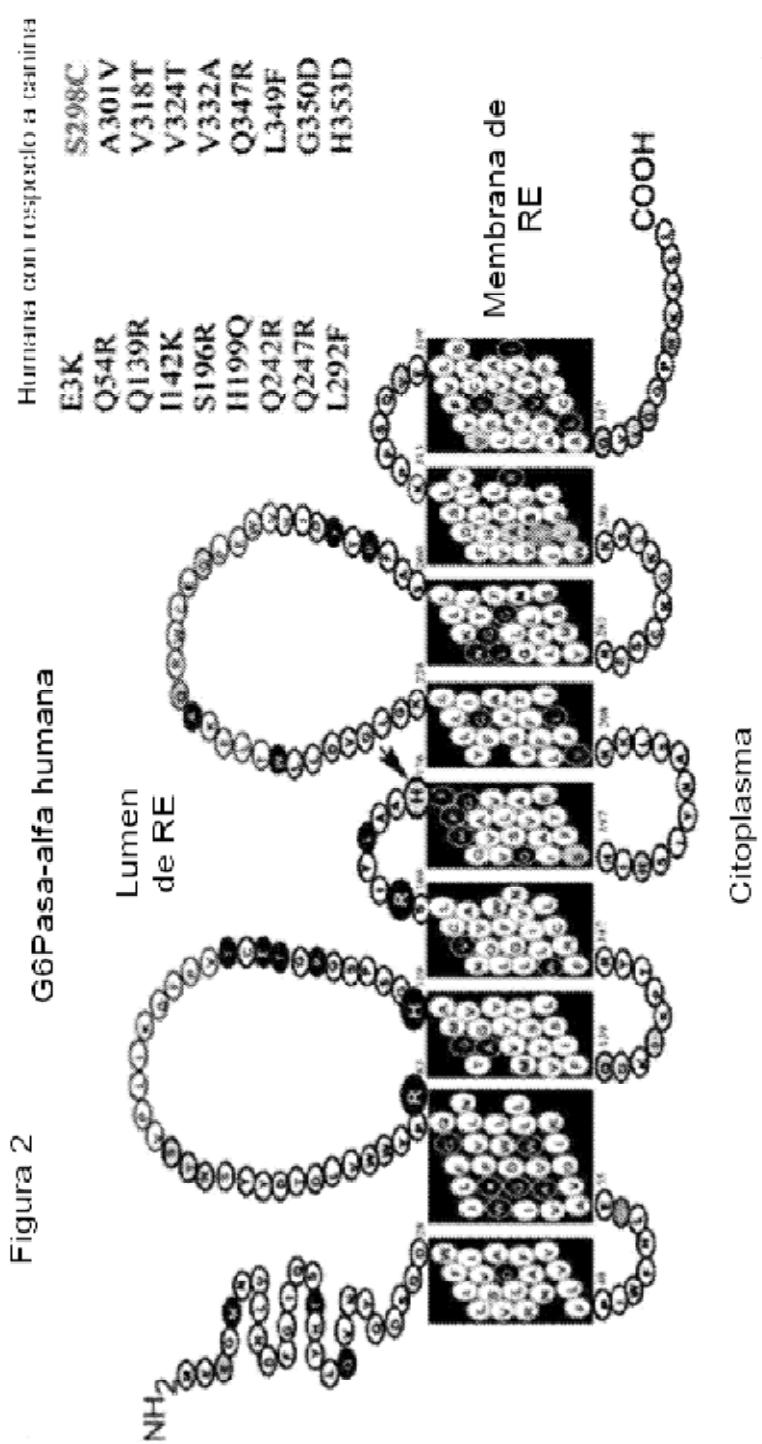
1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una glucosa-6-fosfatasa-a (G6Pasa-a) modificada, en donde la secuencia de aminoácidos de la G6Pasa-a modificada se expone como la SEQ ID NO: 2 y comprende una sustitución de serina por cisteína en el aminoácido 298.
- 5 2. La molécula de ácido nucleico 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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).
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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 la (GSD-la) 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.
- 50 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.
- 55 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-la.
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.

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.

5

Figura 1





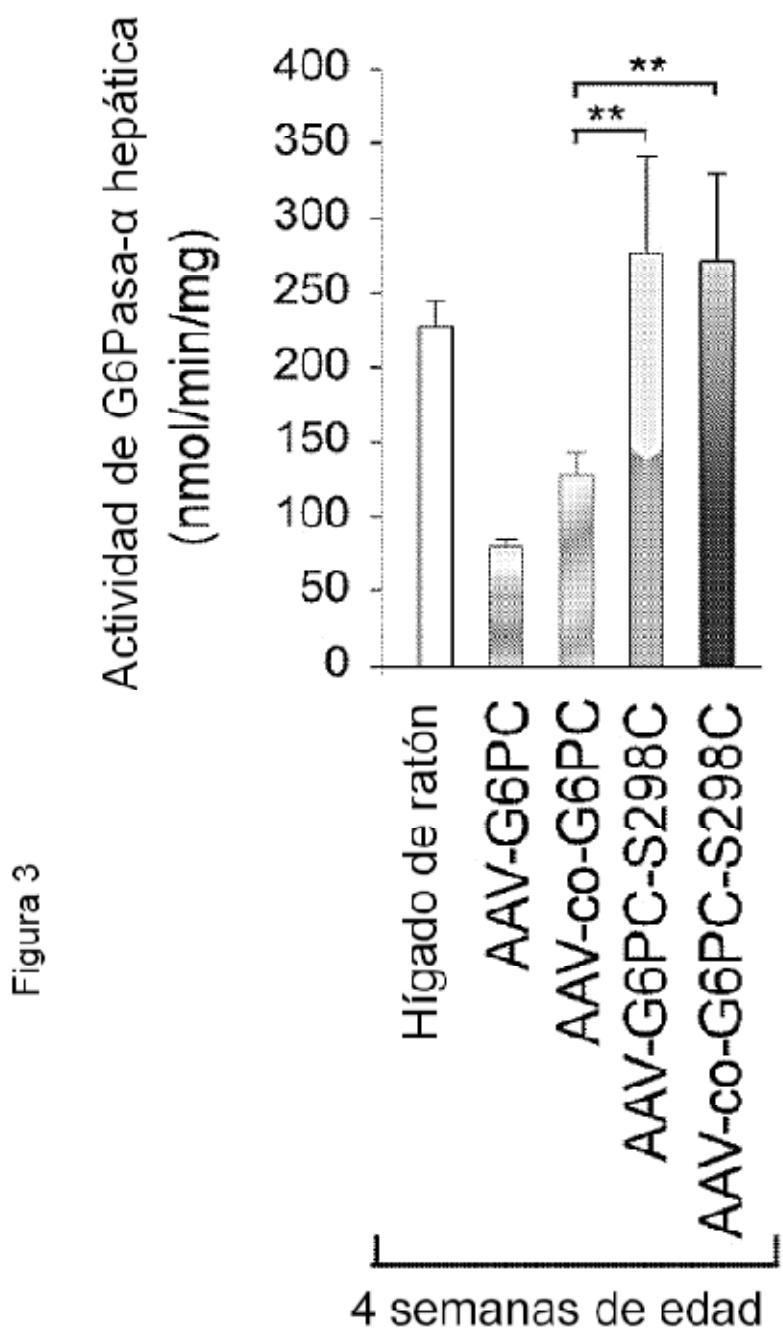


Figura 4

E3K: GAA-AAA (nt 7-9)
 ATGGAGGAAG GAATGATGT TCTCCATGAC TTTGGGATCC ASTCAACACA TTACCTCCAG G6PC--60

GTGAATTACC AAGACTCCCA GGACTGGTTC ATCTGGTGT CGGTGATCGC AGACCTCAGG G6PC--120

Q54R: CAG-CGT (nt 160-162)
 AATGCCCTCT ACGTCTCTT CCCCATCTGG TTCCATCTTC AGGAAGCTGT GGGCATATAA G6PC--180

CTCCTTGGG TAGCTGTGAT TGGAGACTGG CTCAACCTCG TCTTTAAGT GATTCTCTTT G6PC--240

GGACAGCGTC CATACTGGTG GTTTTGGAT ACTGACTACT ACAGCAACAC TTCCGTGCC G6PC--300

CTGATAAAGC AGTTCCCTGT AACCTGTGAG ACTGGACCAG GGAGCCCCTC TGCCATGCC G6PC-360

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

I142K: ATA-AAA (nt 424-426)
 AAGTAAGC CGACCTACAG ATTCGGTGC TTGAATGTCA TTTTGTGGTT GGGATTCTGG G6PC--480

GCTGTGCAGC TGAATGTCTG TCTGTCACGA ATCTACCTTG CTGCTCATTT TCCTCATCAA G6PC-540

S196R: AGG-CGC (nt 586-588) H199Q: CAC-CAG (nt 595-597)
 GTTGTGCTG GACTCCTGTC AGGCATTGCT GTTGCAGAAA CTTTCAGCCA CATCACGC G6PC--600

ATCTATAATG CCAGCCTCAA GAAATATTTT CTCATTACCT TCTTCTGTT CAGCTTCGCC G6PC--660

ATCGGATTTT ATCTGCTGCT CAAGGGACTG GGTGTAGACC TCTGTGGAC TCTGGAGAAA G6PC-720

Q242R: CAG-AGG (nt 724-726) ; Q247R: CAG-CGG (nt 739-741)
GCCGCAGGT GGTGCGACA GCCAGAATGG GTCCACATTG ACACCCACACC CTTTGCAGC G6PC--780

CTCCTCAAGA ACCTGGGCAC GCTCTTGGC CTGGGGCTGG CTCTCAACTC CAGCATGTAC G6PC-840

L292F: CTC-TTC (nt 874-876) ; S298C:TCT-TGC (nt 892-894)
 AGGGAGAGCT GCAAGGGAA ACTCAGCAAG TGGCTCCAT TCCGGCTCAG CTCTAATGTA G6PC-900

A301V: GCC-GTG (nt 901-903) **V318T: GTC-ACT (nt 952-954)**
GCGTCCCTCG TCCCTCTGCA CGTCTTGTAC TCCCTGAAAC CCCCATCCCA AGTCGAGCTG G6PC-960

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

Q347R: CAG-CGG ; L349F: CTG-TTC ; G350D: GGC-GAC ; H353D: CAC-GAC
 ATCCCCCTACT GCGTCGCCCA GTCGCTGGGC CAGCCGCCAAGAAGTCGTT GTAA (SEQ ID NO: 11) G6PC-1074

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

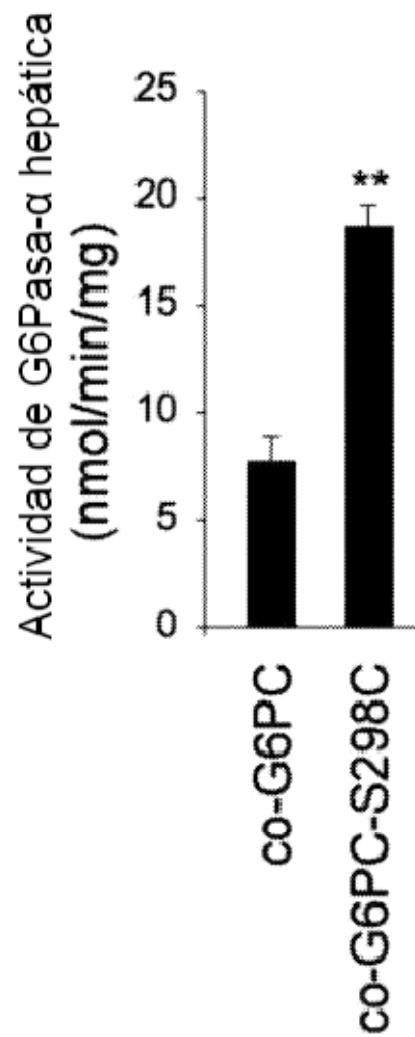


Figura 6A
Figura 6B

