

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 950 358**

(51) Int. Cl.:

<b>A61K 38/46</b>	(2006.01)	<b>A61P 1/16</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/366</b>	(2006.01)	<b>A61P 3/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/397</b>	(2006.01)	<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/135</b>	(2006.01)	<b>A61P 35/04</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/06</b>	(2006.01)	<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>A01K 67/027</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/194</b>	(2006.01)		
<b>C12N 9/20</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/38</b>	(2006.01)		
<b>A61P 1/00</b>	(2006.01)		

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2011 E 17158770 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2023 EP 3205351**

(54) Título: **Enzima de la enfermedad de almacenamiento lisosomal**

(30) Prioridad:

**23.04.2010 US 343177 P**  
**26.05.2010 US 396376 P**  
**09.09.2010 US 403011 P**  
**29.10.2010 US 456014 P**  
**13.01.2011 US 201161432372 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.10.2023**

(73) Titular/es:

**ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**121 Seaport Boulevard**  
**Boston, MA 02210, US**

(72) Inventor/es:

**QUINN, ANTHONY y**  
**HARVEY, ALEX**

(74) Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

**ES 2 950 358 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

Enzima de la enfermedad de almacenamiento lisosomal

## 5 SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional No. 61/343.177 de los Estados Unidos, presentada el 23 de abril de 2010, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/396.376, presentada el 26 de mayo de 2010, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/403.011, presentada el 9 de setiembre del 10 2010, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/456.014, presentada el 29 de octubre de 2010, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/432.372, presentada el 13 de enero de 2011.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 [0002] La deficiencia de la lipasa ácida lisosomal (LAL) es una enfermedad de almacenamiento lisosomal (LSD) muy rara caracterizada por no conseguir la degradación de ésteres de colesterol (CE) y triglicéridos (TAG) en lisosomas debido a una deficiencia de la enzima. La deficiencia de LAL se asemeja a otros trastornos de almacenamiento lisosomal con la acumulación de sustrato en un número de tejidos y tipos de células. En la deficiencia de LAL la acumulación de sustrato es más marcada en las células del sistema reticuloendotelial incluyendo las células de 20 Kupffer en el hígado, histiocitos en el bazo y en la lámina propia del intestino delgado. Las células reticuloendoteliales expresan el receptor de manosa/N-acetilglucosamina de macrófagos (también conocido como receptor de manosa de macrófagos o MMR, CD206), que media la unión, captación celular y la internalización lisosómica de proteínas con N-glicanos terminados en GlcNAc o manosa, y proporciona una vía para la potencial de corrección de la deficiencia de la enzima en estos tipos de células clave.

25 [0003] La deficiencia de LAL es una enfermedad multi-sistema que más comúnmente se manifiesta con complicaciones gastrointestinales, del hígado y complicaciones cardiovasculares y se asocia con una morbilidad y mortalidad significativas. Los efectos clínicos de la deficiencia de LAL se deben a una acumulación masiva de material lipídico en los lisosomas en un número de tejidos y una profunda perturbación de los mecanismos 30 homeostáticos de colesterol y lípidos, incluyendo aumentos sustanciales en la síntesis de colesterol hepático. La deficiencia de LAL deficiencia presenta al menos dos fenotipos, Enfermedad de Wolman (WD) y enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol (CESD).

35 [0004] La enfermedad de Wolman es la forma más agresiva de la deficiencia de LAL. Este fenotipo se caracteriza por manifestaciones gastrointestinales y hepáticas, incluyendo la falta de crecimiento, mala absorción, esteatorrea, pérdida de peso profunda y hepatomegalia. La enfermedad de Wolman es rápidamente progresiva y fatal por lo general dentro del primer año de vida. Una revisión de casos indica que la supervivencia más allá de 12 meses de vida es muy rara para los pacientes que presentan falta de crecimiento debido a la deficiencia de LAL en el primer año de vida. En esta forma más agresiva, la falta de crecimiento es el rasgo clínico predominante y es un elemento 40 clave para la mortalidad temprana. La afectación hepática como se evidencia por el agrandamiento del hígado y la elevación de las transaminasas es también común en los bebés. Los hallazgos físicos incluyen distensión abdominal con hepatomegalia y esplenomegalia, y el examen radiográfico revela a menudo una calcificación de las glándulas suprarrenales. Las evaluaciones de laboratorio típicamente revelan niveles elevados de las transaminasas séricas y 45 una actividad enzimática de LAL ausente o marcadamente reducida. También se observan en los pacientes niveles elevados de colesterol y triglicéridos en sangre.

50 [0005] Las opciones actuales de tratamiento para la enfermedad de Wolman son extremadamente limitadas. Los antibióticos se administran a los niños con fiebre y/o evidencia de infección. Puede recetarse una terapia de reemplazo de esteroides para la insuficiencia suprarrenal y el soporte nutricional especializado y, aunque no hay evidencia de que estas intervenciones prevengan la muerte, no está claro en la actualidad si tienen un impacto en la supervivencia a corto plazo. En una serie de cuatro pacientes con deficiencia de LAL tratados con trasplante de médula ósea, los cuatro pacientes fallecieron debido a complicaciones del procedimiento en cuestión de meses desde el trasplante.

55 [0006] Los pacientes con deficiencia de LAL también puede presentar más tarde en la vida un hígado predominante e implicación cardiovascular y esto a menudo se llama enfermedad por almacenamiento de ésteres de colesterol (CESD). En CESD, el hígado se ve muy afectado con hepatomegalia marcada, necrosis de los hepatocitos, la elevación de las transaminasas, la cirrosis y fibrosis. Debido a los mayores niveles de CE y TG, la hiperlipidemia y la aterosclerosis acelerada también se observan en la deficiencia de LAL. En particular, se describe una acumulación 60 de depósitos grasos en las paredes arteriales de forma precoz en la vida. Los depósitos estrechan el lumen arterial y puede conducir a la oclusión del vaso aumentando el riesgo de eventos cardiovasculares importantes, incluyendo infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares. La presentación del CESD es muy variable con algunos pacientes sin diagnosticar hasta que complicaciones que se manifiestan en la edad adulta tardía, mientras que otros pueden tener una disfunción hepática que se presenta en la infancia. La CESD se asocia con una menor esperanza 65 de vida y una mala salud significativa; la esperanza de vida de las personas con CESD depende de la gravedad de las complicaciones asociadas.

5 [0007] Las opciones actuales de tratamiento para el fenotipo de CESD se centran en el control de la acumulación de lípidos a través de dieta que excluye los alimentos ricos en colesterol y triglicéridos y la supresión de la síntesis de colesterol y la producción de apolipoproteína B a través de la administración de fármacos reductores del colesterol. Si bien puede observarse una cierta mejora clínica, las manifestaciones subyacentes de la enfermedad persisten y la progresión de la enfermedad persiste.

10 [0008] Las composiciones que contienen LAL recombinante humana derivada de diferentes fuentes se describen, por ejemplo, en la publicación PCT WO 2012/112681 A1 (purificada a partir de células humanas cultivadas); en la publicación de patente de Estados Unidos 2009/0297496 A1 (producida en *Pichia pastoris*); en la publicación PCT WO 01/56596 A1 (producida en *E. coli*); y en Ikeda et al., J. Biosci. Bioeng., 2004, 98 (5): 366-373 (producida en *S. pombe*). Ninguno de estos documentos da a conocer una LAL recombinante humana tal como se reivindica en el presente documento.

15 [0009] La producción de proteínas glicosiladas en aves transgénicas se da a conocer, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos 2010/0062982 A1 y en la publicación de patente de Estados Unidos 2009/0178147 A1. Ninguno de estos documentos da a conocer una LAL recombinante humana tal como se reivindica en el presente documento.

20 [0010] En la mayoría de los casos, el tratamiento de las deficiencias de LAL requiere un tratamiento de por vida. Además, debido al alto coste de las terapias con proteínas, es deseable administrar una cantidad mínima efectiva de agente terapéutico para tratar la deficiencia de LAL. Sin embargo, hasta la fecha, no existe una terapia efectiva para el tratamiento de la deficiencia de LAL, particularmente para los pacientes que sufren de la enfermedad de Wolman y CESD. Por lo tanto, existe una fuerte necesidad de una terapia eficaz con una frecuencia minimizada de la administración con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes. También hay una necesidad de una plataforma de producción de proteína robusta y de elevada expresión que pueda producir proteínas LAL que sean estables y estén eficientemente dirigidas al compartimento lisosomal en las células de los tejidos afectados en pacientes.

### 30 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

[0011] La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

35 [0012] En particular, la invención proporciona una lipasa ácida lisosomal humana recombinante aislada (rhLAL), teniendo la rhLAL una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO: 19, con N-glicanos unidos a los residuos de asparagina (Asn) que corresponden a Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup> de SEQ ID NO: 1, en la que la rhLAL no contiene O-glicanos, y en la que los N-glicanos unidos a los residuos de Asn que corresponden a SEQ ID NO: 1 son:

- 40 a) en Asn<sup>36</sup>, GlcNAc4Man3GlcNAc2, o  
 Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2;  
 b) en Asn<sup>72</sup>, sin glicosilación;  
 c) en Asn<sup>101</sup>, Phos2Man7GlcNAc2;  
 d) en Asn<sup>161</sup>, Phos1Man6GlcNAc2,

45 GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2;

Man3GlcNAc2;

GlcNAc2Man3 GlcNAc2;

GlcNAc3Man3 GlcNAc2;

GlcNAc4Man3GlcNAc2, o

50 Gal1GlcNAc4Man3 GlcNAc2;

e) en Asn<sup>273</sup>, Man7GlcNAc2,

55 Man8GlcNAc2,

Man9GlcNAc2,

PhoslMan8GlcNAc2, o

PhoslMan9GlcNAc2; y

- 60 f) en Asn<sup>321</sup>, GlcNAc2Man3GlcNAc2,  
 GlcNAc3Man3 GlcNAc2,  
 GlcNAc4Man3 GlcNAc2,  
 Gal1GlcNAc4Man3 GlcNAc2,  
 GlcNAc5Man3 GlcNAc2,  
 Gal1GlcNAc5Man3 GlcNAc2,  
 65 GlcNAc6Man3GlcNAc2, o

Gal1GlcNAc6Man3GlcNAc2; en donde

Man = manosa,

GlcNAc = N-Acetylglucosamina, Phos = fosfato, y

5 Gal = galactosa.

**[0013]** La presente invención proporciona también composiciones farmacéuticas que comprenden la rhLAL de la invención en una formulación que comprende adicionalmente portadores farmacéuticamente aceptables.

## 10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0014]** La información técnica expuesta a continuación puede traspasar el ámbito de la invención en algunos aspectos, que se define en las reivindicaciones adjuntas. Se proporciona la información técnica adicional para clasificar la invención reivindicada en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados.

**[0015]** En el presente documento se dan a conocer las composiciones de LAL que son particularmente útiles para ser utilizadas en la terapia, por ejemplo, en el tratamiento de condiciones asociadas a la deficiencia de LAL. Las moléculas de LAL dadas a conocer en el presente documento contienen estructuras de glicano particulares que proporcionan absorción eficiente y rápida en lisosomas de células, cuando se administran a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano.

**[0016]** En un aspecto de la divulgación, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL humana en la que un porcentaje sustancial de la LAL humana contiene al menos un resto glicano de manosa-6-fosfato, que puede servir como un ligando para la internalización por el receptor de manosa-6-fosfato en la superficie de células que se encuentran, por ejemplo, en los hepatocitos. En un ejemplo, el 30% o más, por ejemplo, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95 %, al menos el 97%, o al menos el 99%, de la LAL contenida en la composición contiene al menos un resto de manosa-6-fosfato. El resto de manosa-6-fosfato se puede encontrar, por ejemplo, en una estructura de N-glicano situada en uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en Asn<sup>15</sup>, Asn<sup>51</sup>, Asn<sup>80</sup>, Asn<sup>140</sup>, Asn<sup>252</sup> y Asn<sup>300</sup> de la SEQ ID NO: 2.

**[0017]** En otro aspecto de la divulgación, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL humana en las que un porcentaje sustancial de la LAL humana no contiene un resto de ácido siálico en cualquiera de sus estructuras de N-glicano, que a veces pueden interferir con la internalización de la enzima en las células. En un ejemplo, el 15% o menos, por ejemplo, el 10% o menos, el 5% o menos, el 2%, o menos, el 1% o menos, o esencialmente ninguna, de la LAL contenida en la composición contiene un resto de ácido siálico en cualquiera de sus estructuras de N-glicano.

**[0018]** En otro aspecto de la divulgación, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL humana, en las que un porcentaje sustancial de la LAL humana no contiene un resto de fucosa en cualquiera de sus estructuras de N-glicano. En un ejemplo, el 50% o menos, por ejemplo, el 50% o menos, el 40% o menos, el 30% o menos, el 20% o menos, el 10% o menos, el 5% o menos, el 2% o menos, el 1% o menos, o esencialmente ninguna, de la LAL contenida en la composición contiene un resto de fucosa en cualquiera de sus estructuras de N-glicano.

**[0019]** Los vectores, células huésped, sistemas de expresión y procedimientos asociados adecuados para producir las composiciones que contienen LAL se describen en este documento.

**[0020]** La LAL de la invención es LAL humana. En una realización, la LAL madura tiene la secuencia de aminoácidos de:

SGGKLTAVDPETNMNVSEIIISYWGPSEEYLVETEDGYILCLNRIPHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGL  
LADSSNWVTNLANSSSLGFILADAGFDVWMGNSRGNTWSRKHKTLVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPAS  
55 INFILNKTGQEQQVYYVGHSQGTTIGFIAFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDH  
LIKDLFGDKEFLPQSAFLKWLGTHVCTHVILKECGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDYTTHSPAGTS  
VQNMLHWSQAVKFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDWLADVYDVNIL  
60 LTQITNLVFHESIPEWEHLDFTIWGLDAPWRLYNKIINLMRKYQ (SEQ ID NO:2).

**[0021]** En otra realización, la LAL madura tiene la secuencia de aminoácidos de

# ES 2 950 358 T3

GKLTAVDPETNMNVSEIISYWGPSEEYLVETEDGYILCLNRIPHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGLLA  
 5 DSSNWVTNLANSLLGFILADAGFDVWMGNRGNTWSRKHKTLSVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASIN  
 FILNKTGQEQQVYYVGHSQGTTIGFIAFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDH  
 10 KDLFGDKEFLPQSAFLKWLGT HVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTHSPAGTSVQ  
 NMLHWSQAVKFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDWLADVYDVNILLT  
 QITNLVFHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIIINLMRKYQ (SEQ ID NO:3).

**[0022]** En otra realización, la LAL madura tiene la secuencia de aminoácidos de:

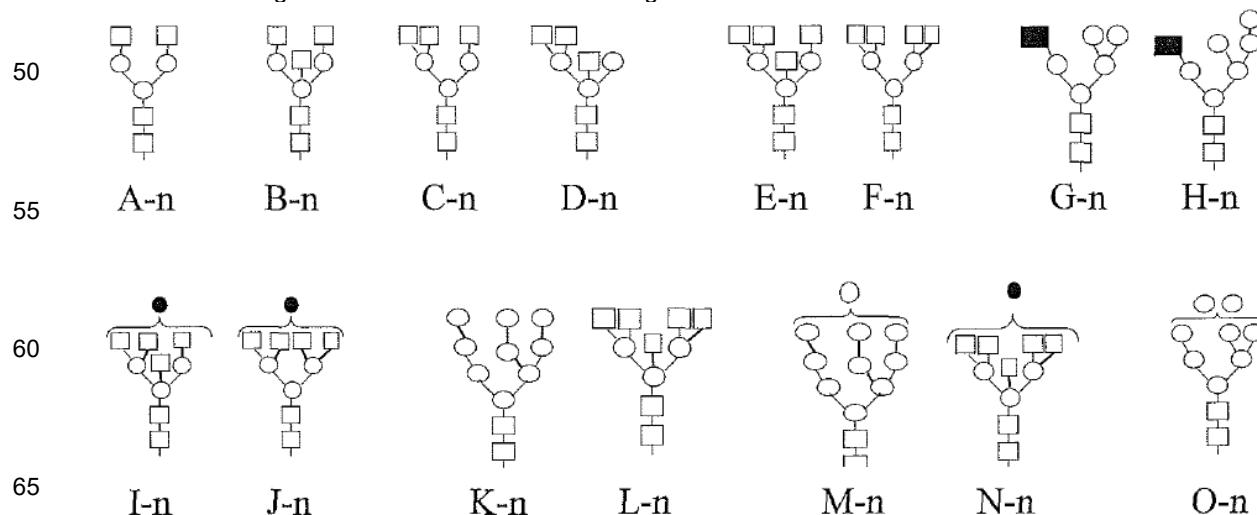
TAVDPETNMNVSEIISYWGPSEEYLVETEDGYILCLNRIPHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGLLADSS  
 NWVTNLANSLLGFILADAGFDVWMGNRGNTWSRKHKTLSVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFIL  
 20 NKTGQEQQVYYVGHSQGTTIGFIAFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDL  
 FGDKEFLPQSAFLKWLGT HVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTHSPAGTSVQNML  
 HWSQAVKFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDWLADVYDVNILLTQIT  
 25 NLVFHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIIINLMRKYQ (SEQ ID NO:4).

**[0023]** En otra realización, la LAL madura tiene la secuencia de aminoácidos de:

AVDPETNMNVSEIISYWGPSEEYLVETEDGYILCLNRIPHGRKNHSDKGPKPVVFLQHGLLADSSN  
 30 WVTNLANSLLGFILADAGFDVWMGNRGNTWSRKHKTLSVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILN  
 KTGQEQQVYYVGHSQGTTIGFIAFSQIPELAKRIKMFALGPVASVAFCTSPMAKLGRLPDHLIKDLF  
 GDKEFLPQSAFLKWLGT HVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVYTHSPAGTSVQNMLH  
 35 WSQAVKFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPPTYNVKDMLVPTAVWSGGHDWLADVYDVNILLTQITN  
 LVFHESIPEWEHLDFIWGLDAPWRLYNKIIINLMRKYQ (SEQ ID NO:19).

**[0024]** En otra realización, la LAL madura es una mezcla de al menos dos polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 19.

**[0025]** La descripción también proporciona composiciones que contienen las mezclas aisladas de un tipo individual de la molécula de proteína útil, tales como aquellas proteínas descritas en este documento, donde uno o más de las moléculas de proteína contenidas en la mezcla tienen una estructura de oligosacáridos específica unida, en particular una estructura de oligosacárido descrita en la presente documento. Por ejemplo, la descripción proporciona mezclas aisladas de moléculas de LAL, por ejemplo, moléculas de LAL humanas que contienen una molécula de LAL glicosilada con uno o más de las siguientes estructuras A-n a O-n:



cuadrado: N-acetyl glucosamina  
 cuadrado relleno: manosa 6-fosfato  
 5 círculo: manosa  
 círculo relleno: galactosa  
 triángulo relleno: fucosa

10 [0026] Según un aspecto de la presente descripción, una composición comprende cualquier individuo aislado o combinación de los polipéptidos descritos anteriormente. En un caso, la composición puede ser una composición farmacéutica, por ejemplo, de una formulación que comprende además portadores farmacéuticamente aceptables, de manera que la composición es, por ejemplo, adecuada para la administración en un sujeto (por ejemplo, un ser humano, particularmente un paciente que sufre de o está diagnosticado con una enfermedad). La composición se puede administrar mediante cualquier número de vías, incluyendo por administración intravenosa. En otro ejemplo, la composición puede comprender además un segundo agente. Dicho agente puede ser un medicamento, o un agente que puede influir o modificar un proceso biológico cuando se administra en un sujeto. Por ejemplo, el segundo agente puede ser un agente inmunomodulador. Dichos agentes inmunomoduladores pueden incluir cualquier agente que, cuando se administra junto (es decir, se administra al mismo tiempo que, o poco antes o después) con cualquiera de las composiciones LAL descritas en este documento, pueden tener el efecto de reducir la inmunogenicidad de la composición de LAL en el sujeto (por ejemplo, Rituximab, o cualquier otro anticuerpo que agota las células B).

15 [0027] Los procedimientos y composiciones para el tratamiento de los síntomas asociados con la deficiencia de LAL se describen también.

20 [0028] Los objetos y aspectos adicionales de la presente divulgación serán más evidentes tras la revisión de la descripción detallada expuesta a continuación cuando se toma conjuntamente con las figuras y secuencias que se acompañan.

### 25 30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

#### 35 [0029]

La figura 1 representa las secuencias de aminoácidos de LAL humana. La secuencia de aminoácidos de la hLAL recombinante muestra el 100% de homología con la LAL humana natural. La forma madura de hLAL está subrayada.

40 La figura 2 representa la secuencia de nucleótidos de hLAL recombinante, el transgén rhLAL de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA.

45 La figuras 3A y 3B representan diagramas de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA y su región proviral. La figura 3A representa un diagrama del vector de expresión del retrovirus de LAL humana usado en la producción de partículas de transducción (la secuencia de ADN del plásmido se encuentra en el Apéndice A). La figura 3A representa región proviral pALVIN-OVR1-I-hLAL-DSA que se ha integrado en el genoma. SIN LTR, repetición terminal larga autoinactivante; Potenciador DHSIII de OV, sitio III hipersensible de DNasa del gen de la ovoalbúmina; intrón de OV; región no traducida 5' y el intrón 1 de ovoalbúmina; hLAL, ADNc de LAL humana; Intrón de OV; región no traducida 3' y el intrón 1 de ovoalbúmina; gag parcial, gen de gag parcial; LTR, repetición terminal larga.

50 La figura 4 representa una secuencia de nucleótidos de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA.

55 La figura 5 representa una secuencia de nucleótidos de la región proviral de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA que se ha integrado en el genoma.

La figura 6 representa una secuencia de nucleótidos del vector pALVIN-1.1-OV-I.

60 La figura 7 representa una secuencia de nucleótidos del adaptador de rhLAL.

La figura 8 representa una secuencia de nucleótidos de rhLAL incluyendo el promotor de ovoalbúmina parcial.

65 La figura 9 representa una secuencia de nucleótidos de promotor de OVR1.

La figura 10 representa diagramas esquemáticos de las etapas utilizadas para construir el vector de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA.

70 La figura 11 representa un análisis de PCR en tiempo real de muestras de ADN de sangre de una descendencia transgénica G1 hemícigota de XLL109. Las señales procedentes de muestras de ADN duplicadas de la progenie G1 hemícigota, ILL7466, están indicadas por las curvas que parten de un aumento en Delta Rn antes del ciclo 22. Se muestran las curvas para dos progenies no transgénicas; estas curvas se quedan en o cerca de la línea de base durante por lo menos 34 ciclos.

75 Las figuras 12A-D ilustran el análisis Southern de los pollos G1 que llevan el transgén ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA. La figura 12A ilustra el esquema del transgén integrado y se muestran regiones genómicas flanqueantes con la posición conocida del sitio Blpl del transgén y la posición predicha de los sitios Blpl genómicos flanqueantes. La posición de la sonda del promotor de OV y la sonda de la secuencia codificante de hLAL (sonda hLAL) se indican mediante barras negras. Se muestran las posiciones de las bandas de 4,3 kb y 10,6 kb detectadas en el análisis de Southern, así como los tamaños predichos de las porciones genómicas y de transgenes de las bandas de 4,3 kb y 10,6 kb. La figura 12B ilustra una transferencia Southern de ADN genómico digerido con Blpl y sondada con la sonda de OV. WT CTRL es ADN genómico aislado de un pollo no transgénico. Los números de ID de los transgénicos G1 se

- indican por encima de los carriles. La posición y el tamaño (kb) de los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de la transferencia. La posición y el tamaño del fragmento de transgén detectado (4,3 kb) y gen de la ovoalbúmina endógeno (4,1 kb) se muestran a la derecha de la transferencia. La figura 12C representa una transferencia Southern que se sondó con la sonda de hLAL. La posición y el tamaño del fragmento de transgén detectado (10,6 kb) se muestran a la derecha de la transferencia. La figura 12D representa una sección de la imagen que se muestra en la figura 12B a una escala mayor para demostrar la presencia de las bandas de 4,1 y 4,3 kb.
- La figura 13A representa un esquema del transgén ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA. También se muestra el tamaño de las bandas ApaLI previstas para ser detectadas por la sonda de OV y la sonda de hLAL. La figura 13B representa el esquema de un análisis de transferencia Southern del transgén ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA para la confirmación del tamaño del transgén. La transferencia Southern de ADN genómico se digirió con ApaLI y se sondó con la sonda de OV (panel izquierdo) o la sonda de hLAL (panel derecho). WT CTRL es ADN genómico aislado de un pollo no transgénico. El número de ID de los G1s se indica por encima de cada carril. La posición y el tamaño (kb) de los marcadores de peso molecular se muestran a la izquierda de las transferencias. La posición y el tamaño de los fragmentos del transgén detectados (sonda de promotor de OV, 3,6 kb; sonda de hLAL, 3,8 kb) y el gen de la ovoalbúmina endógena (7,7 kb) se muestran a la derecha de las transferencias.
- La figura 14 representa un linaje de pollos transgénicos. Se muestran para cada pollo el número de generación (G0, G1 o G2), número de identificación, sexo y fecha de puesta. Otros pollos G1 son las de otros linajes.
- La figura 15 representa las etapas de purificación de hLAL de la clara de huevo.
- La figura 16 representa N-glicanos que se encuentran como una estructura de glicosilación unida a N en LAL producida de acuerdo con la descripción. Cuadrado, N-acetil glucosamina; Cuadrado relleno, manosa-6-fosfato; círculo, manosa; círculo relleno; galactosa; y triángulo relleno, fucosa.
- La figura 17 representa la posición relativa de sitios de N-glicano predichos indicados en el polipéptido LAL (flecha) expuestos en la SEQ ID NO: 1. Se muestran N-glicanos que son estructuralmente representativos de los detectados en cada sitio. Cuadrado, N-acetil glucosamina; cuadrado relleno, manosa-6-fosfato; círculo, manosa; círculo relleno; galactosa; y triángulo relleno, fucosa.
- La figura 18 representa N-glicanos fosforilados liberados por PNGasa y analizados por MALDI-TOF. Se muestran las estructuras.
- La figura 19 representa el efecto de la desfosforilación de LAL sobre el tiempo de retención mediante HPAEC-PAD de los N-glicanos. La LAL producida de acuerdo con la descripción se desfosforiló con fosfatasa alcalina bacteriana (cuadro superior) o sin tratar (panel inferior). Los N-glicanos liberados se analizaron mediante HPAEC-PAD.
- La figura 20 representa la colocalización de LAL recombinante humana (SBC-102) y el marcador lisosomal en los lisosomas de estas células examinadas por microscopía de fluorescencia confocal utilizando un modo de rastreo secuencial.
- La figura 21 representa la especificidad de unión de LAL recombinante humana (SBC-102) al receptor de GlcNAc/manosa evaluada mediante ensayos de unión competitiva utilizando la línea celular de macrófagos, NR8383.
- La figura 22 representa la actividad de LAL recombinante humana en células en células normales y células deficientes de LAL *in vitro*.
- La figura 23 representa el efecto del tratamiento con LAL recombinante humana (SBC-102) sobre la masa de órganos internos de ratas con deficiencia de LAL. El tamaño del órgano se representa como el porcentaje de peso corporal determinado a las 8 semanas de vida, en ratas LAL<sup>-/-</sup> y ratas LAL<sup>+/+</sup> después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 ea 5 mg/kg durante 4 semanas.
- La figura 24 representa el peso corporal en ratas de tipo natural y ratas deficientes en LAL después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 en 5 mg/kg durante 4 semanas. La administración de la dosis se destaca en el eje X mediante diamantes a partir de 4 semanas.
- La figura 25 muestra los niveles de colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos en hígado determinado a las 8 semanas de vida en ratas WT y de ratas con deficiencia de LAL después de la administración semanal de vehículo o LAL recombinante humana (SBC-102) a 5 mg/kg durante 4 semanas.
- La figura 26 representa el aumento del porcentaje en el peso corporal en ratas deficientes de LAL después de la administración durante 4 semanas de LAL recombinante humana (SBC-102) en los niveles y programación indicados, determinado a las 8 semanas de vida.
- La figura 27 muestra el peso del hígado, como el porcentaje del peso corporal, en ratas deficientes en LAL después de la administración durante 4 semanas de SBC-102 en los niveles y programación indicados, determinado a las 8 semanas de vida.
- La figura 28 muestra los niveles de ésteres de colesterol de tejidos en ratas deficientes de LAL después de la administración durante 4 semanas de SBC-102 en los niveles y programación indicados, determinado a las 8 semanas de vida.
- La figura 29 muestra el progreso diario en el aumento de peso de las ratas a las que se les administró 1 mg/kg de LAL por semana o 5 mg/kg de LAL por semana o 5 mg/kg de LAL por dos semanas.
- La figura 30 representa el examen patológico macroscópico de los animales tratados que muestra una normalización sustancial en el tamaño y el color del hígado, tal como puede observarse en la disección en los paneles superiores, y la histopatología del tejido hepático de LAL de las ratas tratadas que muestra una histología hepática normal en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con placebo en los paneles inferiores.

**Definiciones**

[0030] Ciertas definiciones se exponen en el presente documento para ilustrar y definir el significado y alcance de los diversos términos utilizados para describir la presente descripción.

5 [0031] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aceptable" con respecto a una formulación, composición o ingrediente, tal como se usa en el presente documento, significa que no tiene efecto perjudicial persistente sobre la salud general del sujeto que está siendo tratado.

10 [0032] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administración" o "administrar" se refiere a proporcionar una lipasa ácida lisosomal recombinante humana de la divulgación a un sujeto en necesidad de tratamiento.

15 [0033] Una "secuencia de ácido nucleico o de polinucleótido" incluye, pero no se limita a, secuencias de ARNm, ADNc, ADN genómico, y ADN y ARN sintéticos de eucariota, que comprende las bases de nucleósidos naturales adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. El término también abarca secuencias que tienen una o más bases modificadas.

20 [0034] El término "aviar", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier especie, subespecie o raza de organismo de la clase taxonómica ave, tales como, pero no limitado a pollo (gallina), pavo, pato, ganso, codorniz, faisanes, loros, pinzones, halcones, cuervos y aves corredoras, incluyendo aveSTRUZ, emú y el casuario. El término incluye varias cepas conocidas de la especie Gallus gallus, o pollos, (por ejemplo, White Leghorn, Brown Leghorn, Barred-Rock, Sussex, New Hampshire, Rhode Island, Australorp, Menorca, Amrox, California Gray), así como las cepas de pavos, faisanes, codornices, patos, aveSTRUZES y otras aves de corral criados habitualmente en cantidades comerciales. También incluye un organismo aviar individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo etapas embrionarias y fetales.

25 [0035] "Proteínas terapéuticas" o "proteínas farmacéuticas" incluyen una secuencia de aminoácidos que, en su totalidad o en parte, que forman un fármaco.

30 [0036] Una "secuencia codificante" o "marco de lectura abierto" se refiere a un polinucleótido o secuencia de ácido nucleico que puede ser transcrita y traducida (en el caso de ADN) o traducida (en el caso de ARNm) en un polipéptido in vitro o in vivo cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio de traducción en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de traducción en el extremo 3' (carboxi). Una secuencia de terminación de la transcripción normalmente se encuentra 3' con respecto a la secuencia codificante. Una secuencia codificante puede estar flanqueada en el extremo 5' y/o 3' por las regiones no traducidas.

35 [0037] "Exón" se refiere a esa parte de un gen que, cuando se transcribe en una transcripción nuclear, se "expresa" en el ARNm citoplasmico después de la eliminación de los intrones o secuencias intermedias mediante corte y empalme nuclear.

40 [0038] "Secuencias de control" nucleicos o "secuencias reguladoras" de ácido nucleico se refieren a secuencias promotoras, codones inicio y parada de la traducción, sitios de unión del ribosoma, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en dirección 5', potenciadores, y similares, según sea necesario y suficiente para la transcripción y traducción de una secuencia codificante determinada en una célula huésped definida. Los ejemplos de secuencias de control adecuadas para las células eucariotas son promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores. Todas estas secuencias de control no necesitan estar presentes en un vector recombinante, siempre que estén presentes las necesarias y suficientes para la transcripción y traducción del gen deseado.

45 [0039] "Unido operativamente" se refiere a la configuración de las secuencias codificantes y de control de modo que realicen la función deseada. De este modo, las secuencias de control unidas operativamente a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Una secuencia codificante está unida operativamente a, o bajo el control de, regiones reguladoras de la transcripción en una célula cuando la ADN polimerasa se une a la secuencia del promotor y transcribe la secuencia codificante en ARNm que puede traducirse en la proteína codificada. Las secuencias de control no necesitan ser contiguas con la secuencia codificante, siempre que funcionen para dirigir la expresión de la misma. De este modo, por ejemplo, las secuencias intermedias no traducidas pero transcritas pueden estar presentes entre una secuencia de promotor y la secuencia codificante y la secuencia de promotor todavía puede considerarse "unida operativamente" a la secuencia codificante.

50 [0040] Los términos "heteróloga" y "exógena" que se refieren a secuencias de ácido nucleico, tales como secuencias codificantes y secuencias de control, designan secuencias que normalmente no están asociadas con una región de una construcción recombinante o con un locus cromosómico particular y/o no están normalmente asociadas con una célula particular. Por lo tanto, una región "exógena" de una construcción de ácido nucleico es un segmento identificable de ácido nucleico dentro de o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región exógena de una construcción podría incluir

una secuencia codificante flanqueada por secuencias que no se encuentran en asociación con la secuencia codificante en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificante exógena es una construcción donde la secuencia codificante en sí no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). Del mismo modo, una célula huésped transformada con una construcción o ácido nucleico que no está normalmente presente en la célula huésped sería considerada exógena para los propósitos de esta divulgación.

[0041] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "N-glicano", "oligosacárido", "estructura de oligosacárido", "patrón de glicosilación", "perfil de glicosilación" y "estructura de glicosilación" tienen esencialmente el mismo significado y se refieren cada uno a una o más estructuras que se forman a partir de residuos de azúcar y están unidos a proteínas glicosiladas.

[0042] "Proteína exógena" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína no presente de forma natural en un tejido o célula particular, una proteína que es el producto de expresión de una construcción de expresión o transgén exógeno, o una proteína no presente de forma natural en una cantidad determinada en un tejido o célula particular. Una proteína que es exógena a un huevo es una proteína que normalmente no se encuentra en el huevo. Por ejemplo, una proteína exógena a un huevo puede ser una proteína que está presente en el huevo como un resultado de la expresión de una secuencia codificante presente en un transgén del animal que pone el huevo.

[0043] "Gen endógeno" se refiere a un gen de origen natural o fragmento del mismo que normalmente está asociado con una célula particular.

[0044] "LAL" significa "lipasa ácida lisosomal humana", "SBC-102" o "molécula de lipasa ácida lisosomal humana" y estos términos se utilizan indistintamente en toda la memoria.

[0045] Los productos de expresión descritos en este documento pueden consistir en material proteico que tiene una estructura química definida. Sin embargo, la estructura precisa depende de una serie de factores, en particular modificaciones químicas comunes a las proteínas. Por ejemplo, dado que todas las proteínas contienen grupos amino y carboxilo ionizables, la proteína se puede obtener en forma de sal ácida o básica, o en forma neutra. La secuencia de aminoácidos primaria puede derivarse usando moléculas de azúcar (glycosilación) o mediante otras derivatizaciones químicas que implican la unión covalente o iónico con, por ejemplo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares, que se producen a menudo a través de la asociación con los sacáridos. Estas modificaciones pueden producirse *in vitro* o *in vivo*, siendo este último realizado por una célula huésped a través de sistemas de procesamiento posttraduccionales. Tales modificaciones pueden aumentar o disminuir la actividad biológica de la molécula, y tales moléculas modificadas químicamente también pretenden estar dentro del alcance de la divulgación.

[0046] Procedimientos alternativos de clonación, amplificación, expresión y purificación serán evidentes para el experto en la materia. Procedimientos representativos se describen en Sambrook, Fritsch, y Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

[0047] "Vector" significa un polinucleótido compuesto por una sola hebra, de doble hebra, circular, o ADN superenrollado o ARN. Un vector típico puede estar compuesto por los siguientes elementos unidos operativamente a distancias apropiadas para permitir la expresión de genes funcionales: origen de replicación, promotor, potenciador, secuencia líder ARNm 5', sitio de unión ribosomal, casete de ácido nucleico, sitios de terminación y poliadenilación y secuencias de marcadores seleccionables. Uno o más de estos elementos pueden omitirse en aplicaciones específicas. El casete de ácido nucleico puede incluir un sitio de restricción para la inserción de la secuencia de ácido nucleico a expresar. En un vector funcional el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de ácido nucleico a expresar incluyendo los sitios de iniciación y terminación de la traducción. Un intrón puede estar opcionalmente incluido en la construcción, por ejemplo, 5' con respecto a la secuencia codificante. Un vector se construye de modo que la secuencia codificante particular se encuentra en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, siendo el posicionamiento y la orientación de la secuencia codificante con respecto a las secuencias de control tal que la secuencia codificante se transcribe bajo el "control" de las secuencias de control o secuencias reguladoras. La modificación de las secuencias que codifican la proteína particular de interés puede ser deseable para lograr este fin. Por ejemplo, en algunos casos puede ser necesario modificar la secuencia de modo que se puede unir a las secuencias control con la orientación apropiada; o mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras pueden ligarse a la secuencia codificante antes de la inserción en un vector. Alternativamente, la secuencia codificante puede clonarse directamente en un vector de expresión que ya contiene las secuencias control y un sitio de restricción apropiado que está en marco de lectura con y bajo el control regulador de las secuencias de control.

[0048] Un "promotor" es un sitio en el ADN al que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen. En algunos ejemplos, el promotor puede modificarse por la adición o delección de secuencias, o reemplazarse con secuencias alternativas, incluyendo secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Muchos promotores eucariotas contienen dos tipos de secuencias

de reconocimiento: la caja TATA y los elementos promotores en dirección 5'. El primero, situado en dirección 5' del sitio de iniciación de la transcripción, está implicado en dirigir la ARN polimerasa para iniciar la transcripción en el sitio correcto, mientras que el segundo aparece para determinar la velocidad de la transcripción y se encuentra en dirección 5' de la caja TATA. Los elementos potenciadores también pueden estimular la transcripción a partir de promotores unidos, pero muchos funcionan exclusivamente en un tipo de célula particular. Muchos elementos potenciador/promotor derivados de virus, por ejemplo, el promotor SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor de virus sarcoma de Rous (RSV), y el promotor de virus de la leucemia murina (MLV) son todos activos en una amplia gama de tipos de células, y se denominan "ubicuos". Alternativamente, los promotores no constitutivos, tales como el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) también se pueden usar en la presente divulgación. La secuencia de ácido nucleico insertada en el sitio de clonación puede tener cualquier marco de lectura abierto que codifique un polipéptido de interés, con la condición de que, cuando la secuencia codificante codifique un polipéptido de interés, debe carecer de los sitios de empalme crítico que pueden bloquear la producción de moléculas de ARNm adecuadas y/o producir moléculas de ARNm empalmadas o anormales de forma aberrante.

5 [0049] Tal como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a una mezcla de un compuesto descrito en el presente documento con otros componentes químicos, tales como portadores, estabilizantes, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, y/o excipientes.

10 [0050] El término "derivado de aves de corral" o "derivado aviar" se refiere a una composición o sustancia producida por u obtenida de aves de corral. "Aves de corral" se refiere a aves que se pueden mantener como ganado, incluyendo, pero no limitado a, pollos (gallinas), patos, pavos, codornices y aves corredoras. Por ejemplo, "derivado de aves de corral" puede referirse a derivado de pollo (gallina), derivado de pavo y/o derivado de codorniz.

15 [0051] Una "partícula retroviral" o "partícula de transducción" se refiere a un virus de replicación defectuosa, o de replicación competente capaz de transducir el ADN o ARN no viral en una célula. En un ejemplo particularmente útil, las partículas retrovirales utilizadas para producir aves transgénicas de acuerdo con la divulgación se preparan tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 7.524.626, concedidad el 28 de abril de 2009.

20 [0052] Los términos "transformación", "transducción" y "transfección" indican todos la introducción de un polinucleótido en una célula blastodérmica aviar. "Magnum" es la parte del oviducto entre el infundíbulo y el istmo que contiene células de glándulas tubulares que sintetizan y secretan las proteínas de la clara de huevo.

25 [0053] El término "transgén" se refiere a la secuencia de nucleótidos heteróloga insertada en un genoma aviar de acuerdo con la invención. "Transgen" puede referirse específicamente a una secuencia codificante exógena, una secuencia codificante exógena ligada a un promotor exógeno u otra secuencia reguladora, toda secuencia de nucleótidos entre dos LTRs retrovirales y/o LTRs retrovirales y secuencia de nucleótidos entre las LTR, en las que las LTRs son de un retrovirus utilizado para introducir el transgén.

30 [0054] El término "optimizado" se utiliza en el contexto de "secuencia codificante optimizada", en la que los codones utilizados con más frecuencia para cada aminoácido particular que se encuentran en las proteínas de la clara de huevo ovalbúmina, lisozima, ovomucoide, y ovotransferrina se utilizan en el diseño de la secuencia de polinucleótidos de interferón- $\alpha$  2b (IFN- $\alpha$  2b) humano que se inserta en vectores de la presente divulgación. Más específicamente, la secuencia de ADN para IFN- $\alpha$  2b optimizado humano se basa en el uso de codones optimizados de oviducto de gallina y se crea utilizando el programa BACKTRANSLATE del Paquete Wisconsin, Versión 9.1 (Genetics Computer Group Inc., Madison, Wis.) con una tabla de uso de codones compilada a partir de las proteínas ovalbúmina, lisozima, ovomucoide, y ovotransferrina de pollo (*Gallus gallus*). Por ejemplo, el porcentaje de uso para los cuatro codones del aminoácido alanina en las cuatro proteínas de la clara de huevo es del 34% para GCU, 31% para GCC, 26% para GCA, y 8% para GCG. Por lo tanto, se utiliza GCU como el codón para la mayoría de alaninas en una secuencia codificante optimizada. Los vectores que contienen el gen para la proteína humana optimizada se utilizan para producir aves transgénicas que expresan la proteína derivada de aves de corral transgénica en sus tejidos y huevos.

35 [0055] Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" abarca mamíferos y no mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, chimpancés, monos simios, ganado, caballos, ovejas, cabras, cerdos; conejos, perros, gatos, ratas, ratones, cobayas, y similares.

40 [0056] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a cualquier cantidad de un compuesto que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da como resultado un tratamiento mejorado, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución en la velocidad de avance de una enfermedad o trastorno. El término también incluye dentro de su alcance cantidades eficaces para potenciar la función fisiológica normal.

45 [0057] El término "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refiere a procedimientos para aliviar, disminuir o mejorar una enfermedad o síntomas de la afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas subyacentes de síntomas, inhibir la enfermedad o afección, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, provocar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una condición causada por la enfermedad o

afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección, ya sea profiláctica y/o terapéuticamente.

#### COMPOSICIONES DE LAL

5 [0058] La descripción generalmente se dirige a composiciones que comprenden enzimas útiles para la terapia, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal. En un aspecto, la descripción se dirige a enzimas de enfermedades de almacenamiento lisosomal, tal como LAL con un patrón de glicosilación que hace que la molécula sea susceptible de internalización por ciertos tipos de células. También se incluyen en la descripción proteínas humanas recombinantes, incluyendo LAL, en forma aislada o purificada. El aislamiento de las enzimas de la enfermedad de almacenamiento lisosomal (tal como LAL) se puede lograr mediante metodologías fácilmente evidentes para un experto en la técnica de purificación de proteínas. La invención proporciona una lipasa ácida lisosomal humana recombinante aislada (rhLAL), la rhLAL que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO: 19, con un modelo de glicosilación enlazado con N tal como se define en las reivindicaciones. La invención proporciona también composiciones farmacéuticas que comprenden tales rhLALs.

10 [0059] En un ejemplo, la descripción se refiere a enzimas de la enfermedad de almacenamiento lisosomal, incluyendo, pero no limitado a, LAL, que tiene un patrón de glicosilación unido a N descrita en el presente documento.

15 [0060] En un ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL humana, en las que un porcentaje sustancial de la LAL humana contienen un resto de glicano manosa-6-fosfato, que puede servir como un ligando para la internalización por el receptor de manosa-6-fosfato en la superficie de células que se encuentran, por ejemplo, en los hepatocitos. En un ejemplo, el 30% o más, por ejemplo, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, o al menos 99%, de la LAL contenida en la composición contiene al menos un resto de manosa-6-fosfato. El resto de manosa-6-fosfato se puede encontrar, por ejemplo, en una estructura de N-glicano situada en uno o más residuos seleccionados del grupo que consiste en Asn<sup>15</sup>, Asn<sup>51</sup>, Asn<sup>80</sup>, Asn<sup>140</sup>, Asn<sup>252</sup> y Asn<sup>300</sup> de la SEQ ID NO: 2. Las estructuras de glicano que contienen restos de manosa-6-fosfato incluyen, por ejemplo, G-n y H-n que se muestran en la figura 16.

20 [0061] La LAL recombinante humana de acuerdo con la presente divulgación contiene múltiples cadenas de carbohidratos unidas a N (por ejemplo, aproximadamente 5 o 6 cadenas de carbohidratos). Las estructuras de glicosilación unidas a N en cada uno de los cinco o seis sitios pueden seleccionarse entre una de A-n, B-n, C-n, D-n, E-n, F-n, G-n, H-n, I-n, J-n, K-n, L-n, M-n, N-n y O-n, tal como se muestra en la figura 16.

25 [0062] También se describe en el presente documento una mezcla de moléculas de LAL (por ejemplo, más de una molécula LAL puede estar presente en una mezcla, tal como las moléculas de LAL establecidas en las SEQ ID NOs: 2, 3, 4 y 19) en la que algunas o todas las moléculas de LAL tienen una o más estructuras de glicosilación seleccionadas entre Estructura A-n, Estructura B-n, Estructura C-n, Estructura D-n, Estructura E-n, Estructura F-n, Estructura G-n, Estructura H-n, Estructura E-n, Estructura J-n, Estructura K-n, Estructura L-n, Estructura de M-n, Estructura de N-n y estructura O-n (Figura 16). En un ejemplo, la mezcla de moléculas de lipasa ácida lisosomal está purificada o aislada, por ejemplo, aislada de un huevo o está purificada o aislada de clara de huevo producida en un ave transgénica.

30 [0063] La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura A-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura B-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura C-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura D-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura E-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura F-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura G-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura H-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura I-a. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura J-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura K-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura L-n. La descripción también incluye una molécula de lipasa ácida lisosomal individual que comprende una estructura M-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura N-n. La descripción también incluye una molécula de LAL individual que comprende una estructura O-n.

35 [0064] Los oligosacáridos unidos a N unidos a LAL humana de acuerdo con la presente descripción tienen una escasez de residuos de ácido siálico y galactosa terminales. Es decir, sólo cantidades menores de las estructuras de oligosacáridos unidos a N están terminalmente sialilados y pocos residuos de galactosa están presentes. Además, N-acetil glucosamina (GlcNAc) terminal está presente en gran medida en las estructuras de oligosacáridos unidos a N de la LAL descrita en el presente documento. Por tanto, la LAL producida de acuerdo con la descripción puede dirigirse a células tales como los macrófagos monocitos y células de Kupffer.

- [0065] Un aspecto de la divulgación proporciona composiciones de LAL que esencialmente no contiene ácido siálico. En otro aspecto, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL recombinante humana, en las que un porcentaje sustancial de la LAL humana no contiene un resto de ácido siálico en cualquiera de sus estructuras de N-glicano, que pueden interferir con la internalización de la enzima en las células. En un ejemplo, el 15% o menos, por ejemplo, 10% o menos, 5% o menos, 2% o menos, 1% o menos, o esencialmente ninguna, de la LAL contenida en la composición contiene un resto de ácido siálico en cualquiera de sus estructuras de N-glicano.
- [0066] En otro caso, aproximadamente el 95% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual no contienen ácido siálico. En otro caso, aproximadamente el 90% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual no contienen ácido siálico. En otro caso, aproximadamente el 80% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual no contienen ácido siálico. En otro caso, más de aproximadamente el 70% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual no contienen ácido siálico.
- [0067] En otro ejemplo adicional, esencialmente ninguno de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen ácido siálico. En otro ejemplo, aproximadamente 90% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N que se encuentran asociados con las moléculas de LAL no contienen ácido siálico. Por ejemplo, si hay 20 tipos de estructuras de oligosacárido, entonces 18 o más de los tipos de estructuras no contienen ácido siálico. En otro ejemplo, aproximadamente el 80% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N que se encuentran asociados con las moléculas de LAL no contienen ácido siálico. En otro ejemplo, aproximadamente el 70% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N que se encuentran asociados con las moléculas de LAL no contienen ácido siálico. En otro ejemplo, aproximadamente el 60% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N que se encuentran asociados con las moléculas de LAL no contienen ácido siálico. En otro ejemplo, aproximadamente el 50% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N que se encuentran asociados con las moléculas de LAL no contienen ácido siálico.
- [0068] De acuerdo con un aspecto de la divulgación, la LAL, tal como se describe en el presente documento, contiene altos niveles de N-acetil glucosamina terminal. En un aspecto, aproximadamente el 95% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro caso, aproximadamente el 90% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro caso, aproximadamente el 80% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro caso, aproximadamente el 70% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro caso, aproximadamente el 60% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro caso, aproximadamente el 50% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual contienen una N-acetil glucosamina terminal.
- [0069] En un ejemplo, todos los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro ejemplo, aproximadamente el 90% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal. Por ejemplo, si hay 20 tipos de estructuras de oligosacáridos, entonces 18 o más de los tipos de estructuras no contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro ejemplo, aproximadamente el 80% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro ejemplo, aproximadamente el 70% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro ejemplo, aproximadamente el 60% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal. En otro ejemplo, aproximadamente el 50% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen una N-acetil glucosamina terminal.
- [0070] En otro aspecto de la divulgación, las composiciones descritas en el presente documento comprenden LAL humana en la que un porcentaje sustancial de la LAL humana no contiene un resto de fucosa en cualquiera de su estructuras de N-glicano. En un ejemplo, el 50% o menos, por ejemplo, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos, 20% o menos, 10% o menos, 5% o menos, 2% o menos, el 1% o menos, o esencialmente ninguna, de la LAL contenida en la composición contiene un resto de fucosa en cualquiera de sus estructuras de N-glicano.
- [0071] En un caso, la fucosa no está esencialmente presente en las estructuras de oligosacáridos unidos a N de la LAL producida de acuerdo de la descripción. En otro caso, aproximadamente el 95% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 90% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 85% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 80% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la

molécula de LAL individual no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 70% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 60% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la molécula de LAL individual no contienen fucosa. En otro caso, aproximadamente el 50% o más de los oligosacáridos unidos a N presentes en la LAL no contienen fucosa.

- 5 [0072] En un ejemplo, esencialmente ninguno de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL contienen fucosa. En otro ejemplo, aproximadamente el 95% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL no contienen fucosa. Por ejemplo, si hay 20 tipos de estructuras de oligosacárido, entonces 19 o más de los tipos de estructuras no contienen fucosa. En otro ejemplo, aproximadamente el 90% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL no contienen fucosa. En otro ejemplo, aproximadamente el 85% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL no contienen fucosa. En otro ejemplo, aproximadamente el 80% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en las moléculas de LAL no contienen fucosa. En otro ejemplo, aproximadamente el 70% o más de los tipos de estructuras de oligosacáridos unidos a N presentes en moléculas de LAL no contienen fucosa.

10 [0073] Como se discutió anteriormente, ciertos monosacáridos están abundantemente presentes en moléculas de LAL producidas de acuerdo con la presente descripción. Las especies totales de monosacáridos analizados incluyen fucosa, N-acetil galactosamina, N-acetil glucosamina, galactosa, glucosa, manosa, manosa-6-fosfato, ácido N-acetil neuramínico y ácido N-glicolil neuramínico. La fucosa puede estar presente entre aproximadamente el 0% y aproximadamente el 1% de la composición total de monosacáridos. La N-acetil galactosamina puede estar presente entre aproximadamente el 0% y aproximadamente el 1% de la composición total de monosacáridos. La N-acetil glucosamina puede estar presente entre aproximadamente el 35% y aproximadamente el 50% de la composición total de monosacáridos. La galactosa puede estar presente entre aproximadamente el 1 y el 10% de la composición total de monosacáridos. La glucosa está presente en el 0% de la composición total de monosacáridos. La manosa está presente entre aproximadamente el 32% y aproximadamente el 50% de la composición total de monosacáridos. La manosa-6-fosfato está presente entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 11% de la composición total de monosacáridos.

15 [0074] En un ejemplo, la LAL producida de acuerdo con la presente descripción no contiene ninguna xirosa. Además, debido a que esencialmente no hay N-acetilgalactosamina (GalNAc) en la LAL producida de acuerdo con la descripción, un aspecto de la divulgación incluye una composición de LAL que no tiene glicosilación con unión a O. La rhLAL de la invención reivindicada no contiene O-glicanos.

20 [0075] La LAL tiene 6 sitios potenciales en su secuencia de aminoácidos para la glicosilación unida a N, por ejemplo, Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>72</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup>, y Asn<sup>321</sup> como en la SEQ ID NO: 1. Cinco de ellos, Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup> están glicosilados mientras que Asn<sup>72</sup> puede estar no glicosilado o sustancialmente no glicosilado (sustancialmente no glicosilado significa en una mezcla de moléculas de LAL, menos Asn<sup>72</sup> están glicosilados que cualquiera de Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup>) (véase la Figura 17). Por consiguiente, un aspecto de la descripción es una composición de LAL que no está glicosilada y/o sustancialmente glicosilada en Asn<sup>72</sup>. La LAL que tiene una Asn<sup>72</sup> glicosilada está dentro del alcance de la descripción. Las posiciones de Asn descritas en este documento están basadas en la secuencia de aminoácidos de LAL expuesta en la SEQ ID NO: 1. Será evidente para los expertos en la técnica que la numeración de Asn (es decir, la posición de la asparagina) puede variar dependiendo de la molécula de LAL individual y puede determinarse fácilmente en otras moléculas de LAL, tales como aquellas cuyas secuencias de aminoácidos se exponen en las SEQ ID NOs: 2, 3, 4 y 19.

25 [0076] Las moléculas de LAL producidas de acuerdo con la presente descripción contienen estructuras de N-glicano que comprenden una mezcla de estructuras bi-, tri- y tetraantennarias con N-acetilglucosamina, manosa y manosa-6-fosfato (M6P) como los principales azúcares (Figuras 16 y 17). Según un aspecto de la descripción, los N-glicanos modificados con M6P residen al menos en Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>273</sup>. De este modo, un ejemplo de la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene N-glicanos modificados con M6P que residen en cualquiera de Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup> o Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene N-glicanos modificados con M6P que residen en Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tienen N-glicanos monofosforilados (M6P) que residen en cualquiera de Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup> o Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene N-glicanos monofosforilados que residen en Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene N-glicanos monofosforilados que residen en Asn<sup>101</sup> y Asn<sup>273</sup>. En un caso específico, una LAL producida de acuerdo con la presente descripción pueden contener manosa bifosforilado (bis-M6P) en Asn<sup>101</sup>.

30 [0077] Las moléculas de LAL producidas de acuerdo con la presente descripción contienen niveles reducidos de galactosa (por ejemplo, "Gal"). Un aspecto de la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene galactosa terminal en cualquiera de Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>161</sup> o Asn<sup>321</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene galactosa terminal en Asn<sup>36</sup> y Asn<sup>161</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene galactosa terminal en Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>321</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene galactosa terminal en Asn<sup>36</sup> y Asn<sup>321</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene galactosa terminal en Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>321</sup>. En otro caso, la

presente descripción incluye una composición de LAL que no tiene galactosa terminal.

**[0078]** Se encontraron varios tipos de N-glicanos en LAL en diferentes sitios de glicosilación unidos a N. Las estructuras de N-glicano incluyen una mezcla de estructuras bi-, tri- y tetraantennarias con N-acetilglucosamina, manosa y manosa-6-fosfato (M6P) como los principales azúcares. Específicamente, en un ejemplo de la presente divulgación, LAL contiene una estructura de N-glicano seleccionada de GlcNAc4Man3GlcNAc2 o Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2 en el primer sitio de glicosilación unido a N (Asn<sup>36</sup> como en la SEQ ID NO: 1). En otro ejemplo, LAL no contiene ninguna glicosilación o no está sustancialmente glicosilada en el segundo sitio de glicosilación unido a N (por ejemplo, Asn<sup>72</sup> como en la SEQ ID NO: 1). En aún otro ejemplo, la LAL contiene Phos2Man7GlcNAc2 en su tercer sitio de glicosilación unido a N (por ejemplo, Asn<sup>101</sup> como en la SEQ ID NO: 1). En aún otro ejemplo, la LAL contiene una estructura de N-glicano seleccionado de Phos1Man6GlcNAc2, GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2, Man3GlcNAc2, GlcNAc2Man3GlcNAc2, GlcNAc3Man3GlcNAc2, GlcNAc4Man3GlcNAc2, o Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2 en su cuarto sitio de glicosilación unido a N (por ejemplo, Asn<sup>161</sup> como en SEQ ID NO: 1). En aún otro ejemplo, la LAL contiene una estructura de N-glicano seleccionado de Man7GlcNAc2, Man8GlcNAc2, Man9GlcNAc2, Phos1Man8GlcNAc2, o Phos1Man9GlcNAc2 en su quinto sitio de glicosilación unido a N (por ejemplo, Asn<sup>273</sup> como en SEQ ID NO: 1). En aun otro ejemplo, la LAL contiene un estructura de N-glicano seleccionado de GlcNAc2Man3GlcNAc2, GlcNAc3Man3GlcNAc2, GlcNAc4Man3GlcNAc2, Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2, GlcNAc5Man3 GlcNAc2, Gal1GlcNAc5Man3GlcNAc2, GlcNAc6Man3GlcNAc2, o Gal1GlcNAc6Man3GlcNAc2 en su sexto sitio de glicosilación unido a N (Asn<sup>321</sup> como en SEQ ID NO: 1).

**[0079]** De acuerdo con la invención, la LAL está glicosilada en Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup> de la SEQ ID NO : 1 (o los correspondientes residuos de asparagina dentro de las SEQ ID NOs: 2, 3, 4, y 19) con un N-glicano en la posición de Asn designada como se muestra a continuación:

a) en Asn<sup>36</sup>, GlcNAc4Man3GlcNAc2, o

Gal1 GlcNAc4Man3GlcNAc2;

b) en Asn<sup>72</sup>, sin glicosilación;

c) en Asn<sup>101</sup>, Phos2Man7GlcNAc2;

d) en Asn<sup>161</sup>, Phos1Man6GlcNAc2,

GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2;

30 Man3GlcNAc2;

GlcNAc2Man3GlcNAc2;

GlcNAc3Man3GlcNAc2;

GlcNAc4Man3GlcNAc2, o

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2;

35 e) en Asn<sup>273</sup>, Man7GlcNAc2,

Man8GlcNAc2,

Man9GlcNAc2,

Phos1Man8GlcNAc2, o

Phos1Man9GlcNAc2; y

40 f) en Asn<sup>321</sup>, GlcNAc2Man3GlcNAc2,

GlcNAc3Man3GlcNAc2,

GlcNAc4Man3GlcNAc2,

Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2,

GlcNAc5Man3GlcNAc2,

45 Gal1GlcNAc5Man3GlcNAc2,

GlcNAc6Man3GlcNAc2, o

Gal1GlcNAc6Man3GlcNAc2,

donde Man = manosa,

50 GlcNAc = N-acetyl glucosamina,

Phos = fosfato y

Gal = galactosa.

**[0080]** En una realización, Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2 se puede encontrar como un componente glicano en cualquiera de Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>161</sup> o Asn<sup>321</sup> en LAL producido de acuerdo con la invención. En una realización específica, Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2 se puede encontrar como un componente glicano de Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>321</sup>.

**[0081]** En la LAL de la presente descripción, Asn<sup>101</sup> y Asn<sup>273</sup> muestran del tipo manosa de contenido elevado que tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 moléculas de manosa (MAN6-MAN10 como se describe en el presente documento) como principal componente. Por consiguiente, un aspecto de la presente descripción incluye una composición de LAL tiene una estructura con alto contenido de manosa en Asn<sup>101</sup> o Asn<sup>273</sup>. En otro caso, una composición de LAL de la descripción puede comprender una estructura de N-glicano que tiene al menos 6 manosas en Asn<sup>101</sup> o Asn<sup>273</sup>. En otro caso, una composición de LAL contiene un N-glicano que tiene 7, 8 o 9 manosas en Asn<sup>101</sup> o Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene 7, 8 o 9 manosas en Asn<sup>101</sup> y Asn<sup>273</sup>. En otro caso, la presente descripción incluye una composición de LAL que tiene 7, 8 o 9 manosas en Asn<sup>101</sup> y/o Asn<sup>273</sup> y al menos una de las manosas está fosforilada.

[0082] Se ha de entender que los sitios de glicosilación y los números asociados con Asn descritos anteriormente se basan en la secuencia de aminoácidos de LAL expuesta en la SEQ ID NO: 1 y que los perfiles de glicosilación descritos anteriormente en el contexto de la SEQ ID NO: 1 se aplican también a las moléculas de LAL establecidas en las SEQ ID NOs: 2, 3, 4 y 19, aunque la numeración de las correspondientes Asn puede variar por molécula LAL. Por ejemplo, Asn<sup>36</sup> en la SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>15</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>13</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>10</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>9</sup> en la SEQ ID NO: 19. Asn<sup>72</sup> en la SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>51</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>49</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>46</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>45</sup> en SEQ ID NO: 19. Asn<sup>101</sup> en la SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>80</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>78</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>75</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>74</sup> en SEQ ID NO: 19. Asn<sup>161</sup> en la SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>140</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>138</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>135</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>134</sup> en SEQ ID NO: 19. Asn<sup>273</sup> de SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>252</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>250</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>247</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>246</sup> en SEQ ID NO: 19. Asn<sup>321</sup> de la SEQ ID NO: 1 corresponde a Asn<sup>300</sup> en la SEQ ID NO: 2, Asn<sup>298</sup> en la SEQ ID NO: 3, Asn<sup>295</sup> en la SEQ ID NO: 4 y Asn<sup>294</sup> en SEQ ID NO: 19.

[0083] Por ejemplo, en un ejemplo, la LAL está glicosilada unida a N en como mínimo una posición seleccionada entre el grupo que consiste en Asn<sup>15</sup>, Asn<sup>51</sup>, Asn<sup>80</sup>, Asn<sup>140</sup>, Asn<sup>252</sup> y Asn<sup>300</sup> de la SEQ ID NO: 2. En otro ejemplo, la LAL está glicosilada unida a N en Asn<sup>15</sup>, Asn<sup>80</sup>, Asn<sup>140</sup>, Asn<sup>252</sup> y Asn<sup>300</sup> de la SEQ ID NO: 2. En otro ejemplo adicional, las estructuras de N-glicano de LAL de la SEQ ID NO: 2 no tienen xilosa, mientras que menos del 15%, 10%, 5%, o 1% de las estructuras de N-glicano contiene ácido siálico; menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% de las estructuras de N-glicano contienen fucosa; y al menos el 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 95% de las estructuras de N-glicano contiene manosa fosforilada (M6P).

[0084] En un caso, la LAL está glicosilada unida a N al menos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en Asn<sup>13</sup>, Asn<sup>49</sup>, Asn<sup>78</sup>, Asn<sup>138</sup>, Asn<sup>250</sup> y Asn<sup>298</sup> de la SEQ ID NO: 3. En otro caso, la LAL está glicosilada unida a N en Asn<sup>13</sup>, Asn<sup>78</sup>, Asn<sup>138</sup>, Asn<sup>250</sup> y Asn<sup>298</sup> de la SEQ ID NO: 3. En otro caso, las estructuras de N-glicano de LAL de la SEQ ID NO: 3 no tienen xilosa mientras que menos del 15%, 10%, 5%, o 1% de las estructuras de N-glicano contienen ácido siálico; menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% de las estructuras de N-glicano contienen fucosa; y al menos el 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 95% de las estructuras de N-glicano contienen manosa fosforilada (M6P).

[0085] En un caso, la LAL está glicosilada unida a N al menos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en Asn<sup>10</sup>, Asn<sup>46</sup>, Asn<sup>75</sup>, Asn<sup>135</sup>, Asn<sup>247</sup> y Asn<sup>295</sup> de la SEQ ID NO: 4. En otro caso, la LAL está glicosilada unida a N en Asn<sup>10</sup>, Asn<sup>75</sup>, Asn<sup>135</sup>, Asn<sup>247</sup> y Asn<sup>295</sup> de la SEQ ID NO: 4. En otro caso, las estructuras de N-glicano de LAL de la SEQ ID NO: 4 no tienen xilosa mientras que menos del 15%, 10%, 5%, o 1% de las estructuras de N-glicano contienen ácido siálico; menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% de las estructuras de N-glicano contienen fucosa; y al menos el 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 95% de las estructuras de N-glicano contienen manosa fosforilada (M6P).

[0086] En un caso, la LAL está glicosilada unida a N al menos en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en Asn<sup>9</sup>, Asn<sup>45</sup>, Asn<sup>74</sup>, Asn<sup>134</sup>, Asn<sup>246</sup> y Asn<sup>294</sup> de la SEQ ID NO: 19. En otro caso, la LAL está glicosilada unida a N en Asn<sup>9</sup>, Asn<sup>74</sup>, Asn<sup>134</sup>, Asn<sup>246</sup> y Asn<sup>294</sup> de la SEQ ID NO: 19. En otro caso, las estructuras de N-glicano de LAL de la SEQ ID NO: 4 no tienen xilosa mientras que menos del 15%, 10%, 5%, o 1% de las estructuras de N-glicano contienen ácido siálico; menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% de las estructuras de N-glicano contienen fucosa; y al menos el 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 95% de las estructuras de N-glicano contienen manosa fosforilada (M6P).

[0087] La composición de acuerdo con la presente divulgación se puede producir de un número de maneras, incluyendo mediante el uso de aves transgénicas, peces transgénicos, mamíferos transgénicos, por ejemplo, cabras transgénicas o en plantas transgénicas, tales como el tabaco y la lenteja de agua (*Lemna minor*) y ciertos tipos de cultivo celular.

[0088] La presente divulgación también contempla composiciones que comprenden LAL PEGilada. La enzima LAL como se describe en el presente documento puede estar PEGilada tal como se describe, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos Nº 20070092486, publicada el 26 de abril de 2007.

[0089] En un ejemplo, el patrón de glicosilación derivado se obtiene a través de expresión de sistemas de expresión especializados, por ejemplo, a partir de células de oviducto aviar, por ejemplo, células de glándulas tubulares. Por ejemplo, los patrones de glicosilación descritos en este documento se ha demostrado que están presentes en las enzimas de enfermedad de almacenamiento lisosomal producidas en células de oviducto de un ave, tal como un pollo de acuerdo con la presente descripción.

[0090] Las proteínas producidas de acuerdo con la descripción pueden purificarse a partir de clara de huevo mediante cualquier procedimiento útil, tales como los evidentes para un experto en la técnica de purificación de proteínas. Por ejemplo, la LAL humana (hLAL) producida en aves transgénicas de acuerdo con la descripción puede purificarse a partir de clara de huevo por procedimientos evidentes para los expertos en la técnica de purificación de

proteínas. Un ejemplo de un protocolo de purificación para LAL presente en la clara de huevo se describe en los Ejemplos.

5 [0091] La descripción incluye los huevos y la clara de huevo y las aves (por ejemplo, pavo, pollo (gallina) y codorniz) que ponen los huevos y producen la clara de huevo que contiene moléculas de lipasa ácida lisosomal que comprenden una o más de las estructuras de glicosilación descritas en este documento.

#### EXPRESIÓN DE LAL EN AVES

10 [0092] Se da a conocer en el presente documento vectores y procedimientos para la introducción estable de secuencias de ácido nucleico exógeno en el genoma de aves para expresar proteínas deseadas, tales como las que se benefician (por ejemplo, alcanzan una mayor eficacia) de la adición de manosa-6-fosfato, tales como enzimas lisosomales, incluyendo, sin limitación, la lipasa ácida lisosomal (LAL) y otras proteínas tales como las descritas específicamente en este documento. En particular, se producen aves transgénicas que expresan secuencias exógenas en sus oviductos y que depositan proteínas exógenas, tales como proteínas farmacéuticas, en sus huevos. Los huevos de aves que contienen tales proteínas exógenas también se describen en este documento. También se describen en este documento nuevas formas de LAL que se expresan de manera eficiente en el oviducto de aves transgénicas y se depositan en los huevos de aves.

20 [0093] Un aspecto de la descripción se refiere a composiciones que contienen LAL, es decir, moléculas LAL producidas de acuerdo con la descripción. En un ejemplo particularmente útil, la LAL está purificada o aislada. Por ejemplo, la LAL se ha extraído del contenido de un huevo con cáscara dura puesto por un ave transgénica. En un caso particularmente útil, la LAL es LAL humana. En una realización, la LAL tiene un patrón de glicosilación resultante de la producción de LAL en una célula de oviducto de un ave. Por ejemplo, las composiciones pueden contener una mezcla de moléculas de LAL producidas en aves, por ejemplo, pollos, de acuerdo con la descripción y aislados de clara de huevo. En un ejemplo útil, las composiciones que contienen LAL son formulaciones farmacéuticas.

30 [0094] En un ejemplo, la divulgación proporciona composiciones que contienen moléculas de LAL aisladas, por ejemplo, moléculas de LAL humanas, en las que la LAL se produce en un ave que contiene un transgén que codifica la LAL. En un ejemplo, la LAL se produce en una célula de oviducto (por ejemplo, una célula de glándula tubular) de un ave transgénica (por ejemplo, pollo transgénico) y la LAL se aísla de clara de huevo del ave transgénica. En un ejemplo, la LAL está glicosilada en la célula del oviducto (por ejemplo, célula de la glándula tubular) del ave, por ejemplo, un pollo.

35 [0095] Se proporcionan procedimientos para producir proteínas exógenas, tales como enzimas de la enfermedad de almacenamiento lisosomal, por ejemplo, LAL, en tejidos específicos de aves. Tales proteínas exógenas se pueden expresar en el oviducto, la sangre y/o otras células y tejidos del ave. En un caso, los transgenes se introducen en células blastodérmicas embrionarias, por ejemplo, cerca de la etapa X, para producir un ave transgénica, de manera que la proteína de interés se expresa en las células de glándulas tubulares del magnum del oviducto, se secreta en el lumen y se deposita en la clara de huevo de un huevo con cáscara dura. Un ave transgénica así producida puede llevar el transgén en su línea germinal proporcionando la transmisión de un transgén exógeno a la descendencia del ave de manera estable de una manera mendeliana.

45 [0096] La presente descripción abarca procedimientos de producción de proteína exógena, tal como LAL, en un oviducto aviar. Los procedimientos pueden incluir una primera etapa de proporcionar un vector que contiene una secuencia codificante y un promotor unido operativamente a la secuencia codificante, de modo que el promotor puede efectuar la expresión del ácido nucleico en el oviducto aviar. Se pueden producir células y/o tejidos transgénicos, en los que el vector se introduce en células blastodérmicas embrionarias aviares, ya sean recién aisladas, en cultivo, o en un embrión, de modo que la secuencia del vector se inserta en el genoma aviar. Un ave transgénico maduro que expresa la proteína exógena, tal como LAL, en su oviducto puede derivar de las células y/o tejidos transgénicos.

55 [0097] En un aspecto de la descripción, la producción de un ave transgénica se logra mediante la transducción de células blastodérmicas embrionarias con partículas retrovirales de replicación defectuosa o competente que portan el transgén entre las LTR 5' y 3' del vector retroviral. Por ejemplo, se pueden usar un vector retroviral del virus de la leucosis aviar (ALV) o un vector retroviral del virus de la leucemia murina (MLV), que comprende un plásmido pNLB modificado que contiene un gen exógeno que se inserta en dirección 3' de un segmento de una región del promotor. Se puede utilizar una copia de ARN del vector retroviral modificado, empaquetado en partículas virales, para infectar blastodermos embrionarios que se desarrollan en aves transgénicas.

60 [0098] Otro aspecto de la descripción proporciona un vector que incluye una secuencia codificante y un promotor en relación operativa y de posición de tal manera que la secuencia codificante se expresa en un oviducto aviar. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, un vector retroviral del virus de la leucosis aviar (ALV), un vector retroviral del virus de la leucemia murina (MLV) y un vector de lentivirus. Adicionalmente, el vector puede ser una secuencia de ácido nucleico que incluye una LTR de un vector retroviral del virus de la leucosis aviar (ALV), un vector retroviral del

virus de la leucemia murina (MLV) o un vector de lentivirus. El promotor es suficiente para efectuar la expresión de la secuencia codificante en el oviducto aviar. La secuencia codificante codifica una proteína exógena que se deposita en la clara del huevo de un huevo con cáscara dura. Por tanto, la secuencia codificante codifica proteínas exógenas, tales como proteínas derivadas de ave de corral transgénica, tales como lipasa ácida lisosomal derivada de aves de corral transgénicas (TPD LAL).

[0099] En un caso, los vectores utilizados en los procedimientos de la divulgación contienen un promotor que es particularmente adecuado para la expresión de proteínas exógenas en las aves y sus huevos. Por tanto, la expresión de la secuencia codificante exógena se puede producir en el oviducto y la sangre del ave transgénica y en la clara de huevo de su huevo aviar. Los promotores incluyen, pero no se limitan a, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), un promotor de  $\beta$ -actina (por ejemplo, un promotor de  $\beta$ -actina de pollo), un promotor del virus de la leucemia murina (MLV), un promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), un promotor de la ovoalbúmina, un promotor de la lisozima, un promotor de conalbúmina, un promotor de ovomucoide, un promotor de ovomucina y un promotor de la ovotransferrina. Opcionalmente, el promotor puede ser un segmento de al menos una región de promotor, tal como un segmento de la región del promotor de ovoalbúmina, lisozima, conalbúmina, ovomucoide, ovomucina, y ovotransferrina. En un caso, el promotor es una combinación o una fusión de uno o más promotores o una fusión de una porción de uno o más promotores, tales como promotores de ovoalbúmina, lisozima, conalbúmina, ovomucoide, ovomucina, y ovotransferrina.

[0100] En un caso, el vector incluye una secuencia codificante de péptido señal que está operativamente ligada a la secuencia codificante, de modo que después de la traducción en una célula, el péptido señal dirige la secreción de la proteína exógena expresada por el vector, tal como un LAL humana, en la clara de huevo de un huevo con cáscara dura.

[0101] Un aspecto de la descripción proporciona secuencias codificantes para proteínas exógenas producidas, tal como se describe en el presente documento, en las que la secuencia codificante tiene codones optimizados para la expresión en un ave, por ejemplo, en un pollo. La optimización de codones puede determinarse a partir del uso de codones de al menos una, y preferiblemente más de una, proteína expresada en una célula aviar (por ejemplo, una célula de pollo). Por ejemplo, el uso del codón se puede determinar a partir de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas ovoalbúmina, lisozima, ovomucina y ovotransferrina del pollo. Por ejemplo, la secuencia de ADN que codifica la proteína exógena puede tener codones optimizados usando el programa BACKTRANSLATE® Wisconsin Package, versión 9.1 (Genetics Computer Group, Inc., Madison, WI) con una tabla de uso de codones compilada a partir de las proteínas de ovalbúmina, lisozima, ovomucoide, y ovotransferrina proteínas del pollo (*Gallus gallus*).

[0102] Un aspecto importante de la presente descripción se refiere a los huevos de cáscara dura de ave (por ejemplo, huevos de cáscara dura de pollo) que contienen un péptido o proteína exógenos, incluyendo, pero no limitado a, una LAL humana. El péptido o proteína exógenos, tal como LAL humana, pueden ser codificados por un transgén de un ave transgénica. A menudo, el péptido o proteína exógenos (por ejemplo, LAL) están glicosilados. La proteína puede estar presente en cualquier cantidad útil. En un caso, la proteína está presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 0,01  $\mu$ g por huevo con cáscara dura y aproximadamente 1 gramo por huevo con cáscara dura. En otro caso, la proteína está presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1  $\mu$ g por huevo con cáscara dura y aproximadamente 1 gramo por huevo con cáscara dura. Por ejemplo, la proteína puede estar presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 10  $\mu$ g por huevo con cáscara dura y aproximadamente 1 gramo por huevo con cáscara dura (por ejemplo, un intervalo de entre aproximadamente 10  $\mu$ g por huevo con cáscara dura y aproximadamente 400 miligramos por huevo con cáscara dura).

[0103] En un caso, la proteína exógena de la divulgación está presente en la clara del huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1 ng por milímetro de clara de huevo y aproximadamente 0,2 gramo por mililitro de clara de huevo. Por ejemplo, la proteína puede estar presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 0,1  $\mu$ g por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 0,2 gramo por mililitro de clara de huevo (por ejemplo, la proteína puede estar presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1  $\mu$ g por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 100 miligramos por mililitro de clara de huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1  $\mu$ g por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 100 miligramos por mililitro de clara de huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1  $\mu$ g por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 50 miligramos por mililitro de clara de huevo. Por ejemplo, la proteína puede estar presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1  $\mu$ g por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 10 miligramos por mililitro de clara de huevo (por ejemplo, la proteína puede estar presente en una cantidad en un intervalo de entre aproximadamente 1  $\mu$ g por mililitro de clara de huevo y aproximadamente 1 milígramo por mililitro de clara de huevo). En un caso, la proteína está presente en una cantidad de más de 0,1  $\mu$ g por mililitro de clara de huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad de más de 0,5  $\mu$ g por mililitro de clara de huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad de más de 1  $\mu$ g por mililitro de clara de huevo. En un caso, la proteína está presente en una cantidad de más de 1,5  $\mu$ g por mililitro de clara de huevo.

[0104] Las aves de la divulgación que producen proteínas exógenas descritas en este documento (por ejemplo, LAL) que se desarrollan a partir de células blastodérmicas en las que el vector ha sido introducido son la generación G0 y se puede denominar como "progenitores". Las aves progenitoras son típicamente quiméricas para cada transgén insertado. Es decir, sólo algunas de las células del ave transgénica G0 contienen el transgén o transgenes. La generación G0 típicamente también es hemicigota para el transgén o transgenes. La generación G0 puede reproducirse con animales no transgénicos para dar lugar a la descendencia transgénica G1 que también es hemicigota para el transgén y contiene el transgén o transgenes en esencialmente todas las células del ave. La descendencia hemicigota G1 puede reproducirse con animales no transgénicos que dan lugar a la descendencia hemicigota G2 o pueden reproducirse juntos para dar lugar a la descendencia homocigota G2 para el transgén. Sustancialmente todas las células de aves que son positivas para el transgén que derivan de la descendencia G1 contienen el transgén o transgenes. En un caso, la descendencia hemicigota G2 de la misma línea puede reproducirse para producir descendencia homocigota G3 para el transgén. En un caso, los animales hemicigotos G0 o G1, por ejemplo, se reproducen juntos para dar lugar a la descendencia homocigota G1 que contiene dos copias del transgén o transgenes en cada célula del animal. Estos son meramente ejemplos de ciertos procedimientos de reproducción útiles y la presente descripción contempla el empleo de cualquier procedimiento de reproducción útil, tales como los conocidos por las personas de experiencia ordinaria en la técnica.

[0105] En un caso, la descripción proporciona el aislamiento de LAL. Es decir, la LAL contenida en la composición puede ser una LAL aislada. Por ejemplo, la LAL se puede aislar de la clara de huevo. La LAL aislada pueden ser moléculas de LAL que tienen una variedad de estructuras de glicosilación entre las moléculas de LAL.

[0106] Mediante los procedimientos de la presente descripción, los transgenes se pueden introducir en células blastodérmicas embrionarias aviares para producir un pollo transgénico, pavo transgénico, codorniz transgénica y otras especies aviares, que llevan el transgén en el material genético de su tejido de línea germinal con el fin de producir proteínas de la divulgación. Las células blastodérmicas son típicamente células en la etapa VII-XII, o equivalentes de las mismas, y en un ejemplo están cerca de la etapa X.

[0107] Algunos vectores útiles en la realización de los procedimientos de la presente descripción se describen en este documento. En un caso, la secuencia codificante y el promotor del vector están ambos situados entre las LTR 5' y 3' antes de la introducción en células blastodérmicas. En un caso, el vector es retroviral y la secuencia codificante y el promotor están ambos situados entre las LTR 5' y 3' del vector retroviral. En un caso útil, las LTR o vector retroviral derivan del virus de la leucosis aviar (ALV), virus de la leucemia murina (MLV), o lentivirus.

[0108] En un ejemplo, los vectores que se utilizan para transfectar células blastodérmicas y generar la integración estable en el genoma aviar contienen una secuencia codificante y un promotor en relación operativa y posicional para expresar la secuencia codificante en la célula de la glándula tubular del magnum del oviducto aviar, en la que la proteína exógena, tal como una enzima lisosomal (por ejemplo, LAL), se deposita en la clara de huevo de un huevo con cáscara dura.

[0109] El promotor puede ser opcionalmente un segmento de la región del promotor de ovoalbúmina que es suficientemente grande para dirigir la expresión de la secuencia codificante en las células de glándulas tubulares. El truncamiento del promotor de ovoalbúmina y/o la condensación de los elementos reguladores críticos del promotor de ovoalbúmina, de manera que se retienen las secuencias requeridas para la expresión en las células de glándulas tubulares del magnum del oviducto, a la vez que es lo suficientemente pequeño que puede incorporarse fácilmente en vectores, se incluye dentro del alcance de la divulgación. En un caso, se puede usar un segmento de la región del promotor de ovoalbúmina. Este segmento comprende la región flanqueante 5' del gen de ovoalbúmina.

[0110] El promotor también puede ser un promotor que es en gran medida, pero no completamente, específico para el magnum, tal como el promotor de lisozima. El promotor también puede ser un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV). Alternativamente, el promotor puede ser un promotor constitutivo (por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), un promotor de virus de leucemia murina (MLV), etc.). En un ejemplo, el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de MDOT, un promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), un promotor de virus de la leucemia murina (MLV), un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), un promotor de ovoalbúmina, un promotor de la lisozima, un promotor de conalbúmina, un promotor de ovomucoide, un promotor de ovomucina y/o un promotor de ovotransferrina. Opcionalmente, el promotor puede ser al menos un segmento de una región del promotor, tal como un segmento de la región del promotor de ovoalbúmina, lisozima, conalbúmina, ovomucoide, ovomucina y ovotransferrina.

[0111] En un procedimiento de transfección de células blastodérmicas, se usa un vector basado en retrovirus empaquetados para liberar el vector en células blastodérmicas embrionarias de modo que el vector se integra en el genoma aviar.

[0112] El retrovirus útil para introducir al azar un transgén en el genoma aviar es el virus de la leucosis aviar (ALV) de replicación deficiente, el virus de la leucemia murina de replicación deficiente (MLV) o el lentivirus. En un caso, se modifica un vector pNLB mediante la inserción de una región del promotor de ovoalbúmina y uno o más genes

exógenos entre las repeticiones terminales largas (LTR) 5' y 3' del genoma del retrovirus. La divulgación contempla que cualquier secuencia codificante colocada en dirección 3' de un promotor que es activo en células de glándulas tubulares se puede expresar en las células de glándulas tubulares. Por ejemplo, el promotor de ovoalbúmina se puede expresar en las células de glándulas tubulares del magnum del oviducto porque el promotor de ovoalbúmina impulsa la expresión de la proteína ovoalbúmina y es activo en las células de glándulas tubulares del oviducto.

**[0113]** Cualquiera de los vectores descritos en el presente documento también puede incluir opcionalmente una secuencia codificante que codifica un péptido señal que dirige la secreción de la proteína expresada por la secuencia codificante del vector de las células de glándulas tubulares del oviducto. Este aspecto amplía eficazmente el espectro de proteínas exógenas que pueden depositarse en huevos aviares usando los procedimientos descritos en el presente documento. Cuando de ningún modo se secreta una proteína exógena, el vector que contiene la secuencia codificante se modifica para comprender una secuencia de ADN que comprende aproximadamente 60 pb que codifica un péptido señal del gen de la lisozima. La secuencia de ADN que codifica el péptido señal se inserta en el vector de tal manera que se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína codificada por el ADN.

**[0114]** Otro aspecto de la descripción implica el uso de elementos de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en cualquiera de los vectores de la presente divulgación para permitir la traducción de dos o más proteínas a partir de un ARNm dicistrónico o policistrónico. Las unidades de IRES se fusionan a los extremos 5' de una o más secuencias codificantes adicionales que a continuación se insertan en los vectores al final de la secuencia codificante original, de modo que las secuencias codificantes están separadas entre sí por un IRES.

**[0115]** En un caso cuando se usa un IRES, la modificación post-traduccional del producto se facilita porque una secuencia codificante puede codificar una enzima capaz de modificar el otro producto de la secuencia codificante. Por ejemplo, la primera secuencia codificante puede codificar colágeno que se hidroxilaría y se activaría por la enzima codificada por la segunda secuencia codificante en la que se emplea un IRES, tal como se entiende en la técnica.

**[0116]** En otro aspecto, las secuencias codificantes de los vectores utilizados en cualquiera de los procedimientos de la presente descripción están provistos de una región no traducida 3' (3' UTR) para conferir estabilidad al ARN producido. Cuando se añade 3' UTR a un vector retroviral, la orientación del promotor, gen X y la 3' UTR deben invertirse en el constructo, de modo que la adición de la 3' UTR no interfiere con la transcripción del ARN genómico de longitud completa. En un ejemplo, la 3' UTR puede ser la de los genes de ovoalbúmina o lisozima, o cualquier 3' UTR que sea funcional en una célula de magnum, es decir, la región tardía de SV40.

**[0117]** En un caso, se usa un promotor constitutivo para expresar la secuencia codificante de un transgén en el ave. En este caso, la expresión no se limita al magnum; la expresión también se produce en otros tejidos dentro del ave (por ejemplo, sangre). El uso de dicho transgén, que incluye un promotor constitutivo y una secuencia codificante, es particularmente adecuado para efectuar o impulsar la expresión de una proteína en el oviducto y la posterior secreción de la proteína en el huevo.

**[0118]** Se producen partículas de transducción para el vector y se titulan para determinar la concentración apropiada que puede utilizarse para inyectar embriones. Los huevos de aves se enmarcan de acuerdo con el procedimiento Speksnijder (patente de Estados Unidos No. 5.897.998), y los huevos se inyectan con partículas de transducción. Los huevos eclosionan aproximadamente 21 días después de la inyección y se seleccionan las aves macho para la reproducción. Con el fin de cribar para los gallos G0 que contienen el transgén en su esperma, el ADN se extrae de muestras de esperma de gallo. Los gallos G0 con los niveles más altos del transgén en sus muestras de esperma se emparejan con pollos no transgénicos mediante inseminación artificial. Las muestras de ADN de la sangre se criban para detectar la presencia del transgén. El suero de los gallos transgénicos se prueba para la presencia de proteína exógena. Si se confirma la proteína exógena, el esperma de los gallos transgénicos se utiliza para la inseminación artificial de los pollos no transgénicos. Un cierto porcentaje de la descendencia contiene por tanto el transgén (por ejemplo, más del 50%). Cuando la proteína exógena está presente en los huevos producidos de acuerdo con la presente descripción, la proteína puede aislarse. La proteína también puede probarse para la actividad biológica.

**[0119]** Los procedimientos de la descripción que proporcionan la producción de proteína exógena en el oviducto aviar y la producción de huevos que contienen proteína exógena implican una etapa adicional posterior para proporcionar un vector adecuado e introducir el vector en células blastodérmicas embrionarias de modo que el vector se integra en el genoma aviar. La etapa posterior implica derivar un ave transgénica madura a partir de las células blastodérmicas transgénicas producidas en las etapas anteriores. Las aves transgénicas maduras se pueden obtener a partir de las células de un embrión blastodérmico que ha sido transfectado o transducido con el vector directamente dentro del embrión. Se deja que el embrión resultante se desarrolle y que el polluelo madure.

**[0120]** El ave transgénica producida a partir de células blastodérmicas se conoce como un progenitor. Algunos progenitores llevarán el transgén en las células de glándulas tubulares en el magnum de sus oviductos. Estas aves expresarán la proteína exógena codificada por el transgén en sus oviductos. La proteína exógena también puede expresarse en otros tejidos (por ejemplo, sangre), además del oviducto. Si la proteína exógena contiene la

secuencia o secuencias señal apropiadas, se secreta en el lumen del oviducto y en la clara del huevo.

**[0121]** Algunos progenitores son progenitores de la línea germinal. Un progenitor de la línea germinal es un progenitor que porta el transgén en el material genético de su tejido de línea germinal, y también puede llevar el transgén en células de las glándulas tubulares del magnum del oviducto que expresan la proteína exógena. Por lo tanto, de acuerdo con la descripción, el ave transgénica puede tener células de glándulas tubulares que expresan la proteína exógena, y la descendencia del ave transgénica también puede tener células de las glándulas tubulares del magnum del oviducto que expresan la proteína exógena. Alternativamente, la descendencia expresa un fenotipo determinado por la expresión del gen exógeno en el tejido o tejidos específicos del ave. En un ejemplo, el ave transgénica es un pollo o un pavo.

#### COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y PROCEDIMIENTOS TERAPÉUTICOS

**[0122]** Aunque es posible que, para uso en terapia, las proteínas terapéuticas producidas, tal como se describe en el presente documento, se pueden administrar en forma sin purificar, es preferible administrar las proteínas terapéuticas como parte de una formulación farmacéutica. Por lo tanto, se proporcionan adicionalmente formulaciones farmacéuticas que comprenden proteínas terapéuticas glicosiladas derivadas de aves de corral, tales como LAL o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma, junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables de los mismos y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos y procedimientos de administración de dichas formulaciones farmacéuticas. El portador o portadores deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos. Los procedimientos de tratamiento de un paciente (por ejemplo, cantidad de proteína farmacéutica administrada, la frecuencia de administración y la duración del período de tratamiento) utilizando composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden determinar usando metodologías estándar conocidas por los médicos expertos en la técnica.

**[0123]** Las composiciones que comprenden portadores, incluyendo moléculas de compuestos, se formulan por procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, 14a Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa.).

**[0124]** El portador puede comprender un diluyente. En un caso, el portador farmacéutico puede ser un líquido y la LAL recombinante humana puede estar en forma de una solución. El portador farmacéutico puede ser cera, grasa o alcohol. En un caso, el portador a base de cera o grasa no contiene éster. En otro caso, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser un sólido en forma de un polvo, un polvo liofilizado, o un comprimido. En un caso, el portador puede comprender un liposoma o una microcápsula.

**[0125]** Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para la administración por inyección que incluye administración intramuscular, subcutánea e intravenosa. Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral. Las formulaciones farmacéuticas también incluyen aquellas para la administración por inhalación o insuflación. Las formulaciones, cuando sea apropiado, pueden presentarse convenientemente en unidades de dosificación discretas y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. Los procedimientos de producción de las formulaciones farmacéuticas incluyen típicamente la etapa de poner la proteína terapéutica en asociación con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y después, si es necesario, dar forma al producto en la formulación deseada.

**[0126]** Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden presentarse convenientemente como unidades discretas, tales como cápsulas, píldoras o comprimidos, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una solución; como una suspensión; o como una emulsión. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes o agentes humectantes. Los comprimidos se pueden recubrir según procedimientos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o se pueden presentar como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes.

**[0127]** La LAL también se puede formular para la administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo, inyección de bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en recipientes para múltiples dosis con un conservante añadido. Las proteínas terapéuticas se pueden inyectar, por ejemplo, mediante inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares, e infusiones o inyecciones intravenosas.

**[0128]** La LAL pueden tomar formas, tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación, tales como de agentes de suspensión, estabilizantes y/o

dispersantes. También se contempla que la proteína terapéutica puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aseptico de sólido estéril o por liofilización de la solución, para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos, antes del uso.

- 5 [0129] Para las infusiones o inyecciones intravenosas, la LAL producida de acuerdo con la descripción se puede formular como una suspensión o solución acuosa. Los excipientes adecuados para la formulación para infusión o inyección intravenosa pueden incluir uno de los siguientes: citrato trisódico dihidrato, ácido cítrico y albúmina de suero humano. La formulación farmacéutica también puede incluir otros excipientes adecuados bien conocidos en la técnica utilizados para otros productos para los trastornos de almacenamiento lisosomal. El pH de la LAL producida de acuerdo con la descripción se mantiene entre aproximadamente 5,6 y aproximadamente 6,2. Preferiblemente, el pH de la formulación de LAL se mantiene a  $5,9 \pm 0,2$ .
- 10 [0130] Para la administración tópica a la epidermis, las proteínas terapéuticas producidas de acuerdo con la descripción pueden formularse como pomadas, cremas o lociones, o como un parche transdérmico. Las pomadas y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o agentes gelificantes adecuados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y también pueden contener uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes.
- 15 [0131] Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas de chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un portador líquido adecuado.
- 20 [0132] Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal en las que el portador es un sólido se representan más preferiblemente como supositorios de dosis unitaria. Los portadores adecuados incluyen manteca de cacao y otros materiales usados comúnmente en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente mediante la mezcla del compuesto activo con el portador o portadores ablandados o fundidos, seguido de enfriamiento y conformación en moldes.
- 25 [0133] Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizadores que contienen además del principio activo, portadores, tales como los conocidos en la técnica como apropiados.
- 30 [0134] Para la administración intranasal las proteínas terapéuticas de la descripción pueden usarse como una pulverización líquida o polvo dispersable o en forma de gotas. Las gotas pueden formularse con una base acuosa o no acuosa que también comprende uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Los pulverizadores líquidos se suministran convenientemente desde envases presurizados.
- 35 [0135] Para la administración por inhalación, las proteínas terapéuticas de acuerdo con la descripción pueden suministrarse convenientemente desde un insuflador, nebulizador o un envase presurizado u otro medio conveniente de suministro de una pulverización de aerosol. Los envases presurizados pueden comprender un propelador adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida.
- 40 [0136] Para la administración por inhalación o insuflación, las proteínas terapéuticas según la descripción pueden tomar la forma de una composición de polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosis unitaria en, por ejemplo, cápsulas o cartuchos o, por ejemplo, gelatina o envases tipo blister a partir de los cuales el polvo puede administrarse con la ayuda de un inhalador o insuflador.
- 45 [0137] Cuando se desea, se pueden emplear las formulaciones descritas anteriormente adaptadas para proporcionar el suministro sostenido del principio activo.
- 50 [0138] Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento también pueden contener otros principios activos, tales como agentes antimicrobianos, o conservantes.
- 55 [0139] Además, se contempla que las proteínas terapéuticas descritas en este documento pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, la descripción proporciona procedimientos para el pretratamiento con una dosis farmacéuticamente eficaz de un antihistamínico para minimizar o evitar posibles reacciones anafilácticas relacionadas con la infusión. Por ejemplo, el antihistamínico puede ser cualquier antihistamínico farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, difenhidramina), tal como se describe en este documento y tal como se conoce en la técnica. En un caso, el antihistamínico se administra en una dosis entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal. Por ejemplo, el antihistamínico puede administrarse en una dosis de aproximadamente 5 mg por kilogramo. En un caso, se administra el

antihistamínico entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 90 minutos, por ejemplo, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, antes de la administración de la lipasa ácida lisosomal utilizando un sistema ambulatorio conectado al puerto de acceso vascular. En un caso, la dosis de difenhidramina contrarresta eficazmente las posibles reacciones anafilácticas por la infusión.

5 [0140] Los inmunosupresores, tales como antihistamínicos, corticosteroides, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, metotrexato, anticuerpos dirigidos contra el receptor IL-2, anticuerpos dirigidos contra el receptor de células T, anticuerpos dirigidos contra TNF- $\alpha$  o proteínas de fusión (infliximab, etanercept o adalimumab), CTLA4-Ig (por ejemplo, abatacept), anticuerpos anti-OX-40, también se puede administrar antes, durante o después de la administración de LAL si el paciente experimenta una reacción anafiláctica o respuesta inmune adversa.

10 [0141] La descripción también contempla terapia que implica la administración de composiciones que contienen LAL en combinación con uno o más agentes reductores del colesterol (por ejemplo, inhibidores de HMG-CoA reductasa). Los ejemplos no limitantes de tales agentes incluyen: atorvastatina (Lipitor® y Torvast®), fluvastatina (Lescol®), lovastatina (Mevacor®, Altocor®, Altoprev®, pitavastatina (Livalo®, Pitava®, pravastatina (Pravachol®, Selektine®, Lipostat®), rosuvastatina (Crestor®) y simvastatina (Zocor®, Lipex®).

15 [0142] Las composiciones o proteínas descritas en este documento pueden usarse para tratar una variedad de enfermedades. Por ejemplo, hay enfermedades para las que se conocen terapias de tratamiento por los profesionales expertos en la técnica. La presente descripción contempla que las proteínas terapéuticas (por ejemplo, LAL) producidas en un sistema aviar que contiene un patrón de glicosilación derivado de de aves de corral se pueden emplear para el tratamiento de dichas enfermedades. Es decir, también se contempla el tratamiento de enfermedades conocidas por ser tratables por proteínas terapéuticas producidas convencionalmente mediante el uso de proteínas terapéuticas producidas, tal como se describe en este documento. Por ejemplo, la LAL producida, 20 tal como se describe en el presente documento, se puede usar para tratar enfermedades resultantes de o asociadas con la deficiencia o insuficiencia de LAL (colectivamente, "deficiencia de LAL"), tales como enfermedad de Wolman enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol (CESD). Tal como se describe en el presente documento, la deficiencia de LAL también contempla enfermedades en las que la expresión de LAL se reduce debido a una condición (por ejemplo, una mutación genética), factores fisiológicos o ambientales que conducen a una reducción o 25 deficiencia de LAL producida en el cuerpo. La LAL producida, tal como se describe en el presente documento, también se puede utilizar para tratar otras enfermedades, tales como la aterosclerosis, la enfermedad del hígado graso, la enfermedad de hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y la cirrosis. La LAL producida, tal como se describe en el presente documento, también se puede utilizar para tratar otras 30 enfermedades, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 6.849.257, concedida el 1 de febrero de 2005,

35 [0143] Publicación de Estados Unidos N° 2009/0297496, publicada el 3 de diciembre de 2009; publicación de Estados Unidos N° 2004/0223960, publicada el 11 de noviembre de 2004; y la publicación de Estados Unidos N° 2007/0264249, publicada el 15 de noviembre de 2009.

40 [0144] También se contempla que la LAL producida, tal como se describe en el presente documento, puede usarse para tratar ciertas enfermedades específicas, incluyendo pancreatitis, por ejemplo, pancreatitis crónica y/o pancreatitis aguda, así como la lesión pancreática inducida por el alcohol, tal como pancreatitis inducida por alcohol.

45 [0145] La LAL producida por cualquier procedimiento útil, tales como los descritos en este documento, se contempla para su uso para tratar enfermedades debidas a la lesión celular inducida por alcohol, incluyendo, pero no limitado a, aquellas lesiones celulares inducidas por alcohol que dan lugar a la acumulación de ésteres de lípidos en tejido corporal, tales como, pero no limitado a, hígado, bazo, intestino y el tejido cardiovascular. La descripción también contempla el tratamiento de la mala absorción mediante la administración de LAL.

50 [0146] Un aspecto de la descripción está dirigido a procedimientos de tratamiento de un paciente que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende LAL recombinante humana, tal como se describe en este documento. El paciente puede estar sufriendo o ser diagnosticado con cualquier cantidad de enfermedades, incluyendo las asociadas con la deficiencia de LAL. En un caso, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que aumenta el recuento de glóbulos rojos en un paciente en una cantidad deseada. Se contempla que la LAL producida de acuerdo con la descripción se puede utilizar para tratar la enfermedad renal crónica, por ejemplo, donde los tejidos no consiguen mantener la producción de la lipasa ácida lisosomal.

60 [0147] También se contempla que la LAL producida mediante cualquier procedimiento útil puede ser útil para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Tangier y hipoalfalipoproteinemia familiar. La enfermedad de Tangier/hipoalfalipoproteinemia familiar se asocia con la acumulación de ésteres de colesterol en los macrófagos acompañada por hepatoesplenomegalia y/o linfadenopatía junto con bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) que se pueden tratar mediante la administración de LAL. Por ejemplo, sin desear limitar la descripción a ninguna teoría o mecanismo de operación particular, se cree que la alteración de la actividad LAL disminuye la expresión de ABCA1 y por el contrario una actividad de LAL aumentada obtenida mediante la administración de LAL

a un paciente con la enfermedad de Tangier/hipoalfalipoproteinemia familiar aumentará la expresión de ABCA1 para superar los efectos de un gen de ABCA1 con una actividad funcional reducida como resultado del polimorfismo.

5 [0148] Para el tratamiento de una enfermedad, en general, la dosificación administrada puede variar dependiendo de factores conocidos, tales como la edad, la salud y peso del receptor, tipo de tratamiento simultáneo, frecuencia del tratamiento, y similares. Por lo general, una dosificación de principio activo puede ser de entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 10 miligramos por kilogramo de peso corporal. La dosificación precisa, la frecuencia de administración y período de tiempo de tratamiento se pueden determinar por un médico experto en la técnica de la administración de la respectiva proteína terapéutica.

10 [0149] Además, se ha descubierto que las dosis de 1 mg/kg y menores pueden ser eficaces en el tratamiento de deficiencias de LAL. La presente descripción proporciona procedimientos de tratamiento de enfermedades que comprenden administrar a un mamífero (por ejemplo un paciente, preferiblemente un paciente humano) una dosis terapéuticamente eficaz de la lipasa ácida lisosomal entre una vez cada 5 días y una vez cada 25 días, por ejemplo, entre una vez cada 7 días y una vez cada 14 días. En un caso, la dosis de la lipasa ácida lisosomal administrada es entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, por ejemplo, la dosis puede estar entre aproximadamente 1 mg y 5 mg por kilogramo.

20 [0150] En un caso particularmente útil, la descripción proporciona procedimientos de tratamiento de una enfermedad mediante la administración de una dosis de la lipasa ácida lisosomal de entre aproximadamente 0,1 mg y 1,0 mg por kilogramo de peso corporal de acuerdo con cualquier régimen de dosificación terapéuticamente eficaz, tal como los descritos en este documento.

25 [0151] La descripción proporciona procedimientos para el tratamiento de cualquier complicación de la deficiencia de LAL que puede beneficiarse de la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de LAL. En un caso, la mala absorción y la falta de crecimiento pueden ser tratadas de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento. En otro caso, las complicaciones observadas en pacientes con deficiencia de LAL incluyendo, pero no restringidos a, hepatomegalia y disfunción hepática pueden tratarse utilizando los procedimientos proporcionados en este documento.

30 [0152] La descripción proporciona el tratamiento con LAL recombinante (por ejemplo, LAL recombinante humana) que puede producirse mediante cualquier sistema de expresión de proteína útil, por ejemplo, mamíferos y aves transgénicos tal como se entiende en la técnica. Otros sistemas de expresión de proteínas pueden incluir, pero no se limitan a, el cultivo de células, bacterias y sistemas de plantas.

35 [0153] La descripción abarca la administración de LAL recombinante como parte de una composición farmacéuticamente aceptable mediante cualquier vía que pueda lograr el efecto terapéutico deseado, según se determina por un médico experto en la técnica. En un caso, la LAL se puede administrar por infusión intravenosa durante un periodo de aproximadamente cinco horas. Por ejemplo, la infusión puede facilitarse mediante una bomba de infusión ambulatoria conectada a un puerto de acceso vascular (por ejemplo, un Port-a-Cath).

40 [0154] La descripción también incluye el seguimiento de la presentación clínica y patológica de las enfermedades, por ejemplo, enfermedad de Wolman y CESD, en el mamífero (por ejemplo, el paciente humano). En un caso, las evaluaciones consisten en, pero no se limitan a: el análisis de lípidos, radiografía de tórax, pruebas de función hepática, gráfico de las heces, ácido mevalónico en plasma, inmunogenicidad, lipasa ácida lisosomal en plasma, quítotriosidasa, PARC, hipertensión portal, antropometría, volumen y caracterización del hígado, el bazo y el tracto gastrointestinal utilizando, por ejemplo, la tecnología de imágenes. Por ejemplo, la tecnología de imágenes mencionada anteriormente puede consistir en ultrasonidos, imágenes por resonancia magnética y espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

## 50 EJEMPLOS

55 [0155] La presente descripción se ejemplifica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no pretenden, ni deben ser interpretados como limitantes de la invención de ninguna manera.

### Ejemplo 1

60 **Construcción del vector (pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA) que contiene la secuencia codificante de lipasa ácida lisosomal recombinante humana (rhLAL)**

65 [0156] La secuencia de nucleótidos del gen de hLAL en el vector pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA codifica una proteína que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína producida por el gen de la lipasa ácida lisosomal humana (GenBank Acceso, NP\_000226) (Figura 1). La transcripción de esta secuencia y la posterior traducción del ARNm resultante produce una proteína precursora de 399 aminoácidos, que se procesa a una proteína madura de 378 aminoácidos idéntica a LAL humana (GenBank Acceso, NP\_000226) (Figura 1), tal como se establece en la

SEQ ID NO: 1. La expresión del gen de hLAL (véase la Figura 2 para la secuencia de ADNc) en este ejemplo está controlada por elementos no codificantes derivados del gen de la ovoalbúmina, incluyendo potenciador, promotor, intrón y secuencias no traducidas 5' y 3'. El gen de la ovoalbúmina produce ovoalbúmina, el constituyente principal de proteína de la clara de huevo. La actividad del promotor de ovoalbúmina de pollo es muy específica para las células dentro del oviducto de pollo que producen la clara de huevo; la expresión en otros tejidos es mínima.

5 [0157] El vector plásmido pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA (Figura 3A; la secuencia de nucleótidos de la que se muestra en la figura 4) se utilizó para producir un retrovirus de replicación deficiente (RDR), que de forma estable integró el transgén de hLAL en el genoma del progenitor (XLL109). Este vector plásmido incluye secuencias de nucleótidos retrovirales requeridos para el empaquetamiento del ARN viral, la transcripción inversa y la integración, pero no contiene las secuencias intactas de los genes virales gag, pol y env. Los procedimientos utilizados para generar el vector retroviral y su uso en los procedimientos posteriores de transgénesis se describen en este documento.

10 [0158] La porción retroviral de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA se basa en el vector de ALV, pNLB. pNLB se modificó de tal manera que las LTR serían autoinactivantes (SIN) (Figura 3B). Para lograr esto, se han suprimido 273 pb de la 3' LTR, que incluye el potenciador y la caja CAAT de la región U3. Debido a que la región U3 inactivada en el extremo 3' de la secuencia retroviral sirve como plantilla para una nueva región U3 presente en el extremo 5' de un provirus integrado, 5' LTR está también normalmente inactivada. La delección de las secuencias LTR en el constructo SIN disminuye la interferencia del promotor en el promotor interno de la LTR, y minimiza la posibilidad de recombinación 20 de secuencias para formar un retrovirus de replicación competente. El nuevo vector se denomina pALVIN para el vector de inactivación de ALV.

15 [0159] En dirección 3' de la LTR 5' están las secuencias codificantes de *gag* y *env*, que se acumularon a partir del vector pNLB. En pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA, permanece una pequeña porción (12%) de la secuencia de precursor 25 de la proteína de *gag* (55% de la secuencia del péptido maduro p19) y permanece una pequeña porción (1,7%) de la secuencia de precursor de *env* de RAV2 (GenBank Acceso, AF033808). Estas regiones *gag* y *env* truncadas son incapaces de producir proteínas funcionales necesarias para crear retrovirus competentes de replicación (Cosset, 1991).

30 [0160] Los elementos de control de la transcripción y traducción del gen de la ovoalbúmina de pollo fueron insertados en pALVIN para crear pALVIN-OV-1.1-I (secuencia de la cual se muestra en la figura; SEQ ID NO: 8). La primera sección de pALVIN-OV-1.1-I se compone de una sección contigua del gen de ovoalbúmina de pollo que incluye la región de 1,1 kb del promotor proximal, el primer exón, el primer intrón y parte del 2º exón. La siguiente sección es un fragmento de inserto de relleno que ocupa el lugar de las secuencias codificantes de la proteína 35 ovoalbúmina. El relleno va seguido por la región no traducida 3' (UTR) del gen de ovoalbúmina de pollo, que incluye secuencias que facilitan el procesamiento adecuado del ARNm, incluyendo la poliadenilación. En general, el fragmento de relleno está sustituido por fragmentos de ADN que codifican la proteína deseada, en este caso hLAL. El resultado es un vector que tiene elementos específicos que promueven la expresión regulada de la transcripción y la traducción de un ARNm en el oviducto de pollos transgénicos, que mimetizan la regulación del ARNm de ovoalbúmina endógeno, y que permiten una expresión elevada de la proteína de interés en la clara de 40 huevo.

45 [0161] El vector pALVIN-OV-1.1-I incluye el primer intrón del gen de la ovoalbúmina. Debido a que el intrón es susceptible de corte y empalme durante la producción y el empaquetamiento del genoma de ARN retroviral, se insertó el casete de expresión en la orientación opuesta con respecto a las LTR. De esta manera, el intrón no es reconocible en el ARN retroviral y se empaqueta sin empalme. Para mayor comodidad todos los mapas de este 50 documento se dibujan con las LTR en la orientación opuesta y el casete de expresión en la orientación hacia delante o a favor de las agujas del reloj.

55 [0162] pALVIN-OV-1.1-I es el vector de base en el cual se insertó el secuencia codificante (CDS) de hLAL. Se sintetizaron dos fragmentos de ADN, adaptador de hLAL y Syn hLAL, que componen las CDS de hLAL y secuencias necesarias para la compatibilidad con pALVIN-OV-1.1-I, en Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, (véanse las figuras 7 y 8; SEQ ID NOs: 9 y 10). Se insertaron un fragmento Hpal/BamHI de adaptador de hLAL de 229 pb y un fragmento BamHI/BstBI de Syn hLAL de 1113 pb en el fragmento Hpal/BstBI 7882 de pALVIN-OV-1.1-I, reemplazando de este modo la región de relleno por las CDS de hLAL y creando pALVIN-OV-1.1-I-hLAL.

60 [0163] Se descubrió que había un sitio de empalme críptico en la cadena antisentido de las CDS de hLAL que impidió el empaquetamiento de ARN retroviral intacto. El sitio de empalme críptico se eliminó mediante alteración de la secuencia de ADN sin cambiar la secuencia de aminoácidos de hLAL. Este cambio se realizó por amplificación en cadena de polimerasa de la región de 232 a 534 de pALVIN-OV-1.1-I-hLAL con el cebador 5'-AGAAACTGAGAGTGTCTTAT-3' (SEQ ID NO: 12) y el cebador 5'-TGACAGCTGTGGATCCAGAACACATG-3' (SEQ ID NO: 13), creando un amplicón de 329 pb. Este amplicón se digirió con BamHI y SexAI y se ligó con el fragmento de 8940 pb BamHI/SexAI de pALVIN-OV-1.1-I-hLAL para crear pALVIN-OV-1.1-I-hLAL-dSA.

65 [0164] Se insertó un potencial potenciador promotor que contiene sitio III hipersensible a DNasa (DHSIII) del gen de ovoalbúmina de pollo (-3,819 a -2169 en relación al sitio de inicio del promotor de OV) (Kaye, Bellard et al. 1984) en

pALVIN-OV-1.1-I-hLAL-dSA para crear pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA. Esto se realizó de la siguiente manera: un fragmento de ADN que incluía el promotor de DHSIII y promotor de OV proximal de 1,1 kb denominado promotor de OVR1 (ver la figura 9; y SEQ ID NO: 11 para la secuencia) se aisló por digestión con Xhol y BplI. Para facilitar la subclonación, un fragmento adaptador, PCR de pSIN-OV-1.1-1 se generó mediante amplificación por PCR de la región de 6752 a 7974 de pALVIN-OV-1.1-I con los cebadores 5'-GCCGCTCGAGCGAGGAATATAAAAAATT-3' (SEQ ID NO: 14) y 5'-TCCGCGCACATTCGGAA-3' (SEQ ID NO: 15) seguido por digestión con NgoMI y Xhol. El fragmento de 2772 pb Xhol/BplI de promotor de OVR1 y el fragmento de 1067 pb NgoMI/Xhol de PCR de pSIN-OV-1.1-I se insertaron en el fragmento de 7043 pb NgoMI/BplI de pALVIN-OV-1.1-I-hLAL-dSA, creando de este modo pALVIN-OVR1-I-hLAL-DSA (véase la figura 10 para los esquemas de construcción de pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA). La construcción del segmento de vector retroviral del vector, indicado como pALVIN (akapAVIJCR-A395.22.3.1-KM o Palv-SIN), se describe en la solicitud de Patente de Estados Unidos 2008/0064862.

[0165] Además, se incluye la producción de LAL de acuerdo con la descripción utilizando un promotor y/o vector descritos en la publicación de patente US No. 2008/0064862, publicada el 13 de marzo, 2008.

#### Ejemplo 2

##### Producción de partículas virales

[0166] El macho transgénico progenitor G0, XLL109, que lleva el transgén de hLAL en su genoma, se creó utilizando un procedimiento de transgénesis retroviral tal como se indica a continuación. Las partículas virales de replicación defectuosa que llevan el vector pALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA se produjeron por transfección transitoria de una línea celular de fibroblastos de pollo inmortalizada. Estas células de fibroblastos de pollo se transfecaron simultáneamente con tres plásmidos, pALVIN-OVR1-I-hLAL-sSA, pCMV-gag-pol y pCMV-VSV-G. pCMV-gag-pol expresa los genes *gag* y *pol* de la cepa de RAV1 del virus de la leucosis aviar. pCMV-VSV-G expresa la proteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular. Cuatro horas después de la transfección, el medio se reemplazó por DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. El medio se recolectó a las 48 horas después de la transfección, se filtró a través de un filtro de 0,45 micras (Millipore) y se concentró por ultracentrifugación. El retrovirus concentrados que llevaba el transgén ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA se recogió y se utilizó en la transducción de embriones en etapa temprana. Cabe indicar que "p" es la notación para la forma de plásmido de vector, la "p" está ausente de las designaciones de transgenes una vez que el transgén está en la forma de vector empaquetado o transgén integrado.

#### Ejemplo 3

##### Transgénesis de embriones

[0167] La integración del casete de expresión ALVIN-OVR1-I-hLAL-dSA en el genoma de un embrión se consiguió mediante la transducción de embriones en etapa temprana (Speksnijder y Ivarie, 2000). Se obtuvieron huevos White Leghorn fertilizados recién puestos de una colonia para crianza. Se realizó una abertura en la cáscara para proporcionar acceso al embrión. Se inyectaron siete microlitros de partículas de retrovirus concentradas de replicación deficiente que llevaban el casete de expresión ALVIN-OVR1-I-hLAL-DSA descrito anteriormente en la cavidad subgerminal del embrión. Los huevos se sellaron con pegamento caliente, y a continuación se incubaron y eclosionaron en condiciones estándar. A las progenie producidas a partir de estas inyecciones se les dieron marcadores de identificación individuales en la eclosión para la identificación y la trazabilidad. Las muestras de sangre de la progenie fueron positivas en el transgén cuando se analizaron por PCR de tiempo real para el transgén de hLAL usando cebadores de PCR específicos para la secuencia codificante de hLAL (tal como se describe a continuación). Esto proporcionó una indicación de que el procedimiento de transgénesis se había realizado correctamente. El ensayo de PCR de tiempo real para el transgén de hLAL utiliza química Taqman® (Applied Biosystems). Los cebadores directo e inverso fueron 5'-ACGACTGGCTTGAGATGTCT-3' (SEQ ID NO: 16) y 5'-CCCCAAATGAAGTCAAGATGCT-3' (SEQ ID NO: 17), respectivamente. La secuencia de la sonda Taqman® fue 5'-CCGAATGCTCTCATGGAACACCAA-3' (SEQ ID NO: 18) y se marcó con FAM (como el emisor) en el extremo 5' y Iowa Black (como el inactivador) en el extremo 3'. Los cebadores, sonda y 1 µl de ADN extraído se añadieron a 30 µl de Taqman® Universal Master Mix (Applied Biosystems). Las reacciones de control incluían varias diluciones de un plásmido que llevaba la secuencia de hLAL y el ADN de los pollos de tipo natural (datos no mostrados). Se utilizaron parámetros de ciclación estándar en un sistema de PCR de tiempo real Applied Biosystems 7500.

#### Ejemplo 4

##### Identificación del progenitor G0

[0168] Se recogió el semen de machos sexualmente maduros y se extrajo el ADN y se ensayó usando el ensayo de PCR de tiempo real de hLAL. El número de copias del transgén en cada muestra se calculó utilizando patrones conocidos (un plásmido que lleva el gen de hLAL) mezclados con ADN de semen de control negativo. El contenido de ADN del casete del transgén en XLL109 macho fue a un nivel que permitía la transmisión del transgén a su progenie, según lo estimado por PCR de tiempo real. Este macho XLL109 fue el progenitor transgénico G0 y fue

criado con pollos no transgénicos para generar pollos transgénicos hemicigotos G1.

#### Ejemplo 5

5   **Propagación y caracterización de aves G1 hemicigotas**

[0169] Se analizó la progenie engendrada por el progenitor transgénico XLL109 por la presencia del transgén en el ADN de células de sangre usando el ensayo de PCR de tiempo real de hLAL. La sangre se recogió de progenie de 1-2 semanas de vida y se extrajo ADN utilizando una técnica de alto rendimiento (Harvey et al., 2002). Las soluciones de ADN no fueron cuantificadas antes del ensayo Taqman para facilitar el cribado de alto rendimiento. Habitualmente 1 µl de solución de ADN contiene de 50 a 400 ng de ADN que es suficiente para generar una señal de amplificación positiva. Se analizaron un total de 1.322 polluelos engendrados por XLL109 y se obtuvo sangre denuovo de la progenie positiva y se analizó para confirmación. Según los resultados de la PCR, 22 de la progenie fueron positivos para el transgén ALVIN-OVR1-I-hLAL-DSA. Un ejemplo de los resultados Taqman se muestra en la Figura 11.

#### Ejemplo 6

20   **Identificación y caracterización de la línea de alta expresión**

[0170] Uno de los pollos G1, 1LL7466, puso huevos con niveles significativamente más altos de proteína rhLAL en la clara de huevo, en comparación a los otros pollos G1. Se realizó un análisis de transferencia Southern en 1LL7466 y machos G1 hermanos para identificar qué machos hermanos tenían el mismo sitio de integración que el pollo de alta expresión. Se llevaron a cabo digestiones con una enzima de restricción que cortaba sólo una vez dentro del transgén (Blpl), y las transferencias de Southern se sondaron con un segmento del promotor de la ovoalbúmina o la secuencia codificante de hLAL (Figuras. 12A-D). La posición del 2º sitio de restricción, que reside en la región genómica flanqueante, varía dependiendo del sitio de integración. De este modo, el tamaño de la banda Blpl detectada por la sonda de OV o sonda de hLAL es único para cada línea generada.

[0171] La sonda de OV detectó una sola banda de 4,1 kb en el ADN digerido con Blpl de los pollos de tipo natural, lo que correspondía al tamaño esperado de un segmento Blpl dentro del gen de la ovoalbúmina endógena del genoma de pollo (figuras 12B y 12D). Se detectó una segunda banda de 4,3 kb con el pollo 1LL7466, que correspondía a la banda transgén. Tres hermanas hembra adicionales, 1LL10409, 1LL10686 y 1LL12058 y tres hermanos varones adicionales, 1LL8922, 1LL9330 y 1LL11217, mostraron la banda de 4,3 kb, lo que indica que estos hermanos podrían ser de la misma línea (Figuras 12B y 12D).

[0172] Como se esperaba la sonda de hLAL no detectó una banda en el ADN de los pollos de tipo natural, ya que la secuencia de ADN del gen de la lipasa ácida lisosomomal de pollo y la secuencia codificante de la lipasa ácida lisosomal recombinante humana están suficientemente diferenciadas para no permitir la hibridación bajo las condiciones usadas en estos ensayos Southern (Figura 12C). La sonda hLAL detectó una única banda de ~10,6 kb en el ADN genómico digerido con Blpl de los mismos pollos que dieron positivo para la banda de 4,3 kb detectada por la sonda de OV, lo que indica que estos 7 pollos G1 tienen el mismo sitio de integración y por lo tanto son de la misma línea.

[0173] No se detectaron otras bandas, lo que indica que 1LL7466, 1LL10409, 1LL10686, 1LL12058, 1LL8922, 1LL9330 y 1LL11217 todas tenían un único sitio de integración.

[0174] El análisis Southern indicó también que el transgén se integraba, ya que las bandas detectadas por las sondas de VO y hLAL eran de diferentes tamaños y de mayor tamaño que la del transgén solo. En la figura 12A se muestra un mapa que muestra la estructura predicha del transgén integrado y la posición de los sitios Blpl en las regiones genómicas flanqueantes.

[0175] Para confirmar que el transgén está intacto, se realizaron dos etapas. En primer lugar, la secuencia codificante de hLAL se aisló por PCR a partir de 1LL7466. Los productos de PCR se secuenciaron en ambas cadenas desde el codón de inicio hasta el codón de parada de hLAL. La secuencia de ADN era exactamente como se esperaba, lo que indica que no hay cambios en la secuencia de ADN de las regiones de codificación en el transgén. En segundo lugar, el análisis de transferencia Southern se llevó a cabo usando la enzima de restricción ApaLI, que digiere el transgén intacto en 2 segmentos, 3,6 y 3,8 kb (Figura 13A). Se detectaron las bandas de 3,6 y 3,8 kb en el ADN genómico digerido con ApaLI de Gls, lo que indica que el transgén se integró en una forma totalmente intacta (Figura 13B).

#### Ejemplo 7

65   **Propagación y caracterización de G2**

[0176] La figura 14 muestra el linaje de los G2 de hLAL descendientes de un único progenitor G0, XLL109. En la

fase G1, el transgén se caracterizó con respecto al número de copia, la integridad, la secuencia hLAL y el sitio de integración - y se identificaron y caracterizaron siete transgénicos G1 (cuatro pollos y tres gallos). La propagación de los G2 se logró mediante inseminación artificial de los pollos no transgénicos con esperma recogida de los progenitores G1 1LL8922, 1LL9330 y 1LL11217 (Figura 14). Cada pollo inseminado, sus huevos y posterior descendencia fueron alojados por separado de la otra progenie. La progenie eclosionada se analizó por la presencia del transgén de hLAL usando el ensayo de PCT de tiempo real de hLAL. Debido a que los progenitores G1 eran hemigígenos con respecto al transgén, se esperaba que la mitad de la progenie fueran G2 transgénicas. De 610 progenies de G2 analizadas hasta la fecha, 330 o el 54% eran transgénicas.

#### 10 Ejemplo 8

##### **Análisis genético de las hLAL aviar**

[0177] Después de la identificación de cada pollo G2 mediante el ensayo de PCR de tiempo real de hLAL del ADN de la sangre, la línea de producción se somete a los siguientes ensayos genéticos: el gen de hLAL se amplificó por PCR a partir del ADN de la sangre y se secuenció para confirmar el 100% de homología con la secuencia humana; el sitio de integración del transgén fue confirmado por PCR del sitio de integración, tal como se describió anteriormente. La secuenciación por PCR y el análisis del sitio de integración se realizó en: cada pollo en una línea de producción <10 pollos; 10% de los pollos (mínimo 10) para la línea de producción 11-100 pollos; 5% de los pollos (mínimo 10) para la línea de producción de 101-1000s; 1% de los pollos (mínimo 50) para la línea de producción de 1001-10000 pollos; 0,1% de los pollos (mínimo 100) para la línea de producción > 10001 pollos. Los registros detallados se mantuvieron en cada etapa de la fase de crecimiento y producción.

#### 25 Ejemplo 9

##### **Purificación de hLAL de clara de huevo**

[0178] Se solubilizó clara de huevo (EW) que contenía LAL a pH 6 durante la noche y se clarificaron a través de centrifugación (o filtración en profundidad) con una filtración a 0,2 um. La EW se ajustó con tampón NaOAc 1M (pH 4) a pH 6.

[0179] La EW clarificada se cargó en una columna de fenil-HIC (EW:tamaño de columna = 2:1) equilibrada con tampón fosfato 20 mM/NaCl 137 mM (pH 6). Después de la finalización de la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio y tampón de fosfato 5 mM (pH 6). La LAL se eluyó con propilenglicol al 30% con tampón Tris 5 mM (pH 7,2).

[0180] La fracción de LAL eluida se ajustó a pH 5 con ácido 1 M y a continuación se cargó en una columna GigaCap S (EW:sitio de columna = 10:1). La columna se equilibró con tampón de NaOAc 50 mM (pH 5). Después de la finalización de la carga, la columna se lavó con el tampón de equilibrio. La LAL se eluyó con NaOAc50 mM/NaCl 60 mM (pH 5).

[0181] La fracción de LAL de la columna de GigaCap S se ajustó a pH 6 con tampón Tris 1 M y a continuación se cargó en una columna Butil-HIC (EW:tamaño de columna = 10:1). La columna se equilibró con tampón fosfato 20 mM/NaCl 137 mM (pH 6). Después de la finalización de la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio y tampón de fosfato 5 mM (pH 6). La LAL pura se eluyó con propilenglicol al 50% con tampón Tris 5 mM (pH 7,2). La figura 15 representa las etapas de purificación de hLAL de la clara de huevo.

#### Ejemplo 10

##### **50 Análisis de carbohidratos de hLAL derivada de ave transgénica**

[0182] Se determinaron las estructuras de oligosacáridos se determinaron para LAL humana derivada de ave mediante el empleo de las siguientes técnicas de análisis que son bien conocidas por los técnicos en la materia.

[0183] Se digirieron dos cientos microgramos con tripsina y quimotripsina durante 18 h a 37°C en Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, que contenía CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Los productos de digestión se enriquecieron y se liberaron de contaminantes mediante una columna de cartucho C18 Sep-Pak. Después del enriquecimiento, los glicopéptidos se digirieron con 2 µl de PNGasa F (7,5 unidad/ml) en 50 µl de tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5, durante 18 horas a 37°C. Los oligosacáridos liberados se separaron del péptido y la enzima mediante el paso a través de una columna de cartucho C18 Sep-Pak.

[0184] La fracción de glicano se disolvió en dimetilsulfóxido y a continuación se permitió basándose en el procedimiento de Anumula y Taylor (Anumula y Taylor, 1992). La reacción se inactivó por adición de agua y se trajeron carbohidratos per-O-metilados con diclorometano. Los glicanos per-O-metilados se secaron bajo una corriente de nitrógeno.

[0185] Se llevó a cabo MALDI/TOF-MS (desorción/ionización láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo) en el modo de ión positivo reflector usando ácido  $\alpha$ -dihidroxibenzoico (DHBA, solución de 20 mg/ml en 50% de metanol:agua) como una matriz. Todos los espectros se obtuvieron usando un Microflex LRF (Bruker).

5 [0186] Se realizaron un análisis MALDI-TOF-MS y ESI MS/MS (espectrometría de masas en tandem con ionización por electrospray) en los oligosacáridos tras la liberación de la cadena principal del péptido y la purificación tal como se entiende en la técnica. Las muestras de las especies de polisacáridos individuales también se digirieron con ciertas enzimas y los productos de digestión se analizaron por HPLC tal como se entiende en la técnica.

10 [0187] Se cree que existen aproximadamente seis sitios de glicosilación unidos a N presentes en la LAL humana. Véase, Zschenker, et al (2005) J. Biochem., Vol 137, pág. 387-394.

[0188] Esta referencia también indica que puede haber un sitio de glicosilación unido a O en la LAL humana. Las estructuras de oligosacáridos unidos a N identificados se muestran en la figura 16.

15 [0189] Los datos revelaron que muchas o todas estas estructuras se encontraban como una estructura de glicosilación unida a N en LAL producida de acuerdo con la descripción (Figura 16). Por ejemplo, A-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, O-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, al menos uno de B-n, C-n y D-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, al menos uno de E-n y F-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, al menos uno de I-n y J-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, al menos uno de K-n y L-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, al menos uno de M-n y N-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, G-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción. Por ejemplo, H-n se encuentra unido a LAL producida de acuerdo con la descripción.

### Ejemplo 11

#### **Especies de N-glicano de LAL derivada de ave transgénica**

30 [0190] Se dializaron muestras purificadas de hLAL derivada de ave transgénica (600  $\mu$ g/muestra) utilizando un tubo-O-dializador (membrana de corte de 4,0 kDa; G BioSciences) contra agua nanopura a 4°C durante aproximadamente 24 horas para eliminar sales y otros contaminantes. El agua nanopura fue reemplazada cuatro veces durante todo el período diálisis.

35 [0191] Después de la diálisis, cada una de las muestras se dividió en tres alícuotas: ~ 1/4 del peso de la muestra para el análisis de azúcares neutros y amino, ~ 1/4 del peso de la muestra para el análisis de manosa-6-fosfato, y ~ 1/2 del peso de la muestra para el perfil de oligosacárido. La alícuota destinada al análisis de azúcares neutros y amino se hidrolizó con ácido trifluoroacético (TFA) 2 N a 100°C durante 4 horas y la alícuota para el análisis de manosa-6-fosfato se hidrolizó con TFA 6,75 N a 100°C durante 1,5 horas. Los hidrolizados se secaron a continuación bajo  $N_2$ , se redisolvieron con 50  $\mu$ l de  $H_2O$ , se sonicaron durante 7 min en hielo y se transfirieron a un vial de inyección. Sin embargo, las muestras de azúcar neutros y amino se diluyeron 2 veces porque los picos producidos a partir de los hidrolizados disueltos originalmente eran demasiado grandes.

45 [0192] Se hidrolizó una mezcla de patrones para azúcares neutros y amino, y para manosa-6-fosfato con un número conocido de moles de la misma manera y al mismo tiempo que la muestra. Se prepararon cuatro concentraciones de la mezcla de patrones de azúcar neutro y amino (Fuc y GalNAc, 0,2, 0,4, 0,8, y 1,6 nmoles por 10  $\mu$ l; GlcNAc, 0,5, 1,0, 2,0, y 4,0 nmoles por 10  $\mu$ l; Gal y Man, 0,3, 0,6, 1,2, y 2,4 nmoles por 10  $\mu$ l; y Glc, 0,1, 0,2, 0,4, y 0,8 nmoles por 10  $\mu$ l) y manosa-6-fosfato (640, 1280, 2560, 5120 picomoles por 10  $\mu$ l) para establecer una ecuación de calibración. El número de moles de cada azúcar en la muestra se cuantificó mediante interpolación lineal a partir de la ecuación de calibración.

55 [0193] Los azúcares neutros y amino y manosa-6-fosfato se analizaron mediante HPAEC usando un sistema Dionex ICS3000 equipado con una bomba de gradiente, un detector electroquímico y un muestreador automático. Los azúcares neutros y amino individuales, y la manosa-6-fosfato se separaron mediante una columna analítica Dionex CarboPac PA20 (3 x 150 mm) con un atrapador de amino. Los programas de gradiente utilizaron eluyentes A, agua nanopura desgasificada y B, NaOH 200 mM para azúcares neutros y amino, y C, NaOH 100 mM y D, acetato de sodio 1 M en NaOH 100 mM para manosa-6-fosfato. Se realizó una inyección (10  $\mu$ l/inyección) cada 40 minutos para la determinación del azúcar neutro y amino y cada 35 minutos para la determinación de la manosa-6-fosfato. Todos los procedimientos se basaron en los protocolos descritos por Hardy y Townsend (Hardy, M.R., y Townsend; R.R. "High-pH anion-exchange chromatography of glycoprotein-derived carbohydrates", 1994, Methods Enzymol 230: 208-225). El control de los instrumentos y la adquisición de datos se realizaron utilizando el software Chromeleon Dionex. Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación. La muestra de control es ovomucoide purificado a partir de EW.

65

**Tabla 1. Composición de monosacáridos de control y LAL mediante HPAEC**

Muestra ID	Analito	nanomoles	nanomoles/μg	moles %
Control	Fucosa	nd	-	-
	N-acetil galactosamina	5,066	0,020	9,6
	N-acetil glucosamina	26,947	0,108	51,4
	Galactosa	3,876	0,016	7,4
	Glucosa	nd	-	-
	Manosa	16,565	0,066	31,6
	Manosa-6-fosfato	nd	-	-
	ácido N-acetil neuramínico	ndm	-	-
	ácido N-glicolil neuramínico	ndm	-	-
	Fucosa	nd	-	-
	N-acetil galactosamina	nd	-	-
hLAL derivada de ave transgénica	N-acetil glucosamina	17,932	0,120	37,6
	Galactosa	0,879	0,006	1,8
	Glucosa	nd	-	-
	Manosa	23,290	0,155	48,8
	Manosa-6-fosfato	5,642	0,038	11,8
	ácido N-acetil neuramínico	ndm	-	-
	ácido N-glicolil neuramínico	ndm	-	-
	Fucosa	nd	-	-
	N-acetil galactosamina	nd	-	-
	N-acetil glucosamina	nd	-	-

nd = no detectado; ndm = no determinado

**Características estructurales de LAL**

5 [0194] LAL tiene 6 sitios potenciales en su secuencia de aminoácidos para la N-glicosilación, Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>72</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup>. Se encontró que cinco de ellos, Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup> estaban glicosilados, mientras que Asn<sup>72</sup> no estaba glicosilado o sustancialmente glicosilado (sustancialmente no glicosilado significa en una mezcla de moléculas de LAL, menos Asn<sup>72</sup> están glicosilados que cualquiera de Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup>). Por consiguiente, un aspecto de la descripción es LAL (por ejemplo, LAL humana), que no está glicosilada y/o sustancialmente glicosilado en Asn<sup>72</sup>, y la producción y el uso de dicha LAL. Sin embargo, LAL que tiene una Asn<sup>72</sup> glicosilada está dentro del alcance de la descripción. Las estructuras de N-glicano consisten principalmente en una mezcla de estructuras biantenarias, triantenarias y tetraantenarias con N-acetilglucosamina, manosa y manosa-6-fosfato (M6P) como los principales azúcares. Cada sitio parece tener un conjunto favorecido de estructuras (Tabla 2 y Figura 17).

10 [0195] Por ejemplo, N-glicanos modificados con M6P residen al menos en Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup> y Asn<sup>273</sup>. Las estructuras no fosforiladas son típicas de N-glicanos que se encuentran en las proteínas endógenas de clara de huevo. No se detectaron glicanos unidos por O tal como se determina por la falta de N-acetilgalactosamina (GalNAc). No se detectó ácido siálico lo cual es consistente con estructuras de N-glicano determinadas previamente de otras proteínas endógenas y exógenas producidas de acuerdo con la descripción. La descripción incluye LAL glicosilada con una o más de las estructuras de oligosacáridos descritas en este documento.

**Tabla 2. Sitio de residencia de estructuras de glicano de LAL determinado mediante LC/MS de glicopéptidos**

Sitio	Estructura de glicano
Asn <sup>36</sup>	GlcNAc4Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2
Asn <sup>72</sup>	No detectado
Asn <sup>101</sup>	Phos2Man7GlcNAc2
Asn <sup>161</sup>	Phos1Man6GlcNAc2 GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2 Man3GlcNAc2 GlcNAc2Man3GlcNAc2 GlcNAc2Man3GlcNAc2
Asn <sup>273</sup>	GlcNAc3Man3GlcNAc2 GlcNAc4Man3GlcNAc2 Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2 Man7GlcNAc2

	Man8GlcNAc2
	Man9GlcNAc2
	Phos1Man8GlcNAc2
	Phos1Man9GlcNAc2
Asn <sup>321</sup>	GlcNAc2Man3GlcNAc2
	GlcNAc3Man3GlcNAc2
	GlcNAc4Man3GlcNAc2
	Hex1GlcNAc4Man3GlcNAc2
	GlcNAc5Man3GlcNAc2
	Hex1GlcNAc5Man3GlcNAc2
	GlcNAc6Man3GlcNAc2
	Hex1GlcNAc6Man3GlcNAc2
	Hex, galactosa; Phos, fosfato; Man, manosa; GlcNAc2, N-acetilglucosamina

### Procedimientos

[0196] Se determinó la composición de monosacáridos, incluidos los neutros, amino y M6P, cualitativa y cuantitativamente mediante detección amperométrica pulsada con cromatografía de intercambio aniónico de pH elevado (HPAEC-PAD).

[0197] Las estructuras de los glicanos predominantes se determinaron con los datos de varios procedimientos de espectrometría de masas (MALDI-TOF, NSI-MS/MS y LC-MS de glicopéptidos).

[0198] MALDI-TOF era útil para la determinación de N-glicanos neutros y fue capaz de detectar N-glicanos fosforilados (Figura 18). NSI-MS/MS se empleó para determinar la naturaleza de los picos menores en los espectros de MALDI-TOF, algunos de los cuales se atribuyeron a N-glicanos fosforilados (Figura 19). Los esfuerzos para mejorar la capacidad de MALDI-TOF para detectar N-glicanos fosforilados no fueron fructíferos.

[0199] LC/MS de glicopéptidos fue capaz de detectar estructuras neutras y fosforiladas y fue capaz de determinar la posición de estructuras específicas en la secuencia de aminoácidos de LAL (datos resumidos en la Figura 17 y en la Tabla 2).

[0200] Para determinar qué picos en el chromatograma de HPAEC-PAD se deben a N-glicanos fosforilados, LAL se trató con fosfatasa y se analizó (Figura 3). Los picos en los grupos C y D disminuyeron en área bajo la curva (AUC), mientras que un pico en el grupo A se hizo más prominente. Los picos en el grupo B no cambiaron en proporción a los otros picos. Basado en el conocimiento de que el tiempo de retención es proporcional al grado de carga (ya sea debido a la fosforilación o a la sialilación), se contempla que el grupo C se compone de N-glicanos con un fosfato (mono M6P) y el grupo D está compuesto de N-glicanos con dos fosfatos (bis-M6P).

[0201] El tiempo de retención también se vio afectado por la composición y posición estructural relativa de los monosacáridos neutros y amino. Tales ejemplos incluyen la presencia de galactosa, la presencia de un GlcNAc en biseción y el grado de sustitución GlcNAc. Tales factores contribuyen a la multiplicidad de los picos en el chromatograma HPAEC-PAD.

### Ejemplo 12

#### Análisis de actividad enzimática *in vitro* de hLAL derivada de ave transgénica en clara de huevo

[0202] Se determinó la actividad de lipasa ácida lisosomal en la clara de huevo utilizando el sustrato fluorogénico ensayo de oleato de 4-metilumbeliferilo esencialmente como se describe en Yan et al. (2006), American Journal of Pathology, vol. 169, No. 3, pág. 916-926.

[0203] Se preparó una solución madre de oleato de 4-metilumbeliferilo (4-MUO) que consistía en 4-MUO 2,5 mM en Triton X-100 al 4%. El ensayo se realizó en una placa de microtitulación contenido cada pocillo 62,5 µl de citrato de sodio 0,2 M (pH 5,5) en Tween80 al 0,01%, 12,5 µl de muestra de clara de huevo y 25 µl de 4-MUO2,5 mM. El cambio en la fluorescencia se monitorizó durante 30 minutos a 37°C utilizando un lector fluorométrico de microplacas Bio-Tek Synergy HT (excitación 360 nm y emisión 460 nm). Antes del ensayo, la clara de huevo que contenía la hLAL se diluyó hasta una concentración de enzima que dio lugar a que la reacción continuó linealmente durante al menos 30 minutos. La reacción se detuvo con 50 micras µl de Tris-HCl0,75 M, pH 8,0 y la señal de fluorescencia de punto final se midió en el mismo lector de placas usado anteriormente (excitación 360 nm y emisión 460 nm).

[0204] Las unidades de actividad se determinaron usando 4-metilumbeliferilo como patrón. Una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que da como resultado la formación de 1 umol de 4-metilumbeliferilo/min bajo las condiciones de ensayo descritas anteriormente. Se utilizó clara de huevo que no contenía hLAL como control negativo.

[0205] Las muestras de clara de huevo que fueron positivos para hLAL contenían entre 1 U y 100 U de actividad por ml de clara de huevo. Se analizó la clara de huevo de 21 pollos G1. La clara de huevo de 10 de los pollos dio positivo para la actividad hLAL.

5

### Ejemplo 13

#### Análisis *in vitro* de LAL derivada de ave transgénica

- 10 [0206] Se examinó *in vitro* la capacidad de LAL producida en las células de oviducto de aves transgénicas (denominadas en este documento como "SBC-102", "LAL derivada de ave", "LAL", o "hLAL") para unirse a células y ser internalizada en el compartimento lisosomal utilizando células de macrófagos y fibroblastos. Cuando se incuba con células de macrófagos, se encontró que el SBC-102 marcado fluorescentemente se localizaba en el lisosoma. Este efecto podría atenuarse mediante el uso de un competidor de polisacárido de manosa, implicando al receptor de N-acetilglucosamina/manosa (GlcNAc/manosa) como un mecanismo de reconocimiento y captación por estas células. SBC-102 aumentó la actividad LAL asociada a las células en fibroblastos humanos deficientes de LAL y fibroblastos murinos normales después de la incubación *in vitro*, lo que indica que la exposición a SBC-102 puede resultar en la sustitución sustancial de actividad enzimática deficiente.
- 15 [0207] La manosa-6-fosfato (M6P) está presente en las estructuras de oligosacáridos de SBC-102 que se ha demostrado que están implicadas en la liberación de enzimas lisosomales a una amplia variedad de tipos de células a través del receptor de M6P ubicuo.
- 20 [0208] Se purificó LAL de la clara de huevo de gallinas transgénicas. Se obtuvo Oregon Green NHS de Invitrogen™ (# 0-10241). La línea de macrófagos de rata alveolar, NR8383, y la línea de fibroblastos de ratón, NIH-3T3, se obtuvieron de ATCC. Los fibroblastos de Wolman deficientes en LAL se obtuvieron de Coriell Institute for Medical Research y Lysotracker® Red se obtuvo de Invitrogen™.
- 25 [0209] Marcaje de enzimas: Se marcaron 4 mg de LAL derivada de ave transgénica en PBS con Oregon Green, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y la reacción se dializó posteriormente contra PBS, a continuación se concentró.
- 30 [0210] Captación de macrófagos: Se incubaron LAL derivada de ave transgénica marcada fluorescentemente (5 µg/ml) y Lysotracker® Red con células NR8383 durante 2 horas. Las células fueron examinadas mediante microscopía de fluorescencia confocal utilizando un modo de rastreo secuencial a 488 nm y a continuación 514 nm.
- 35 [0211] Inhibición competitiva con manano: Se incubaron SBC-102 marcada fluorescentemente (5 ug/ml) y manano con células NR8383 durante 2 horas. Las células se tripsinizaron y la captación de LAL se midió mediante clasificación celular activada por fluorescencia usando la intensidad de fluorescencia mediana como el punto final.
- 40 [0212] La capacidad de la LAL derivada de ave transgénica para ser captada y posteriormente incorporarse en los lisosomas de las células diana se examinó usando la línea celular de macrófagos, NR8383. Se incubaron la LAL derivada de ave transgénica marcada con fluorescencia y el marcador lisosomal, "Lysotracker® Red" (Invitrogen™) con células durante 2 horas. La colocalización de LAL derivada de ave transgénica y marcador lisosomal en los lisosomas de estas células se examinó posteriormente mediante microscopía de fluorescencia confocal utilizando un modo de rastreo secuencial (Figura 20). La LAL mostró la localización a los lisosomas, que es consistente con estudios *in vitro* similares utilizando rhLAL de una variedad de fuentes.
- 45 [0213] La especificidad de unión de LAL derivada de ave transgénica al receptor de GlcNAc/manosa se ha evaluado mediante ensayos de unión competitiva utilizando la línea celular de macrófagos, NR8383 (Figura 21). Se coincubaron LAL derivada de ave transgénica marcada fluorescentemente (Oregon Green) a 5 µg/ml y diversas concentraciones del oligosacárido que contiene manosa, manano, con células durante 2 horas. La inhibición relativa de la captación de LAL derivada de ave transgénica por manano, en comparación con un control sin manano, se cuantificó por análisis de clasificación celular activada por fluorescencia usando la intensidad de fluorescencia mediana como el punto final. Se observó una inhibición dependiente de la dosis de manosa en la captación/unión de LAL derivada de ave transgénica, lo cual es coherente con la interacción de LAL derivada de ave transgénica:GlcNAcR.
- 50 [0214] Además, la captación mediada por manosa-6-fosfato en células de fibroblastos se demostró mediante experimentos de competición con manosa-6-fosfato (resultados no mostrados).
- 55 [0215] Se ha examinado la capacidad de la exposición de LAL derivada de ave transgénica para aumentar la actividad LAL en las células utilizando células normales y deficientes en LAL *in vitro*. Se incubaron fibroblastos aislados a partir de un paciente de Wolman y fibroblastos murinos normales (NIH-3T3) en presencia de LAL derivada de ave transgénica a concentraciones de 0, 0,16 o 0,5 µg/ml durante 5 horas. A continuación, las células se lavaron para eliminar la señal no específica y se ensayaron los lisados celulares por la actividad de LAL usando el sustrato

4-MUO. La actividad de LAL endógena asociada a células fue menor en los fibroblastos de Wolman en comparación con NIH-3T3 y se observaron aumentos dependientes de la dosis en la actividad en ambos tipos de células después de la incubación con LAL derivada de ave transgénica (Fig. Fig. 22).

## 5 Ejemplo 14

### **Análisis *in vivo* de LAL derivada de ave transgénica**

10 [0216] Se trataron ratas Yoshida (es decir, homocigotas) deficientes en LAL (ver Kuriyama et al (1990), Journal of Lipid Research, vol 31, pág. 1605-1611; Nakagawa et al, (1995) Journal of Lipid Research, vol 36, pág. 2212-2218; y Yoshida y Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol 40, pág. 486-489) con SBC-102 (5 mg/kg, IV) o placebo, una vez/semana durante cuatro semanas a partir de las cuatro semanas de vida. Para cada administración el SBC-102 se inyectó en la vena de la cola de la rata en dos dosis iguales (2,5 mg/kg) con 30 minutos de diferencia. Las ratas y los controles de tipo natural emparejados por edad se examinaron una semana después de la dosis final. Los análisis se realizaron por triplicado.

15 [0217] El examen patológico macroscópico de los animales tratados con SBC-102 demostró la normalización en el color de hígado además de la reducción en el tamaño del órgano. Las ratas tratadas con SBC-102 mostraron una histología hepática esencialmente normal en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con vehículo (datos no presentados). Los niveles de alanina y aspartato transferasas en suero, que están elevados en ratas con LAL<sup>-/-</sup>, también se redujeron en ratas tratadas con SBC-102 (no mostrados).

20 [0218] Se determinó la masa de órganos y tejidos internos para cada rata y los datos se muestran en la Figura 23. El tamaño del órgano se representa como el porcentaje del peso corporal determinado a las 8 semanas de vida, en ratas LAL<sup>-/-</sup> y ratas LAL<sup>+/+</sup> después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg/kg durante 4 semanas.

25 [0219] El peso corporal de las ratas Yoshida tratadas con SBC-102 o vehículo se compararon con ratas de tipo natural, tal como se muestra en la Figura 24. SBC-102 (5 mg/kg) o vehículo se administraron mediante inyección IV, ya sea como una dosis única o como dosis separadas (dentro de un período de 4 horas) para ratas LAL<sup>-/-</sup>. Las ratas LAL<sup>+/+</sup> son controles de una camada emparejados por edad.

## 30 Ejemplo 15

### **Análisis de triglicéridos**

35 [0220] El análisis de triglicéridos se realizó en el tejido del hígado y el bazo de tejido de tipo natural, placebo homocigoto y animales homocigotos tratados SBC-102. Los análisis de triglicéridos se realizaron utilizando metodologías estándar (es decir, kit de cuantificación de triglicéridos de MBL Internacional Catálogo # JM-K622-100) y se realizaron por triplicado.

**Tabla 3: Niveles de triglicéridos en hígado y bazo en ratas de tipo natural y deficientes en LAL**

<b>Triglicérido (ug/mg de tejido húmedo)</b>			
	<b>Tipo natural (n = 3)</b>	<b>Placebo (n = 3)</b>	<b>SBC-102 (n = 3)</b>
<b>Hígado</b>	<b>48</b>	<b>84</b>	<b>57</b>
<b>Bazo</b>	<b>3</b>	<b>22</b>	<b>4</b>

## 45 **Niveles de sustrato en hígado**

[0221] La figura 25 muestra los niveles de colesterol, ésteres de colesterol y triglicéridos en el hígado determinados a las 8 semanas de vida, en ratas WT y deficientes de LAL después de la administración semanal de vehículo o SBC-102 a 5 mg·kg<sup>-1</sup> durante 4 semanas.

## 50 Ejemplo 16

### **Estudio de respuesta a la dosis**

55 [0222] En base a los estudios realizados anteriormente, se examinaron los efectos farmacodinámicos (PD) de un intervalo de dosis y programas de dosis (cada semana y cada dos semanas) de LAL ("SBC-102") en ratas LAL<sup>-/-</sup>. En estos estudios, se administró SBC-102 mediante inyecciones IV en dosis de 0,2, 1, 3 y 5 mg/kg, cada dos semanas, o 0,35, 1 y 5 mg/kg, cada semana, durante 1 mes, a partir de las 4 semanas de vida. Los resultados demuestran mejoras en la ganancia de peso corporal (BW) (Figura 26), organomegalia (Figura 27), y los niveles de sustrato en tejido (Figura 28). Los niveles séricos de transaminasas también se redujeron a medida que aumentaba la dosis de SBC-102, con niveles que alcanzan esencialmente los niveles de tipo natural en las dosis más altas.

**Ejemplo 17****Administración de LAL recombinante en un modelo de rata**

- 5 [0223] Se evaluaron los efectos de repetición de la dosificación con lipasa ácida lisosomal (LAL) recombinante sobre el peso, los triglicéridos y el colesterol del tejido, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, peso intestinal, y otros parámetros en ratas Donryu deficientes de LAL descritos en Yoshida y Kuriyama (1990) Laboratory Animal Science, vol. 40, pág. 486-489 (véase también Kuriyama et al (1990) Journal of Lipid Research, vol 31, pág. 1605-1611; Nakagawa et al, (1995) Journal of Lipid Research, vol 36, pág. 2212- 2218).
- 10 [0224] A las 4 semanas de vida, las ratas Donryu homocigotas para la delección LAL ( $LAL^{-/-}$ ) fueron asignadas en grupos para dosificarse con LAL recombinante humana producida en un sistema de oviducto de pollo transgénico o un placebo de solución salina. Como controles se utilizaron ratas de una camada de tipo natural emparejadas por la edad. Las ratas  $LAL^{-/-}$  se dosificaron una vez por semana durante cuatro semanas (cuatro dosis en total) o una vez cada dos semanas durante cuatro semanas (dos dosis en total) mediante inyección en la vena de la cola como una sola dosis o en dos dosis iguales con 30 minutos de diferencia. Las dosis de LAL fueron 1 mg/kg o 5 mg/kg. La programación de dosificación se muestra en la Tabla 4. Las ratas se pretrataron con difenhidramina (5 mg/kg) para contrarrestar el riesgo de reacciones anafilácticas, un procedimiento que se basa en experiencias anteriores en modelos animales de terapia de reemplazo enzimático para el tratamiento de la enfermedad de almacenamiento lisosomal (Shull et al (1994) Proceedings of the National Academy of Science, vol 91, pág.12937; Bielicki et al (1999) The Journal of Biological Chemistry, 274, pág. 36335; Vogler et al (1999) Pediatric Research, 45, pág. 838).
- 15 [0225] La figura 29 muestra el progreso diario en el aumento de peso de las ratas que se les administró 1 mg/kg de LAL por semana o 5 mg/kg de LAL por semana o 5 mg/kg de LAL en dos semanas. Se puede observar en la figura que hay poca o ninguna diferencia en el efecto terapéutico entre los dos tamaños y frecuencias de dosis.

**Tabla 4. Programación de pesado y dosificación**

Día desde el nacimiento	Valoraciones/inyecciones realizadas
Día 13	PESADO
Día 14	
Día 20	
Día 21	Cachorro destetado
Día 24	
Día 25	
Día 27	
Día 28	Primera inyección para la administración una vez por semana y una vez cada dos semanas
Día 31	
Día 32	
Día 34	
Día 35	Segunda inyección para la administración una vez cada semana
Día 38	
Día 39	
Día 41	
Día 42	Tercera inyección para la administración una vez por semana; segunda administración una vez cada dos semanas
Día 45	
Día 48	
Día 49	Cuarta inyección para la administración una vez cada semana
Día 55	
Día 56	Necropsia

**Examen patológico de ratas  $LAL^{-/-}$  tratadas con LAL recombinante**

- 30 [0226] A la terminación del estudio descrito en el Ejemplo 1, los animales de estudio fueron humanamente sacrificados y se realizó una necropsia para examinar macroscópicamente la patología, la histopatología, y la química clínica. La necropsia macroscópica incluyó el examen de la superficie externa del cuerpo, todos los orificios, y las cavidades craneales, torácicas y abdominales y sus contenidos. Se determinó la masa de órganos y tejidos

internos para las ratas y se recogieron los órganos y tejidos y se fijaron en formalina al 10% tamponada neutra. Después de la fijación, los tejidos se procesaron y se prepararon y evaluaron portaobjetos histológicos de secciones manchadas de hematoxilina y eosina.

- 5 [0227] El examen patológico macroscópico de los animales tratados analizados mostró una normalización sustancial en el tamaño y el color del hígado tal como puede verse en la disección que se muestra en la Figura 30. Se determinaron las relaciones de peso del órgano con respecto al cuerpo y mostraron una reducción en el tamaño relativo del órgano para el hígado, bazo, tejido mesentérico, duodeno, yeyuno e íleon en los animales tratados con éxito que fueron disecados, en comparación con las ratas tratadas con placebo (Figura 23). La histopatología de tejido hepático de LAL de ratas tratadas analizadas muestra una histología hepática esencialmente normal en marcado contraste con la acumulación sustancial de macrófagos espumosos en los animales tratados con placebo (Figura 30).

#### Ejemplo 18

##### **Tratamiento de la enfermedad de Wolman (WD) mediante la administración de LAL recombinante**

[0228] A las 7 semanas de vida una paciente es ingresada en el hospital a causa de dificultades en la ganancia de peso y la mala evolución desde su nacimiento. En el examen físico inicial la paciente pesa 3,6 kg (peso al nacer 3,7 kg) y es delgada con pliegues de la piel suelta. El abdomen está distendido con una hepatomegalia firme de 6 cm y una esplenomegalia firme de aproximadamente 4 cm. Se observan ganglios linfáticos agrandados en la ingle y la actividad muscular es débil.

[0229] El nivel de hemoglobina inicial es 9,2 gm, plaquetas 506.000, y glóbulos blancos 11.550. El análisis de orina es normal y el frotis de médula ósea reveló linfocitos vacuolados y numerosas células espumosas. Mediciones químicas del suero: lípidos totales 834 mg/100 ml, fosfolípidos 176 mg/100 ml, triglicéridos 141 mg/100 ml, colesterol 129 mg/100 ml, bilirrubina 0,3 mg/100 ml, fosfatasa alcalina 9,0 %BU, SGOT 90 unidades, SGPT 50 unidades, 20 unidades de la colinesterasa, urea de nitrógeno 8,3 mg, azúcar en ayuno 45 mg/100 ml. El TC de abdomen muestra hepatoesplenomegalia y glándulas suprarrenales bilaterales simétricamente agrandadas con calcificación.

[0230] Al paciente se le implanta quirúrgicamente un puerto de acceso vascular venoso para la dosificación. Despues de conectar el puerto a una máquina de infusión ambulatoria, el paciente se trata previamente con 1 mg/kg de difenhidramina 20 minutos antes de la infusión de LAL con el fin de contrarrestar posibles reacciones anafilácticas a la infusión. Al paciente se le administra a continuación LAL a 1 mg/kg en el transcurso de 5 horas por infusión intravenosa. Esta terapia se repite una vez cada 7 días durante un tiempo indefinido.

[0231] Dentro de las dos semanas de la administración de la primera dosis de LAL, el paciente experimenta una mejora significativa en el aumento de peso y la normalización den el tamaño de los órganos abdominales clave, tal como se determina mediante ultrasonidos. Los resultados de laboratorio demuestran que la infusión de la LAL restaura la actividad de la lipasa ácida lisosomal en el paciente y conduce a la corrección de las alteraciones relacionadas.

#### Ejemplo 19

##### **Tratamiento de la enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol (CESD) mediante la administración de LAL recombinante**

[0232] Se examina un niño de 3 años de vida con una erupción pruriginosa abdominal por su pediatra. Tras un examen abdominal, se observa hepatomegalia por el médico y se confirma por ultrasonido. En este punto no se hace el diagnóstico y el paciente se monitoriza periódicamente.

[0233] A la edad de 8 años es ingresado en el hospital con gastroenteritis. Una microscopía óptica de una biopsia de hígado muestra un aumento de glucógeno intracitoplasmático y pequeñas gotas de lípidos en los hepatocitos. La microscopía electrónica muestra gotitas de lípidos unidas a la membrana con gránulos densos de electrones pequeños. Se hace un diagnóstico de trabajo de la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo III (enfermedad DeBrancher), pero la actividad DeBrancher de los fibroblastos de la piel es normal.

[0234] A la edad de 10 años, persiste la hepatomegalia y se toma una segunda biopsia de hígado. Una microscopía óptica muestra una arquitectura lobular alterada del parénquima hepático con hepatocitos distendidos que contienen gránulos citoplasmáticos y vacuolas con fibrosis periportal leve. Se encuentra que la actividad de la lipasa ácida en fibroblastos es del 7% de lo normal, lo que confirma el diagnóstico de CESD. Las concentraciones plasmáticas de colesterol total (TC), triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) están cada una por encima del percentil 95 para la edad y el sexo a 7,51, 3,24 y 5,58 mmol/L, respectivamente, mientras que el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) en plasma está por debajo del percentil 5 a 0,47 mmol/L; ha combinado la hiperlipidemia (hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia e hiperbetaipoproteinemia).

5 [0235] Al paciente se le implanta quirúrgicamente un puerto de acceso vascular venoso para la dosificación. Después de conectar el puerto a una máquina de infusión ambulatoria, el paciente se trata previamente con 5 mg/kg de difenhidramina 20 minutos antes de la infusión de LAL con el fin de contrarrestar posibles reacciones anafilácticas a la infusión. Al paciente se le administra a continuación LAL a 5 mg/kg en el transcurso de 5 horas por infusión intravenosa. Esta terapia se repite una vez cada 14 días indefinidamente.

10 [0236] Dentro de las dos semanas de la administración de la primera dosis de LAL, el paciente experimenta una mejora significativa en el aumento de peso y la normalización en el tamaño de los órganos clave, tal como se determina mediante ultrasonido. Los resultados de laboratorio demuestran que la infusión de la LAL restaura la actividad de la lipasa ácida lisosomal en el paciente y conduce a la corrección de las alteraciones relacionadas.

#### Ejemplo 20

##### 15 Descripción y composición del medicamento

20 [0237] La sustancia fármaco de LAL descrito en este documento ("SBC-102") es una lipasa ácida lisosomal recombinante humana (rhLAL) purificada a partir de la clara de huevo producida a partir de *Gallus* transgénico. Los excipientes utilizados en SBC-102 son similares a los utilizados para otros productos para los trastornos de almacenamiento lisosomal (LSD) que están actualmente en el mercado, y se han seleccionado para mantener la estabilidad del producto farmacéutico.

25 [0238] SBC-102 es un líquido claro, incoloro, estéril proporcionado en un vial de vidrio transparente de borosilicato de tipo I con un tapón recubierto de látex no natural (butilo), FluroTec®, y sellado hermético de aluminio. SBC-102 se proporciona como una solución acuosa compuesta de SBC-102 (2 mg/ml), citrato trisódico dihidratado (13,7 mg/ml, USP), ácido cítrico monohidratado (1,57 mg/ml, USP), albúmina de suero humano (10 mg/ml, USP), y agua para inyección (hasta el volumen final, USP). El pH de SBC-102 es 5,9 ± 0,2. SBC-102 no contiene conservantes y los viales están destinados para un solo uso.

30 Tabla 5. Excipientes en SBC-102 (LAL)

Excipiente	Número CAS	Grado	Función
citrato trisódico dihidratado	6132-04-03	USP	Tampón
ácido cítrico monohidratado	5949-29-1	USP	Tampón
albúmina de suero humano	70024-90-7	USP	Estabilizante

#### Componentes del producto farmacéutico

##### 35 [0239]

Tabla 6 Formulación de SBC-102

Componente	Concentración
SBC-102 (rhLAL)	2 mg/ml*
citrato trisódico dihidratado	13,7 mg/ml
ácido cítrico monohidratado	1,57 mg/ml
albúmina de suero humano	10 mg/ml
Agua para inyección, cantidad suficiente para	1,0 ml

40 [0240] Cada ejemplo en la memoria descriptiva anterior se proporciona a modo de explicación de la descripción, no como limitación de la invención. De hecho, será evidente para un experto en la materia que se pueden realizar en la presente descripción varias modificaciones, combinaciones, adiciones, eliminaciones y variaciones.

45 [0241] Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una realización se pueden usar en otra realización para generar una realización adicional. Se pretende que la presente descripción cubra dichas modificaciones, combinaciones, adiciones, eliminaciones y variaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Lipasa ácida lisosomal recombinante humana (rhLAL) aislada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 19, con N-glicanos unidos a los residuos de asparagina (Asn) que corresponden a Asn<sup>36</sup>, Asn<sup>101</sup>, Asn<sup>161</sup>, Asn<sup>273</sup> y Asn<sup>321</sup> de SEQ ID NO: 1, en la que la rhLAL no contiene O-glicanos, y en la que lo N-glicanos unidos a los residuos de Asn que corresponden a SEQ ID NO: 1 son:
- 5 a) en Asn<sup>36</sup>, GlcNAc4Man3GlcNAc2 o  
Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2;
  - 10 b) en Asn<sup>72</sup>, sin glicosilación;
  - c) en Asn<sup>101</sup>, Phos2Man7GlcNAc2;
  - d) en Asn<sup>161</sup>, Phos1Man6GlcNAc2,
- 15 GlcNAc1Phos1Man6GlcNAc2;  
Man3GlcNAc2;  
GlcNAc2Man3GlcNAc2;  
GlcNAc3Man3GlcNAc2;  
GlcNAc4Man3GlcNAc2 o  
Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2;
- 20 e) en Asn<sup>273</sup>, Man7GlcNAc2,  
Man8GlcNAc2,  
Man9GlcNAc2,  
25 Phos1Man8GlcNAc2 o  
Phos1Man9GlcNAc2; y  
f) en Asn<sup>321</sup>, GlcNAc2Man3GlcNAc2,
- 30 GlcNAc3Man3 GlcNAc2,  
GlcNAc4Man3 GlcNAc2,  
Gal1GlcNAc4Man3GlcNAc2,  
GlcNAc5Man3GlcNAc2,  
Gal1GlcNAc5Man3 GlcNAc2,  
35 GlcNAc6Man3GlcNAc2, o  
GallGlcNAc6Man3GlcNAc2; en las que
- 40 Man = manosa,  
GlcNAc = N-acetil glucosamina,  
Phos = fosfato y  
Gal = galactosa.
- 45 2. rhLAL de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha rhLAL es la SEQ ID NO: 2.
- 50 45 3. rhLAL de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha rhLAL es la SEQ ID NO: 3.
- 55 4. rhLAL de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha rhLAL es la SEQ ID NO: 4.
5. rhLAL de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha rhLAL es la SEQ ID NO: 19.
6. rhLAL de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, producida mediante un proceso que comprende expresar dicha rhLAL en el oviducto de un ave.
7. rhLAL de la reivindicación 6, en la que la rhLAL se produce en células de oviducto de un pollo.
8. Composición farmacéutica que comprende rhLAL, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en una formulación que comprende además portadores farmacéuticamente aceptables.

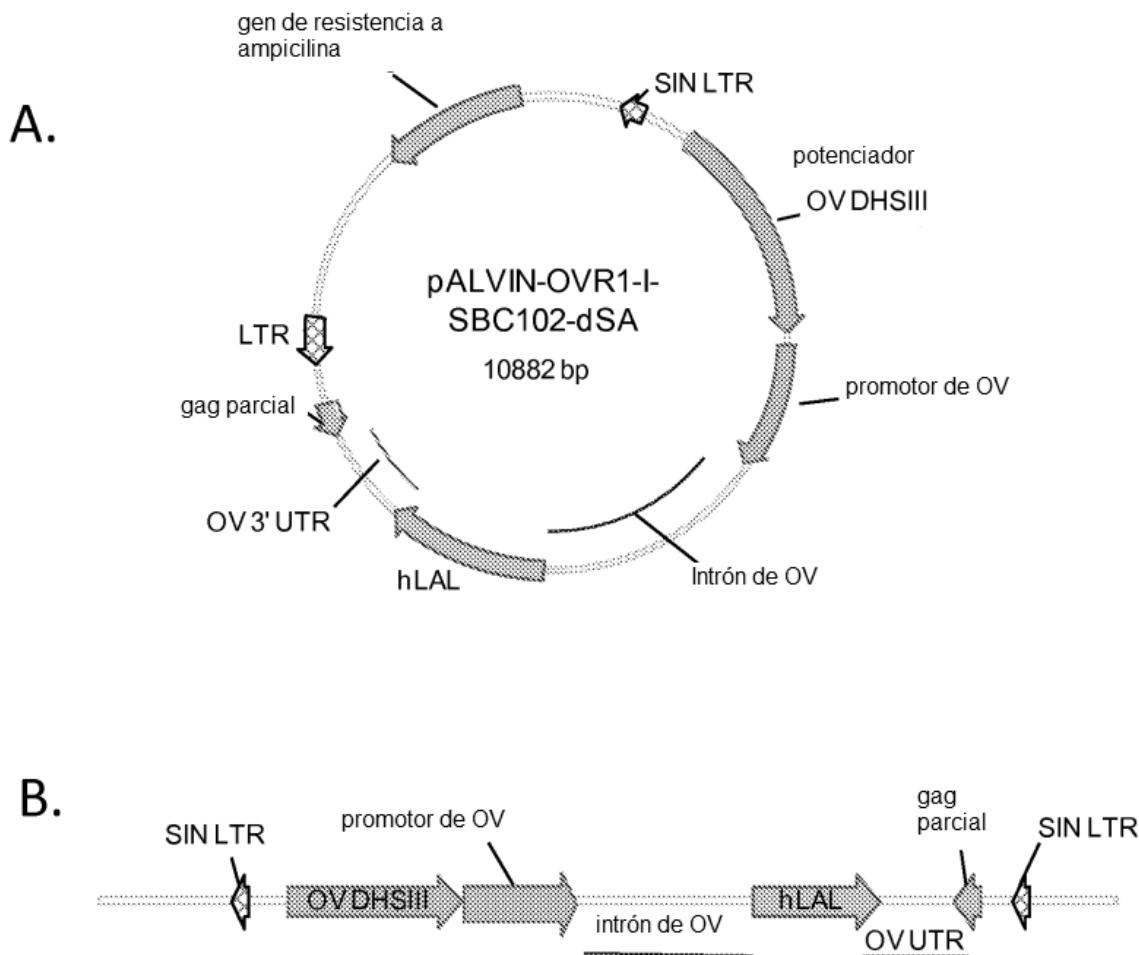
ES 2 950 358 T3

	1	60
rhLAL	MKMRFLGLVVCLVLWTLHSEG <u>SGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFSEEYLVETEDGYI</u>	
Natural	MKMRFLGLVVCLVLWTLHSEG <u>SGGKLTAVDPETNMNVSEIISYWGFSEEYLVETEDGYI</u>	
	61	120
rhLAL	<u>LCLNRIPHGRKNHSKGPKPVVFLOQHGLLADSSNWVTNLANS</u> <u>SLGFI</u> <u>LADAGFDVWMGNS</u>	
Natural	<u>LCLNRIPHGRKNHSKGPKPVVFLOQHGLLADSSNWVTNLANS</u> <u>SLGFI</u> <u>LADAGFDVWMGNS</u>	
	121	180
rhLAL	<u>RGNTWSRKHKTLSVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILKTGQE</u> <u>QVYYVGHSQGTTIG</u>	
Natural	<u>RGNTWSRKHKTLSVSQDEFWAFSYDEMAKYDLPASINFILKTGQE</u> <u>QVYYVGHSQGTTIG</u>	
	181	240
rhLAL	<u>FIAFSQIPELAKRICKMFFALGPVASVAFCTSPMAKLGR</u> <u>LPDHLIKDLFGDKEFLPQSAFL</u>	
Natural	<u>FIAFSQIPELAKRICKMFFALGPVASVAFCTSPMAKLGR</u> <u>LPDHLIKDLFGDKEFLPQSAFL</u>	
	241	300
rhLAL	<u>KWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVY</u> <u>TTHSPAGTSVQNMLHWSQAV</u>	
Natural	<u>KWLGTHVCTHVILKELCGNLCFLLCGFNERNLNMSRVDVY</u> <u>TTHSPAGTSVQNMLHWSQAV</u>	
	301	360
rhLAL	<u>KFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPPTYNVKDM</u> <u>LVP</u> <u>AVWSGGHDWLADVYDVNILLTQI</u>	
Natural	<u>KFQKFQAFDWGSSAKNYFHYNQSYPPTYNVKDM</u> <u>LVP</u> <u>AVWSGGHDWLADVYDVNILLTQI</u>	
	361	399
rhLAL	<u>TNLVFHESIPEWEHLD</u> <u>FIWGLDAPWRLYNKIIINLMRKYQ</u>	(SEQ ID NO:1)
Natural	<u>TNLVFHESIPEWEHLD</u> <u>FIWGLDAPWRLYNKIIINLMRKYQ</u>	(SEQ ID NO:20)

**Figura 1**

1 ATGAAAATGC GGTTCTTGGG GTTGGTGGTC TGTTGGTTC TCTGGACCT  
51 GCATTCCGAG GGGTCCGGAG GGAAACTGAC AGCTGTGGAT CCTGAAACAA  
101 ACATGAATGT CAGTGAAATT ATCTCTTA CTGGGATTCCC TAGTGAGGAA  
151 TACCTAGTTG AGACAGAAGA TGGATATATT CTGTGCCCTA ACCGAATTCC  
201 TCATGGGAGG AAGAACCAATT CTGACAAAGG TCCCAAACCA GTTGTCTTCC  
251 TGCAACATGG CTTGCTGGCA GATTCTAGTA ACTGGGTACAC AAACCTTGCC  
301 AACAGCAGCC TGGGCTTCAT TCTTGCTGAT GCTGGTTTG ACGTGTGGAT  
351 GGGCAACAGC AGAGGAAATA CCTGGTCTCG GAAACATAAG ACACCTCTCAG  
401 TTTCTCAGGA TGAATTCTGG GCTTCAGTT ATGATGAGAT GGCAAAATAT  
451 GACCTACCAG CTTCCATTAA CTTCATCTG AATAAGACTG GCCAAGAACAA  
501 AGTGTATTAT GTGGGTCATT CTCAAGGCAC CACTATAGGT TTTATAGCAT  
551 TTTCACAGAT CCCTGAGCTG GCTAAAAGGA TTAAAATGTT TTTTGCCTG  
601 GGTCCCTGTGG CTTCCGTCGC CTTCTGTACT AGCCCTATGG CCAAACACTGGG  
651 ACGACTGCCA GATCATCTCA TTAAGGACCT CTTTGGAGAC AAAGAATTTC  
701 TTCCCCAGAG TGCCTTTTG AAGTGGCTGG GTACCCACGT TTGCACTCAT  
751 GTCATACTGA AGGAGCTCTG TGGAAATCTC TGTTTCTTC TGTGTGGATT  
801 TAATGAGAGA AATTAAATA TGTCTAGAGT GGATGTGTAT ACAACACATT  
851 CTCCTGCTGG AACTTCTGTG CAAAACATGT TACACTGGAG CCAGGCTGTT  
901 AAATTCCAAA AGTTCAAGC CTTGACTGG GGAAGCAGTG CCAAGAATTA  
951 TTTCATTAC AACCAAGAGTT ATCCTCCCAC ATACAATGTG AAGGACATGC  
1001 TTGTGCCGAC TGCAGTCTGG AGCGGGGGTC ACGACTGGCT TGCAGATGTC  
1051 TACGACGTCA ATATCTTAAT GACTCAGATC ACCAACTTGG TGTTCCATGA  
1101 GAGCATTCCG GAATGGGAGC ATCTTGACTT CATTGGGGC CTGGATGCC  
  
(SEQ ID NO:5)

## Figura 2

**Figura 3**

**Secuencia de pALVIN-OVR1-I-SBC102-dSA (10882 pb)**

<b>Característica</b>	<b>Localización (pb)</b>
SIN LTR	521-693 (cadena complementaria)
Potenciador DHSIII	1069-2720
Promotor de OV	2720-3851
Intron	3899-5487
hLAL CDS	5505-6704
OV 3'UTR	6719-7392
CDS gag parcial	7404-7657 (cadena complementaria)
LTR	7955-8300 (cadena complementaria)
Gen de resistencia a ampicilina	9764-10621 (cadena complementaria)

1 CTTTCCCCGT CAAGCTCTAA ATCGGGGGCT CCCTTTAGGG TTCCGATTAA GTGCTTTACG  
61 GCACCTCGAC CCCAAAAAAC TTGATTAGGG TGATGGTCA CGTAGTGGGC CATGCCCTG  
121 ATAGACGGTT TTTCGCCCTT TGACGTTGGA GTCCACGTC TTTAATAGTG GACTCTGTT  
181 CCAAACCTGGA ACAACACTCA ACCCTATCTC GGTCTATTCT TTTGATTAT AAGGGATTAA  
241 GCCGATTTCG GCCTATTGGT TAAAAAAATGA GCTGATTAA CAAAATTTA ACGCGAATT  
301 TAACAAAATA TTAACGCTTA CAATTCCAT TCGCCATTCA GGCTGCGCAA CTGTTGGGAA  
361 GGGCGATCGG TGCGGGCCTC TTCGCTATTCA CGCCAGCTGG CGAAAGGGGG ATGTGCTGCA  
421 AGGCAGATTAA GTTGGGTAAC GCCAGGGTTT TCCCAGTCAC GACGGTGTAA AACGACGGCC  
481 AGTGAGCGCG TATTCCTAA CGATCACGTC GGGGTCAACCA AATGAAGCCT TCTGCTTCAT  
541 GCATGTGCTC GTAGTCGTCA GGGAAATCAAC GGTCCGGCCA TCAACCCAGG TGCACACCAA  
601 TGTGGTGAAT GGTCAAATGG CGTTTATTGT ATCGAGCTAG GCACCTAAAT ACAATATCTC  
661 TGCAATGCGG AATTCACTGG TTCGTCCTAA CCGTCCCCCT CCCTATGCAA AAGCGAAACT  
721 ACTATATCCT GAGGGGACTC CTAACCGCGT ACAACCGAAG CCCCCCTTTT CGCCTAAACAA  
781 TGCTATTGTC CCCTCAGTCA AGCCTGCCC GTTACAACCC GATTGCAAG CCTTGCCTC  
841 CCCACATTAT CCGTAGCATT ATTTCTAGC AGTCATCAGA GCTACAGAAG ATACTCTATG  
901 CTGTAGCCAA GTCTACAAGT TTACTATTCA GCGACCTCCT ATATTCCGCG TGCCAGCCGA  
961 TCAATTACCA ATCCAACCAG CTATCACACG GAATACAAGA ACTCGCCTAC GCTCTTCTT  
1021 CGGGCTGCTT ATAAGCCTCC TGTAATTTT TTATATTCTT CGCTCGAGTC TCTTCAGAAT  
1081 GGCACAGCAC CGCTGCAGAA AAATGCCAGG TGGACTATGA ACTCACATCC AAAGGAGCTT  
1141 GACCTGATACT CTGATTTCTC TCAAAACAGGG GAAACAACAC AATCCCACAA AACAGCTCAG  
1201 AGAGAAACCA TCACTGATGG CTACAGCACC AAGGTATGCA ATGGCAATCC ATTGACATT  
1261 CATCTGTGAC CTGAGCAAAA TGATTATCT CTCCATGAAT GGTGCTTCT TTCCCTCATG  
1321 AAAAGGCAAT TTCCACACTC ACAATATGCA ACAAAAGACAA ACAGAGAACAA ATTAATGTGC  
1381 TCCTTCCTAA TGTTAAAATT GTAGTGGCAA AGAGGGAGAAC AAAATCTCAA GTTCTGAGTA  
1441 GGTTTTAGTG ATTGGATAAG AGGCTTGAC CTGTGAGCTC ACCTGGACTT CATATCCTT  
1501 TGGATAAAAAA GTGCTTTAT AACTTCAGG TCTCCGAGTC TTTATTCTG AGACTGTTGG  
1561 TTTAGGGACA GACCCACAAT GAAATGCCTG GCATAGGAAA GGGCAGCAGA GCCTTAGCTG  
1621 ACCTTTCTT GGGACAAGCA TTGTCAAACA ATGTGTGACA AAACTATTG TACTGTTTG  
1681 CACAGCTGTG CTGGGCAGGG CAATCCATTG CCACCTATCC CAGGTAACCT TCCAAGTGCA  
1741 AGAAGATTGT TGCTTACTCT CTCTAGACCC CCAAGTCAA CCAACTATGC AGGTATGCTG  
1801 ACAACACTAT GATGACAGGCC TGTTCTGATC AAGATCTCAT TTGTCATGG ACAATTCTTG  
1861 TTGCTTCAG CTGGCTTCC ATTGGGAAAG AGTGTAGTAT ATCCTTCTCA TCTGACAGAA  
1921 AAGCAGAAAT TCTCATGCTC CACACTTAAT CTACATTGTT TAAACCACCC GGCTACTTCT  
1981 TGGAGAGGAA AAATGGCTT TATAAGACTC ACAAAACAAA GCTCTGCAAG TCAAATGCAT  
2041 ACAAAACTGT TCTGTAGGTG TGGAAATCAGG ACACATATGTG GAAGTCAAAT AGAGCAGCTT  
2101 TAAAAAAGCCT TTGGGATCAT TCTCATCTTA TATTTGCAGC ACGATACTAT GACAGTGATA  
2161 ACTGACATAA CTGCATCAAT TTCCCTGATA TTTTATTGTT CTTAAAGTAC AAGACATAGA  
2221 GATGGACGTA AAGATGGACA TATGACTCAG GTCTGGACAG GTCCGTGGTC CATGTATGAT  
2281 AAAAGAGATG AAGGGAAAGA GAATTGAGAC TGTCTAAGAA GGGCTTCAGG GACGTTCTGA  
2341 AGGCAGATTG GACTGAATCA GATGTACTGT CCAAGTCTCA TATGTAGCAA TGGAAAGGCTG  
2401 ATATTGGAGA AATATAAAGA AATGGCTGTG AACTCAAAGT GACCCCTGAAC AGAAAAGGGGA  
2461 TATGGAGTTA AAATAATGTC ACAGAACTGA GGTTTATATG ATATACCATG GGCTGAGAG  
2521 GGTCAAGAGTG CTCCACCATG GGCCTCTCTT GGGCTGCAGG GAACCTCTGT TCTACACCTG  
2581 GAACACCTCC TGCCCTCCTC CGCACTGACC TCAGTGTCAAT CAGGGCTGTT TCTCTCACAT  
2641 TTTCTCACTC ACCTCTCCCA ACTACCATTG TACAGCAGGT GTTCTTACAT ATTGCTCCCTC  
2701 CTGAGGTACA TCTAGCATCG TTAAGTCCTC AGACTTGGCA AGGAGAATGT AGATTTCCAC  
2761 AGTATATATG TTTTCACAAA AGGAAGGAGA GAAACAAAAG AAAATGGCAC TGACTAAACT

# ES 2 950 358 T3

2821	TCAGCTAGTG	GTATAGGAAA	GTAATTCTGC	TTAACAGAGA	TTGCAGTGAT	CTCTATGTAT
2881	GTCCTGAAGA	ATTATGTTGT	ACTTTTTCC	CCCATTTTA	AATCAAACAG	TGCTTACAG
2941	AGGTCAAGAT	GGTTTCTTA	CTGTTGTCA	ATTCTATTAT	TTCAATACAG	AACAATAGCT
3001	TCTATAACTG	AAATATATT	GCTATTGTAT	ATTATGATTG	TCCCTCGAAC	CATGAACACT
3061	CCTCCAGCTG	AATTTCACAA	TTCCCTGTG	ATCTGCCAGG	CCATTAAGTT	ATTCATGGAA
3121	GATCTTGAG	GAACACTGCA	AGTTCATATC	ATAAACACAT	TTGAAATTGA	GTATTGTTT
3181	GCATTGTATG	GAGCTATGTT	TTGCTGTATC	CTCAGAATAA	AAGTTGTTA	TAAAGCATTC
3241	ACACCCATAA	AAAGATAGAT	TTAAATATTC	CAACTATAGG	AAAGAAAGTG	TGTCTGCTCT
3301	TCACTCTAGT	CTCAGTTGGC	TCCTTCACAT	GCACGCTTCT	TTATTTCTCC	TATTTGTC
3361	AGAAAATAAT	AGGTCAAGTC	TTGTTCTCAT	TTATGTCCTG	TCTAGCGTGG	CTCAGATGCA
3421	CATTGTACAT	ACAAGAAGGA	TCAAATGAAA	CAGACTTCTG	GTCTGTTACT	ACAACCATAG
3481	TAATAAGCAC	ACTAACTAAT	AATTGCTAAT	TATGTTTCC	ATCTCCAAGG	TTCCCACATT
3541	TTCTGTTTT	CTTAAAGATC	CCATTATCTG	GTGTAACTG	AAGCTCAATG	GAACATGAGC
3601	AATATTTCCC	AGTCTTCTCT	CCCATCCAAC	AGTCCTGTATG	GATTAGCAGA	ACAGGCAGAA
3661	AACACATGTT	TACCCAGAAT	TAAGAAACTAA	TATTTGCTCT	CCATTCAATC	CAAAATGGAC
3721	CTATTGAAAC	AAAATCTAA	CCCAATCCA	TTAAATGATT	TCTATGGTGT	CAAAGGTCAA
3781	ACTTCTGAAG	GGAACCTGTG	GGTGGGTAC	AATTCTGACT	ATATATTCCC	CAGGGCTCAG
3841	CCAGTGTCTG	TACATACAGC	TAGAAAGCTG	TATTGCTTT	AGCAGTCAAG	CTCGAAAGGT
3901	AAGCAACTCT	CTGGAATTAC	CTTCTCTCTA	TATTAGCTCT	TACTTGCA	TAAACTTTAA
3961	AAAATTAAACA	ATTATTGTGC	TATGTTGTGT	ATCTTAAGG	GTGAAGTACC	TGCGTGATAC
4021	CCCCTATAAA	AACTTCTCAC	CTGTTGATGC	ATCTGCACT	ATTTTATTAT	GTGTAAAAGC
4081	TTTGTGTTG	TTTCAGGAG	GCTTATTCTT	TGTGCTTAAA	ATATGTTTT	ATTTTCAGAA
4141	CATCTTATCC	TGTCGTTCAC	TATCTGATAT	GCTTGCAGT	TTGCTTGATT	AACTTCTAGC
4201	CCTACAGAGT	GCACAGAGAG	CAAATCATG	GTGTTCACTG	AATTCTGGGG	AGTTATTTA
4261	ATGTGAAAAT	TCTCTAGAAG	TTTAATTCTC	GCAAAGTGCA	GCTGCTGATC	ACTACACAAG
4321	ATAAAAATGT	GGGGGGTGCA	TAAACGTATA	TTCTTACAAT	AATAGATACA	TGTGAACCTA
4381	TATACAGAAA	AGAAAATGAG	AAAAATGTGT	GTGTGTATAC	TCACACACGT	GGTCAGTAAA
4441	AACTTTGAG	GGGTTAATA	CAGAAAATCC	AATCCTGAGG	CCCCAGCACT	CAGTACGCAT
4501	ATAAAGGCT	GGGCTCTGAA	GGACTTCTGA	CTTTCACAGA	TTATATAAAT	CTCAGGAAAG
4561	CAACTAGATT	CATGCTGGCT	CCAAAAGCTG	TGCTTATAT	AAGCACACTG	GCTATACAAT
4621	AGTTGTACAG	TTCACTCTT	TATAATAGAA	ACAGACAGAA	CAAGTATAAA	TCTTCTATTG
4681	GTCTATGTCA	TGAACAAGAA	TTCATTCTAGT	GGCTCTGTT	TATAGTAAAC	ATTGCTATT
4741	TATCATGTCT	GCATTTCTCT	TCTGTCGAA	TGTCACCACT	AAAATTAAAC	TCCACAGAAA
4801	GTTTATACTA	CAGTACACAT	GCATATCTT	GAGCAAAGCA	AACCACACCT	GAAAGTGCAA
4861	TAGAGCAGAA	TATGAATTAC	ATGCGTGTCT	TTCTCCTAGA	CTACATGACC	CCATATAAAAT
4921	TACATTCCCT	ATCTATTCTG	CCATCACCAA	AACAAAGGTA	AAAATACTTT	TGAAGATCTA
4981	CTCATAGCAA	GTAGTGTGCA	ACAAACAGAT	ATTCTCTAC	ATTTATTTTT	AGGGAAATAAA
5041	AATAAGAAAAT	AAAATAGTCA	GCAAGCCTCT	GCTTCTCAT	ATATCTGTCC	AAACCTAAAG
5101	TTTACTGAAA	TTTGCTCTT	GAATTCCAG	TTTGCAAGC	CTATCAGATT	GTGTTTAAT
5161	CAGAGGTACT	AAAAAGTATC	AATGAATTCT	AGCTTCACT	GAACAAAAAT	ATGTAGAGGC
5221	AACTGGCTTC	TGGGACAGTT	TGCTACCAA	AAGACAACG	AATGCAAATA	CATAAAATAGA
5281	TTTATGAATA	TGGTTTGAA	CATGCACATG	AGAGGTGGAT	ATAGCAACAG	ACACATTACC
5341	ACAGAATTAC	TTTAAACTA	CTTGTAAACA	TTAATTGCC	AAAAAACTGC	TCGTAATT
5401	CTGTTGTAGC	CTACCATAGA	GTACCCGTCA	TGGTACTATG	TACAGCATTC	CATCCTTACA
5461	TTTCACGTG	TCTGCTGTTT	GCTCTAGACA	ACTCAGAGTT	CACCATGAAA	ATGCGGTTCT
5521	TGGGGTTGGT	GGTCTGTTG	GTTCTCTGGA	CCCTGCATTC	CGAGGGGTCC	GGAGGGAAAC
5581	TGACAGCTGT	GGATCCAGAA	ACAAACATGA	ATGTCAGTGA	AATTATCTCT	TACTGGGGAT
5641	TCCCTAGTGA	GGAAATACCTA	GTTGAGACAG	AAGATGGATA	TATTCTGTGC	CTTAACCGAA
5701	TCCTCATGG	GAGGAAGAAC	CATTCTGACA	AAGGTCCCAA	ACCAGTTGTC	TTCCTGCAAC
5761	ATGGCTTGCT	GGCAGATTCT	AGTAACCTGG	TCACAAACCT	TGCCAACAGC	AGCCTGGGCT
5821	TCATTCTGTC	TGATGCTGGT	TTTGACGTGT	GGATGGGCAA	CAGCAGAGGA	AATACCTGGT
5881	CTCGGAAACA	TAAGACACTC	TCAGTTCTC	AGGATGAAAT	CTGGGCTTTC	AGTTATGATG
5941	AGATGGCAAAT	ATATGACCTA	CCAGCTTCCA	TTAACCTCAT	TCTGAATAAG	ACTGGCCAAG
6001	AACAAGTGT	TTATGTTGGT	CATTCTCAAG	GCACCACTAT	AGGTTTTATA	GCATTTTCAC
6061	AGATCCCTGA	GCTGGCTAAA	AGGATTTAAA	TGTTTTTGC	CCTGGGCTCCT	GTGGCTTCCG
6121	TCGCCTCTG	TACTAGCCCT	ATGGCCAAAC	TGGGACGACT	GCCAGATCAT	CTCATTAAGG
6181	ACCTCTTGG	AGACAAAGAA	TTTCTTCCC	AGAGTGCCTT	TTTGAAGTGG	CTGGGTACCC
6241	ACGTTTGAC	TCATGTCATA	CTGAAGGAGC	TCTGTGGAAA	TCTCTGTTTT	CTTCTGTGTG
6301	GATTTAATGA	GAGAAATTAA	AATATGTC	GAGTGGATGT	GTATACAACA	CATTCTCCTG
6361	CTGGAACTTC	TGTGCAAAC	ATGTTACACT	GGAGCCAGGC	TGTTAAATTC	CAAAAGTTTC
6421	AAGCCTTTGA	CTGGGGAAAGC	AGTGCCAAGA	ATTATTTCA	TTACAACCAG	AGTTATCCTC

# ES 2 950 358 T3

6481	CCACATACAA	TGTGAAGGAC	ATGCTTGTGC	CGACTGCAGT	CTGGAGCGGG	GGTCACGACT
6541	GGCTTGCAGA	TGTCTACGAC	GTCAATATCT	TACTGACTCA	GATCACCAAC	TTGGTGTTC
6601	ATGAGAGCAT	TCCGGAATGG	GAGCATCTTG	ACTTCATTG	GGGCCCTGGAT	GCCCCTTGG
6661	GGCTTATAA	TAAGATTATT	AATCTAATGA	GGAAATATCA	GTGATTCGAA	GC GGCCGCAA
6721	GAAGAAAGCT	GAAAAACTCT	GTCCCTCCA	ACAAGACCCA	GAGCACTGTA	GTATCAGGGG
6781	TAAAATGAAA	AGTATGTTAT	CTGCTGCATC	CAGACTTCAT	AAAAGCTGGA	GCTTAATCTA
6841	GAAAAAAAAT	CAGAAAGAAA	TTACACTGTG	AGAACAGGTG	CAATTCACTT	TTCCCTTACA
6901	CAGAGTAATA	CTGGTAACTC	ATGGATGAAG	GCTTAAGGGA	ATGAAATTGG	ACTCACAGTA
6961	CTGAGTCATC	ACACTGAAAA	ATGCAACCTG	ATACATCAGC	AGAAGGTTA	TGGGGGAAAA
7021	ATGCAGCCTT	CCAATTAAGC	CAGATATCTG	TATGACCAAG	CTGCTCCAGA	ATTAGTCACT
7081	CAAAATCTCT	CAGATTAAT	TATCAACTGT	CACCAACCAT	TCCTATGCTG	ACAAGGCAAT
7141	TGCTTGTCT	CTGTGTTCC	GATACTACAA	GGCTCTTCCT	GACTTCCTAA	AGATGCATTA
7201	TAaaaATCTT	ATAATTCA	TTTCTCCCTA	AACTTGACT	CAATCATGGT	ATGTTGGCAA
7261	ATATGGTATA	TTACTATTCA	AATTGTTTC	CTTGTACCC	TATGTAATGG	GTCTTGTGAA
7321	TGTGCTCTT	TGTTCCCTTA	ATCATAATAA	AAACATGTTT	AAGCAACAC	TTTTCACTTG
7381	TAGTATTGAA	AGGTACCGGA	TCTCGAGCCG	CCTTCAATGC	CCCCAAAACC	AATCCCCAGG
7441	TTTTAACTC	TCCCGATTTT	CCAAGTACCA	TAGCCCGCTG	AGAGAGCGCC	GC GGTAATGG
7501	GATCCCAGGA	CCCCGGGGAA	TATAAGCTG	AGGGGGACGT	AAGCAACCC	TCCTTTGTA
7561	ACAGGGACAA	CATAGCCCCT	ATTTCCCTCT	TAGAAGGAGA	GGTTTCCCG	CAATAGGTCT
7621	TACACGCGGA	CGAAATCACC	TTTATGACGG	CTTCCATGCT	TGATCCACCG	GGCGACCGGA
7681	ATCACGCAGA	GCAACCGGAA	TCACGCCTGG	GGTGGACCGC	TCAGTCGTG	GGCTTCCTTC
7741	CCGTCTTCCA	ACGACTCTCT	GAGTTCTCGG	TAGGGTATGT	TGGCCCCCTG	CAGTAGGGCT
7801	CCCTCCGACG	CCACTCAGCT	TCTGCCCTCC	TAAGCCGCAG	CCCCCTCTAC	TAGGGTCATC
7861	GTCCGCTCCC	CGAATAAGCG	AGACGGATGA	GGACAGGATC	GCCACGCCGC	CTGTGGCCGA
7921	CCACTATTCC	CTAACGATCA	CGTCGGGGTC	ACCAAATGAA	GCCTTCTGCT	TCATGCATGT
7981	GCTCGTAGTC	GTCAGGGAAAT	CAACGGTCCG	GCCATCAACC	CAGGTGCACA	CCAATGTGGT
8041	GAATGGTCAA	ATGGCGTTA	TTGTATCGAG	CTAGGCACTT	AAATACAATA	TCTCTGCAAT
8101	GCGGAATTCA	GTGGTTCGTC	CAATCCGTGT	TAGACCCGTC	TGTTGCCCTC	CTAACAAAGGC
8161	ACGATCATAC	CACGATCATA	CCACCTTA	CCCCACCAATC	GGCATGCACG	GTGCTTTTC
8221	TCTCCTTATA	AGGCATGTTG	CTAACTCATC	GTACATAAG	CATGTTGCAA	GA C T A C A A G A
8281	GTATTGCATA	AGACTACATT	TCCCCCTCCC	TATGCAAAG	CGAAACTACT	ATATCCTGAG
8341	GGGACTCTA	ACCGCGTACA	ACCGAAGCCC	CGCTTTTCGC	CTAAACATGC	TATTGTCCCC
8401	TCAGTCAGC	CTTGGCCGTT	ACAACCCGAT	TCGCAAGCCT	TGCCCTCCCC	ACATTATCCG
8461	TAGCATTATT	TCCTAGCAGT	CATCAGAGCT	ACAGAAGATA	CTCTATGCTG	TAGCCAAGTC
8521	TACAAGTTTA	CTATTCA	ACCTCCTATA	TTCCGCGTGC	CAGCCGATCA	ATTACCAATG
8581	CGCGCTTGGC	GTAATCATGG	TCATAGCTGT	TTCTGTGTG	AAATTGTTAT	CCGCTCACAA
8641	TTCCACACAA	CATA CGAGCC	GGAAGCATAA	AGTGTAAAGC	CTGGGGTGCC	TAATGAGTGA
8701	GCTAACTCAC	ATTAATTGCG	TTGCGCTCAC	TGCCCCTTT	CCAGTCGGGA	AACCTGTCGT
8761	GCCAGCTGCA	TTAATGAATC	GGCCAACCGC	CGGGGAGAGG	CGGTTGCGT	ATTGGGCCT
8821	CTTCCGCTTC	CTCGCTACT	GA C T G C T G C	GCTCGGTCGT	TCGGCTGC	CGAGCGGTAT
8881	CAGCTCACTC	AAAGGCGGT	ATACGGTTAT	CCACAGAAC	AGGGGATAAC	GCAGGAAAGA
8941	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	CAAAAGGCCA	GGAACCGTAA	AAAGGCCGCG	TTGCTGGCGT
9001	TTTTCCATAG	GCTCCGCC	CCTGACGAGC	ATCACAAAAA	TCGACGCTCA	AGTCAGAGGT
9061	GGC GAAACCC	GACAGGACTA	TAAAGATACC	AGGC GTTTCC	CCCTGGAAGC	TCCCTCGTGC
9121	GCTCTCTGT	TCCGACCC	CCGCTTACCG	GATACCTGTC	CGCCTTCTC	CCTTCGGGAA
9181	CGCTGGCGCT	TTCTCATAGC	TCACGCTGTA	GGTATCTCAG	TTCGGTGTAG	GTCGTTCGCT
9241	CCAAGCTGGG	CTGTGTGAC	GAACCCCCCG	TTCAGCCCGA	CCGCTCGGCC	TTATCCGGTA
9301	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	CCGGTAAGAC	ACGACTTATC	GCCACTGGCA	GCAGCCACTG
9361	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	AGGTATGTAG	GGCGGTGCTAC	AGAGTTCTG	AAAGTGGTGGC
9421	CTAACTACCG	CTACACTAGA	AGGACAGTAT	TTGGTATCTG	CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA
9481	CCTTCGGAAA	AAGAGTTGGT	AGCTCTGAT	CCGGCAAAC	AACCACCGCT	GGTAGCGGTG
9541	GT TTTTTTGT	TTGCAAGCAG	CAGATTACGC	GCAGAAAAAA	AGGATCTCAA	GAAGATCCTT
9601	TGATCTTTC	TACGGGGTCT	GACGCTCAGT	GGAAACAAAA	CTCACGTTAA	GGGATTTGG
9661	TCATGAGATT	ATCAAAAAGG	ATCTTCACCT	AGATCCTTT	AAATTTAAAAA	TGAAGTTTTA
9721	AATCAATCTA	AAGTATATAT	GAGTAAACTT	GGTCTGACAG	TTACCAATGC	TTAATCAGTG
9781	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	TGTCTATTTC	GTCATCCAT	AGTTGCCTGA	CTCCCGTCTG
9841	TGTAGATAAC	TACGATACGG	GAGGGCTTAC	CATCTGGCC	CAGTGC	ATGATACCGC
9901	GAGACCCACG	CTCACCGGCT	CCAGATTAT	CAGCAATAAA	CCAGCCAGCC	GGAAGGGCCG
9961	AGCGCAGAAG	TGGCTCTGCA	ACTTTATCCG	CCTCCATCCA	GTCTATTAA	TGTTGCCGGG
10021	AAGCTAGAGT	AAGTAGTTCG	CCAGTTATAA	GT TTGCGCAA	CGTTGTTGCC	ATTGCTACAG
10081	GCATCGTGGT	GTCACGCTCG	TCGTTGGTA	TGGCTTCATT	CAGCTCCGGT	TCCCAACGAT

### ES 2 950 358 T3

10141 CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC TTGGTCCCTC  
10201 CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC  
10261 ATAATTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA  
10321 CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCCGC GACCGAGTTG CTCTGCCCG GCGTCAATAC  
10381 GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACCT TAAAAGTGCT CATCATTGGA AAACGTTCTT  
10441 CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC  
10501 GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA  
10561 CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA  
10621 TACTCTTCCT TTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT  
10681 ACATATTGGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCCGAA  
10741 AAGTGCCACC TGACGCGCCC TGTAGCGGCG CATTAAAGCGC GGCGGGTGTG GTGGTTACGC  
10801 GCAGCGTGAC CGCTACACTT GCCAGCGCCC TAGCGCCCGC TCCTTCGCT TTCTTCCCTT  
10861 CCTTTCTCGC CACGTTCGCC GG  
**(SEQ ID NO: 6)**

**Figura 4**

**Secuencia de ADN de la región proviral (7780 pb)**

<b>Características</b>	<b>Localización (pb)</b>
SIN LTR	1-173 (cadena complementaria)
Potenciador DHSIII	549-2200
Promotor de OV	2200-3331
Intron	3379-4967
hLAL CDS	4985-6184
OV 3'UTR	6199-6872
CDS gag parcial	6884-7137 (cadena complementaria)
LTR	7435-7780 (cadena complementaria)

1 AATGAAGCCT TCTGCTTCAT GCATGTGCTC GTAGTCGTCA GGGATCAAC GGTCCGGCCA  
 61 TCAACCCAGG TGCACACCAA TGTGGTGAAT GGTCAAATGG CGTTTATTGT ATCGAGCTAG  
 121 GCACTTAAAT ACAATATCTC TGCAATGCGG AATTCACTGG TTCGTCCTA CCGTCCCCCT  
 181 CCCTATGCAA AAGCGAAACT ACTATATCCT GAGGGGACTC CTAACCGCGT ACAACCGAAG  
 241 CCCCGTTTT CGCCTAAACA TGCTATTGTC CCCTCAGTCA AGCCTTGCCC GTTACAACCC  
 301 GATTGCAAG CCTTGCCCTC CCCACATTAT CCGTAGCATT ATTTCTCTAGC AGTCATCAGA  
 361 GCTACAGAAG ATACTCTATG CTGTAGCCAA GTCTACAAGT TTACTATTCA GCGACCTCCT  
 421 ATATTCCGCG TGCCAGGCCA TCAATTACCA ATCCAACCAG CTATCACACG GAATACAAGA  
 481 ACTCGCCTAC GCTCTCTTT CGGGCTGCTT ATAAGCCTCC TGTAACTTTT TTATATTCT  
 541 CGCTCGAGTC TCTTCAGAAT GGCACAGCAC CGCTGCAGAA AAATGCCAGG TGGACTATGA  
 601 ACTCACATCC AAAGGAGCTT GACCTGATAC CTGATTTCT TCAAACAGGG GAAACAAACAC  
 661 AATCCCACAA AACAGCTCAG AGAGAAAACCA TCACTGATGG CTACAGCACC AAGGTATGCA  
 721 ATGGCAATCC ATTGACATT CATCTGTGAC CTGAGCAAAA TGATTTATCT CTCCATGAAT  
 781 GGTTGCTTCT TTCCCTCATG AAAAGGCAAT TTCCACACTC ACAATATGCA ACAAAAGACAA  
 841 ACAGAGAACAA ATTAATGTGC TCCTTCTCAA TGTAAAATT GTAGTGGCAA AGAGGAGAAC  
 901 AAAATCTCAA GTTCTGAGTA GGTTTTAGTG ATTGGATAAG AGGCTTGAC CTGTGAGCTC  
 961 ACCTGGACTT CATATCCTT TGGATAAAAA GTGCTTTTAT AACTTCAGG TCTCCGAGTC  
 1021 TTTATTCTG AGACTGTTGG TTTAGGGACA GACCCACAAT GAAATGCCCTG GCATAGGAAA  
 1081 GGGCAGCAGA GCCTTAGCTG ACCTTTCTT GGGACAAGCA TTGTCAAACA ATGTGTGACA  
 1141 AAACTATTTG TACTGCTTTG CACAGCTGTG CTGGCAGGG CAATCCATTG CCACCTATCC  
 1201 CAGGTAACCT TCCAACGTGCA AGAAGATTGT TGCTTACTCT CTCTAGACCC CCAAGTCAAA  
 1261 CCAACTATGC AGGTATGCTG ACAACACTAT GATGACAGCC TGTTCTGATC AAGATCTCAT  
 1321 TTGTTCATGG ACAATTGGT TTGCTTGCAG CTGGTCTTCC ATTGGAAAG AGTGTAGTAT  
 1381 ATCCTCTCA TCTGACAGAAA AAGCAGAAAAT TCTCATGCTC CACACTTAAT CTACATTGTT  
 1441 TTAAACCAAC GGCTACTTCT TGGAGAGGAA AAATGGCTT TATAAGACTC ACAAAACAAA  
 1501 GCTCTGCAAG TCAAATGCAT ACAAAACTGT TCTGTAGGTC TGGAAATCAGG ACACATATGTG  
 1561 GAAGTCAAAT AGAGCAGCTT TAAAAAGCCT TTGGGATCAT TCTCATCTTA TATTTGCAGC  
 1621 ACGATACTAT GACAGTGATA ACTGACATAA CTGCATCAAT TTCCCTGATA TTTTATTGTT  
 1681 CTTAAAGTAC AAGACATAGA GATGGACGTA AAGATGGACA TATGACTCAG GTCTGGACAG  
 1741 GTCCGTTGGTC CATGTATGAT AAAAGAGATG AAGGGAAAGGA GAATTGAGAC TGTCTAAGAA  
 1801 GGGCTTCAGG GACGTTCTGA AGGCAGATTT GACTGAATCA GATGTACTGT CCAAGTCTCA  
 1861 TATGTAGCAA TGGAAAGGCTG ATATTGGAGA ATATATAAGA AATGGCTGTG AACTCAAAGT  
 1921 GACCCCTGAAC AGAAAAGGGA TATGGAGTTA AAATAATGTC ACAGAACTGA GGTTTATATG  
 1981 ATATACCATG GGCTGCAGAG GGTCAGAGTG CTCCACCATG GGCCTCTCTT GGGCTGCAGG  
 2041 GAACTTCTGT TCTACACCTG GAACACCTCC TGCCCTCCTC CGCACTGACC TCAGTGTCT  
 2101 CAGGGCTGTT TCTCTCACAT TTTCTCACTC ACCTCTCCCA ACTACCATTG TACAGCAGTT  
 2161 GTTCTTACAT ATTGCTCCTC CTGAGGTACA TCTAGCATCG TTAAGTCCTC AGACTTGGCA  
 2221 AGGAGAAATGT AGATTTCCAC AGTATATATG TTTTCACAAA AGGAAGGAGA GAAACAAAAG  
 2281 AAAATGGCAC TGACTAAACT TCAGCTAGTG GTATAGGAAA GTAATTCTGC TTAACAGAGA  
 2341 TTGCACTGAT CTCTATGTAT GTCCTGAAGA ATTATGTTGT ACTTTTTCC CCCATTCTTA  
 2401 AATCAAACAG TGCTTTACAG AGGTCAAGAAT GGTTTCTTCA CTGTTTGTCA ATTCTATTAT  
 2461 TTCAATACAG ACAATAGCT TCTATAACTG AAATATATT GCTATTGTAT ATTATGATTG  
 2521 TCCCTCGAAC CATGAACACT CCTCCAGCTG AATTCACAA TTCCTCTGTC ATCTGCCAGG  
 2581 CCATTAAGTT ATTGATGGAA GATCTTGAG GAACACTGCA AGTCATATC ATAAACACAT  
 2641 TTGAAATTGTA GTATTGTTT GCATTGATG GAGCTATGTT TTGCTGTATC CTCAGAATAA  
 2701 AAGTTGTTA TAAAGCATTC ACACCCATAA AAAGATAGAT TTAAATATTC CAACTATAGG  
 2761 AAAGAAAGTG TGTCTGCTCT TCACTCTAGT CTCAGTTGGC TCCTTCACAT GCACGCTCT  
 2821 TTATTTCTCC TATTTGTCA AGAAAATAAT AGGTCAAGTC TTGTTCTCAT TTATGTCCTG

# ES 2 950 358 T3

2881	TCTAGCGTGG	CTCAGATGCA	CATTGTACAT	ACAAGAAGGA	TCAAATGAAA	CAGACTTCTG
2941	GTCTGTTACT	ACAACCATAG	TAATAAGCAC	ACTAACTAAT	AATTGCTAAT	TATGTTTCC
3001	ATCTCCAAGG	TTCCCACATT	TTTCTGTTT	CTTAAAGATC	CCATTATCTG	GTTGTAACTG
3061	AAGCTCAATG	GAACATGAGC	AATATTCCC	AGTCTTCTCT	CCCATCCAAC	AGTCCTGATG
3121	GATTAGCAGA	ACAGGCAGAA	AACACATTGT	TACCCAGAAT	AAAAAACTAA	TATTTGCTCT
3181	CCATTCAATC	CAAAATGGAC	CTATTGAAAC	AAAATCTAA	CCCAATCCCA	TTAAATGATT
3241	TCTATGGTGT	CAAAGGTCAA	ACTTCTGAAG	GGAACCTGTG	GGTGGGTAC	AATTCAAGACT
3301	ATATATTCCC	CAGGGCTCAG	CCAGTGTCTG	TACATACAGC	TAGAAAGCTG	TATTGCCTT
3361	AGCAGTCAAG	CTCGAAAGGT	AAGCAACTCT	CTGGAATTAC	CTTCTCTCTA	TATTAGCTCT
3421	TAATTGCACC	TAACATTAA	AAAATTAACA	ATTATTGTGC	TATGTGTTGT	ATCTTTAAGG
3481	GTGAAGTACC	TGCGTGATAC	CCCCTATAAA	AACTTCTCAC	CTGTGTATGC	ATTCTGCACT
3541	ATTTTATTAT	GTGTAAAAGC	TTTGTGTTG	TTTCAGGAG	GCTTATTCTT	TGTGCTTAAA
3601	ATATGTTTT	AATTCAGAA	CATCTTATCC	TGTCGTTCAC	TATCTGATAT	GCTTGCAGT
3661	TTGCTGATT	AACTTCTAGC	CCTACAGAGT	GCACAGAGAG	AAAATCATG	GTGTTCACTG
3721	AATTCTGGGG	AGTTATTAA	ATGTGAAAAT	TCTCTAGAAC	TTTAATTCTC	GCAAAGTGCA
3781	GCTGCTGATC	ACTACACAAG	ATAAAAATGT	GGGGGGTGC	TAAACGTATA	TTCTTACAAT
3841	AATAGATACA	TGTGAACCTA	TATACAGAAA	AGAAAATGAG	AAAATGTGT	GTGTGTATAC
3901	TCACACACGT	GGTCAGTAAA	AACTTTGAG	GGGTTAATA	CAGAAAATCC	ATCCTGAGG
3961	CCCCAGCACT	CACTACGCAT	ATAAAGGGCT	GGGCTCTGAA	GGACTCTGA	CTTCACAGA
4021	TTATATAAAT	CTCAGGAAAG	CAACTAGATT	CATGCTGGCT	CCAAAAGCTG	TGCTTATAT
4081	AAGCACACTG	GCTATACAAT	AGTTGTACAG	TTCAGCTCTT	TATAATAGAA	ACAGACAGAA
4141	CAAGTATAAA	TCTTCTATTG	GTCTATGTCA	TGAACAAAGAA	TTCATTCAGT	GGCTCTGTTT
4201	TATAGTAAAC	ATTGCTATT	TATCATGTCT	GCATTTCTCT	TCTGCTGAA	TGTCACCACT
4261	AAAATTAAAC	TCCACAGAAA	TTTATACTA	CACTACACAT	GCATATCTTT	GAGCAAAGCA
4321	AACCATACCT	GAAAGTGC	TAGAGCAGAA	TATGAATTAC	ATGCGTGTCT	TTCTCCTAGA
4381	CTACATGACC	CCATATAAAT	TACATTCTT	ATCTATTCTG	CCATCACCAA	AACAAAGGTA
4441	AAAATACTTT	TGAAGATCTA	CTCATAGCAA	GTAGTGTGCA	ACAAACAGAT	ATTTCTCTAC
4501	ATTTTATT	AGGGAATAAA	AATAAGAAAT	AAAATAGTC	GCAAGCCTCT	GCTTCTCAT
4561	ATATCTGTCC	AAACCTAAAG	TTTACTGAA	TTGCTCTTT	GAATTCCAG	TTTGCAAGC
4621	CTATCAGATT	GTGTTTTAAT	CAGAGGTACT	GGAAAGTATC	AATGAATTCT	AGCTTCACT
4681	GAACAAAAAT	ATGTAGAGGC	AACTGGCTTC	TGGGACAGTT	TGCTACCCAA	AAGACAACGT
4741	AATGCAAATA	CATAAATAGA	TTTATGAATA	TGGTTTTGAA	CATGCACATG	AGAGGTGGAT
4801	ATAGCAACAG	ACACATTACC	ACAGAATTAC	TTTAAACTA	TTGTTAACAA	TTAATTGCC
4861	AAAAAACTGC	TCGTAATTAA	CTGTTGTAGC	CTACCATAGA	GTACCCCTGCA	TGGTACTATG
4921	TACAGCATT	CATCCTTACA	TTTCACTGT	TCTGCTGTTT	GCTCTAGACA	ACTCAGAGTT
4981	CACCATGAAA	ATGCGGTTCT	TGGGGTTGGT	GGTCTGTTG	GTTCTCTGGA	CCCTGCATTC
5041	CGAGGGGTCC	GGAGGGAAAC	TGACAGCTGT	GGATCCAGAA	ACAAACATGA	ATGTCAGTGA
5101	AATTATCTCT	TACTGGGAT	TCCCTAGTGA	GGAAATACCTA	GTTGAGACAG	AAGATGGATA
5161	TATTCTGTG	CTTAACCGAA	TTCCCTCATGG	GAGGAAGAAC	CATTCTGACA	AAGGTCCCAA
5221	ACCAGTTGTC	TTCCTGCAAC	ATGGCTGCT	GGCAGATTCT	AGTAACCTGGG	TCACAAACCT
5281	TGCCAACAGC	AGCCTGGGCT	TCATTCTTG	TGATGCTGGT	TTTGACGTGT	GGATGGCAA
5341	CAGCAGAGGA	AATACCTGGT	CTCGGAAACA	TAAGACACTC	TCAGTTCTC	AGGATGAATT
5401	CTGGGCTTTC	AGTTATGATG	AGATGGCAA	ATATGACCTA	CCAGCTTCCA	TTAACTTCAT
5461	TCTGAATAAG	ACTGGCCAAG	AAACAGTGT	TTATGTGGGT	CATTCTCAAG	GCACCACTAT
5521	AGGTTTTATA	GCATTTTCAC	AGATCCCTGA	GCTGGCTAAA	AGGATAAAAA	TGTTTTTGC
5581	CCTGGGTCT	GTGGCTTCCG	TCGCCTCTG	TACTAGCCCT	ATGGCCAAAC	TGGGACGACT
5641	GCCAGATCAT	CTCATTAAGG	ACCTCTTGG	AGACAAAGAA	TTTCTCCCC	AGAGTGCCTT
5701	TTTGAAGTGG	CTGGGTACCC	ACGTTGTCAC	TCATGTCATA	CTGAAGGAGC	TCTGTGGAAA
5761	TCTCTGTTT	CTTCTGTGTG	GATTTATGA	GAGAAATTAA	AATATGTCTA	GAAGTGGATGT
5821	GTATACAACA	CATTCTCCTG	CTGGAACCTTC	TGTGCAAAAC	ATGTTACACT	GGAGGCCAGGC
5881	TGTTAAATT	CAAAAGTTTC	AAGCCTTGA	CTGGGGAAAGC	AGTGCCAAGA	ATTATTTCA
5941	TTACAACCAG	AGTTATCCTC	CCACATACAA	TGTGAAGGAC	ATGCTGTGC	CGACTGCACT
6001	CTGGAGCGGG	GGTCACGACT	GGCTTGCAGA	TGTCTACGAC	GTCAATATCT	TACTGACTCA
6061	GATCACCAAC	TTGGTGTTC	ATGAGAGCAT	TCCGGAATGG	GAGCATCTTG	ACTTCATTG
6121	GGGCCTGGAT	GGCCCTTGG	GGCTTATAA	TAAGATTATT	AATCTAATGA	GGAAATATCA
6181	GTGATTGCAA	GGGGCCGCAA	GAAGAAAGCT	AAAAAACTCT	GTCCCTTCCA	ACAAGACCCA
6241	GAGCACTGTA	GTATCAGGGG	TAAAATGAAA	AGTATGTTAT	CTGCTGCATC	CAGACTTCAT
6301	AAAAGCTGGA	GCTTAATCTA	AAAAAAAAAT	CAGAAAGAAA	TTACACTGTG	AGAACAGGTG
6361	CAATTCACTT	TTCCCTTACA	CAGAGTAATA	CTGGTAACTC	ATGGATGAAG	GCTTAAGGGGA
6421	ATGAAATTGG	ACTCACAGTA	CTGAGTCATC	ACACTGAAAAA	ATGCAACCTG	ATACATCAGC
6481	AGAAGGTTA	TGGGGAAAAA	ATGCAGCCTT	CCAATTAAGC	CAGATATCTG	TATGACCAAG

## ES 2 950 358 T3

6541	CTGCTCCAGA	ATTAGTCACT	CAAAATCTCT	CAGATTAAAT	TATCAACTGT	CACCAACCAT
6601	TCCTATGCTG	ACAAGGCATA	TGCTTGTCT	CTGTGTTCT	GATACTACAA	GGCTCTTCCT
6661	GACTTCCTAA	AGATGCATTA	TAAAAATCTT	ATAATTACA	TTTCTCCCTA	AACTTTGACT
6721	CAATCATGGT	ATGTTGGCAA	ATATGGTATA	TTACTATTCA	AATTGTTTC	CTTGTACCCA
6781	TATGTAATGG	GTCTTGTGAA	TGTGCTCTT	TGTTCCCTTA	ATCATAATAA	AAACATGTTT
6841	AAGCAAACAC	TTTTCACTTG	TAGTATTGA	AGGTACCGGA	TCTCGAGCCG	CCTTCAATGC
6901	CCCCAAAACC	AATCCCCAGG	TTTTTAACTC	TCCCGATTT	CCAAGTACCA	TAGCCCCTG
6961	AGAGAGCGCC	GCGGTAATGG	GATCCCAGGA	CCCCGGGGAA	TATAAGTCTG	AGGGGGACGT
7021	AAGCAACCCCT	TCCTTTGTA	ACAGGGACAA	CATAGCCCC	ATTTCCCTTCT	TAGAAGGAGA
7081	GGTTTCCCCG	CAATAGGTCT	TACACGGGA	CGAAATCAC	TTTATGACGG	CTTCCATGCT
7141	TGATCCACCG	GGCGACCGGA	ATCACCGAGA	GCAACCGGAA	TCACGCCCTGG	GGTGGACCGC
7201	TCAGTCGTCG	GGCTTCCTTC	CCGTCTCCA	ACGACTCTCT	GAGTCTCGG	TAGGGTATGT
7261	TGGCCCCCTG	CAGTAGGGCT	CCCTCCGACG	CCACTCAGCT	TCTGCCCTCC	TAAGCCGAG
7321	CCCCCTCTAC	TAGGGTCATC	GTCCGCTCCC	CGAATAAGCG	AGACGGATGA	GGACAGGATC
7381	GCCACGCCGC	CTGTGGCCGA	CCACTATTCC	CTAACGATCA	CGTCGGGGTC	ACCAAATGAA
7441	GCCTTCTGCT	TCATGCATGT	GCTCGTAGTC	GTCAGGGAAAT	CAACGGTCCG	GCCATCAACC
7501	CAGGTGCACA	CCAATGTGGT	GAATGGTCAA	ATGGCGTTA	TTGTATCGAG	CTAGGCACTT
7561	AAATACAATA	TCTCTGCAAT	CGGGAATTCA	GTGGTTCGTC	CAATCCGTGT	TAGACCCGTC
7621	TGTTGCCTTC	CTAACAAAGGC	ACGATCATA	CACGATCATA	CCACCTTA	CCCACCAATC
7681	GGCATGCACG	GTGCTTTTC	TCTCCTTATA	AGGCATGTTG	CTAACTCATC	GTTACATAAG
7741	CATGTTGCAA	GAATACAAGA	GTATTGCATA	AGACTACATT		

(SEQ ID NO:7)

## Figura 5

**Secuencia de ADN de pALVIN-OV-1.1-I (10762 pb)**

Característica	Localización (pb)
Stuffer	1-2734
OV 3'UTR	2750-3423
CDS gag parcial	3435-3688 ((cadena complementaria))
LTR	3986-4331 ((cadena complementaria))
Gen de resistencia a ampicilina	5795-6652 ((cadena complementaria))
SIN LTR	7434-7606 ((cadena complementaria))
Promotor de OV	7975-9106
Intron	9154-10742
ATG de ovoalbúmina o POI	10760-10762

1	nnnnnnnnnn						
61	nnnnnnnnnn						
121	nnnnnnnnnn						
181	nnnnnnnnnn						
241	nnnnnnnnnn						
301	nnnnnnnnnn						
361	nnnnnnnnnn						
421	nnnnnnnnnn						
481	nnnnnnnnnn						
541	nnnnnnnnnn						
601	nnnnnnnnnn						
661	nnnnnnnnnn						
721	nnnnnnnnnn						
781	nnnnnnnnnn						
841	nnnnnnnnnn						
901	nnnnnnnnnn						
961	nnnnnnnnnn						
1021	nnnnnnnnnn						
1081	nnnnnnnnnn						
1141	nnnnnnnnnn						
1201	nnnnnnnnnn						
1261	nnnnnnnnnn						
1321	nnnnnnnnnn						
1381	nnnnnnnnnn						
1441	nnnnnnnnnn						
1501	nnnnnnnnnn						
1561	nnnnnnnnnn						
1621	nnnnnnnnnn						
1681	nnnnnnnnnn						
1741	nnnnnnnnnn						
1801	nnnnnnnnnn						
1861	nnnnnnnnnn						
1921	nnnnnnnnnn						
1981	nnnnnnnnnn						
2041	nnnnnnnnnn						
2101	nnnnnnnnnn						
2161	nnnnnnnnnn						
2221	nnnnnnnnnn						
2281	nnnnnnnnnn						
2341	nnnnnnnnnn						
2401	nnnnnnnnnn						
2461	nnnnnnnnnn						
2521	nnnnnnnnnn						
2581	nnnnnnnnnn						
2641	nnnnnnnnnn						
2701	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	TTCGA	AGCGGCCGCA	AGAAGAAAGC
2761	TGAAAAACTC	TGTCCCTTCC	AACAAGACCC	AGAGCACTGT	AGTATCAGGG	GTAAAATGAA	

# ES 2 950 358 T3

2821	AAGTATGTTA	TCTGCTGCAT	CCAGACTTCA	AAAAAGCTGG	AGCTTAATCT	AGAAAAAAA
2881	TCAGAAAGAA	ATTACACTGT	GAGAACAGGT	GCAATTCACT	TTTCCTTTAC	ACAGAGTAAT
2941	ACTGGTAAC	CATGGATGAA	GGCTTAAGGG	AATGAAATTG	GACTCACAGT	ACTGAGTCAT
3001	CACACTGAAA	AATGCAACCT	GATACATCAG	CAGAAGGTTT	ATGGGGAAA	AATGCAGCCT
3061	TCCAATTAAAG	CCAGATATCT	GTATGACCAA	GCTGCTCCAG	AATTAGTCAC	TCAAAATCTC
3121	TCAGATTAAA	TTATCAACTG	TCACCAACCA	TTCCTATGCT	GACAAGGCAA	TTGCTTGTC
3181	TCTGTGTTCC	TGATACTACA	AGGCTCTTCC	TGACTTCCTA	AAGATGCATT	ATAAAAATCT
3241	TATAATTCAAC	ATTCTCCCT	AAACTTGAC	TCAATCATGG	TATGTTGGCA	AATATGGTAT
3301	ATTACTATT	AAATTGTTT	CCTTGTACCC	ATATGTAATG	GGTCTGTGA	ATGTGCTCTT
3361	TTGTTCCCTT	AATCATAATA	AAAACATGTT	TAAGCAAACA	CTTTTCACTT	GTAGTATTG
3421	AAGGTACCGG	ATCTCGAGCC	GCCTTCAATG	CCCCAAAAC	CAATCCCCAG	GTTTTTAACT
3481	CTCCCGATT	TCCAAGTACC	ATAGCCCGCT	GAGAGAGCGC	CGCGGTAATG	GGATCCCAGG
3541	ACCCCGGGGA	ATATAAGTCT	GAGGGGGACG	TAAGCAACCC	TTCCCTTTGT	AACAGGGACA
3601	ACATAGCCCC	TATTCCTTC	TTAGAAGGAG	AGGTTTCCC	GCAATAGGTC	TTACACGCGG
3661	ACGAAATCAC	CTTTATGACG	GCTTCCATGC	TTGATCCACC	GGGCGACCGG	AATCACGCG
3721	AGCAACCGGA	ATCACGCTG	GGGTGGACCG	CTCAGTCGTC	GGGCTTCCTT	CCCGTCTTCC
3781	AACGACTCTC	TGAGTTCTCG	GTAGGGTATG	TTGGCCCCCT	GCAGTAGGGC	TCCCTCCGAC
3841	GCCACTCAGC	TTCTGCCCTC	CTAACCGCGA	GCCCCCTCTA	CTAGGGTCAT	CGTCCGCTCC
3901	CCGAATAAGC	GAGACGGATG	AGGACAGGAT	CGCCACGCCG	CCTGTGGCCG	ACCACTATTC
3961	CCTAACGATC	ACGTCGGGGT	CACCAAATGA	AGCCTTCTGC	TTCATGCATG	TGCTCGTAGT
4021	CGTCAGGGAA	TCAACGGTCC	GGCCATCAAC	CCAGGTGAC	ACCAATGTGG	TGAATGGTCA
4081	AATGGCGTTT	ATTGTATCGA	GCTAGGCACT	TAATACAAAT	ATCTCTGCAA	TGCGGAATTC
4141	AGTGGTTCGT	CCAATCCGTG	TTAGACCCGT	CTGTTGCCTT	CCTAACAAAGG	CACGATCATA
4201	CCACGATCAT	ACCACCTTAC	TCCCACCAAT	CGGCATGAC	GGTGCTTTTT	CTCTCCTTAT
4261	AAGGCATGTT	GCTAACTCAT	CGTTACATAA	GCATGTTGCA	AGACTACAAG	AGTATTGCA
4321	AAGACTACAT	TTCCCCCTCC	CTATGCAAAA	GGCAAACATAC	TATATCCTGA	GGGGACTCCT
4381	AACCGCGTAC	AACCGAAGCC	CCGCTTTTCG	CCTAAACATG	CTATTGTCCC	CTCAGTCAG
4441	CCTTGCCCGT	TACAACCGA	TTCGCAAGCC	TTGCCCTCCC	CACATTATCC	GTAGCATTAT
4501	TTCCCTAGCAG	TCATCAGAGC	TACAGAAAGAT	ACTCTATGCT	GTAGCCAAGT	CTACAAGTTT
4561	ACTATTCA	GACCTCCTAT	ATTCCCGCTG	CCAGCCGATC	AATTACCAAT	GCGCGCTTGG
4621	CGTAATCATG	GTCATAGCTG	TTTCCTGTGT	GAAATTGTTA	TCCGCTCACA	ATTCCACACA
4681	ACATACGAGC	CGGAAGCATA	AAGTGTAAAG	CCTGGGGTGC	CTAATGAGTG	AGCTAACTCA
4741	CATTAATTGC	GTTGCGCTCA	CTGCCCGCTT	TCCAGTCGGG	AAACCTGTG	TGCCAGCTGC
4801	ATTAATGAAT	CGGCCAACGC	GCGGGGAGAG	GCGGTTTGC	TATTGGGC	TCTTCCGCTT
4861	CCTCGCTCAC	TGACTCGCTG	CGCTCGGTG	TTCGGCTGC	GCGAGCGGT	TCAGCTCACT
4921	CAAAGGCGGT	AATACGGTTA	TCCACAGAA	CAGGGGATAA	CGCAGGAAAG	AACATGTGAG
4981	AAAAGGCCA	GCAAAAGGCC	AGGAACCGTA	AAAAGGCCG	GTTGCTGGCG	TTTTTCCATA
5041	GGCTCCGCC	CCCTGACGAG	CATCACAAAA	ATCGACGCTC	AAGTCAGAGG	TGGCGAAACC
5101	CGACAGGACT	ATAAAGATAC	CAGGCGTTTC	CCCCTGGAA	CTCCCTCGT	CGCTCTCCTG
5161	TTCCGACCC	GCCGCTTACC	GGATACCTGT	CCGCCTTTCT	CCCTTCGGGA	AGCGTGGCGC
5221	TTTCTCATAG	CTCACGCTGT	AGGTATCTCA	GTTGGTGT	GGTCGTTCGC	TCCAAGCTGG
5281	GCTGTGTGCA	CGAACCCCCC	GTTCAGCCCG	ACCGCTGC	CTTATCCGGT	AACTATCGTC
5341	TTGAGTCCAA	CCCGGTAAGA	CACGACTTAT	CGCCACTGGC	AGCAGCCACT	GGTAACAGGA
5401	TTAGCAGAGC	GAGGTATGTA	GGCGGTGCTA	CAGAGTTCTT	GAAGTGGTGG	CCTAACTACG
5461	GCTACACTAG	AAGGACAGTA	TTTGGTATCT	GCGCTCTGCT	GAAGCCAGT	ACCTCGGAA
5521	AAAGAGTTGG	TAGCTCTG	TCCGGCAAAC	AAACCACCGC	TGGTAGCGGT	GGTTTTTTG
5581	TTTGCAGACA	GCAGATTACG	CGCAGAAAAA	AAGGATCTCA	AGAAGATCCT	TTGATCTTT
5641	CTACGGGGTC	TGACGCTCAG	TGGAACGAAA	ACTCACGTTA	AGGGATTTG	GTCATGAGAT
5701	TATCAAAAG	GATCTTCACC	TAGATCCTT	TAATTTAAA	ATGAAGTTTT	AAATCAATCT
5761	AAAGTATATA	TGAGTAAACT	TGGTCTGACA	GTTACCAATG	CTTAATCAGT	GAGGCACCTA
5821	TCTCAGCGAT	CTGTCTATT	CGTTCATCCA	TAGTTGCCTG	ACTCCCCGTC	GTGTAGATAA
5881	CTACGATACG	GGAGGGCTTA	CCATCTGGCC	CCAGTGTG	AATGATACCG	CGAGACCCAC
5941	GCTCACCGGC	TCCAGATT	TCAGCAATAA	ACCAGCCAGC	CGGAAGGGCC	GAGCGCAGAA
6001	GTGGTCCTGC	AACTTTATCC	GCCTCCATCC	AGTCTATTAA	TTGTTGCC	GAAGCTAGAG
6061	TAAGTAGTTC	GCCAGTTAAT	AGTTTGC	ACGTTGTTGC	CATTGCTACA	GGCATCGTGG
6121	TGTCACGCTC	GTCGTTGGT	ATGGCTTCAT	TCAGCTCCGG	TTCCCAACGA	TCAAGGCGAG
6181	TTACATGATC	CCCCATGTTG	TGCAAAAAG	CGGTTAGCTC	CTTCGGT	CCGATCGTGTG
6241	TCAGAAGTAA	GTTGGCCGCA	GTGTTATCAC	TCATGGTTAT	GGCAGCACTG	CATAATTCTC
6301	TTACTGTCA	GCCATCCGTA	AGATGCTTT	CTGTGACTGG	TGAGTACTCA	ACCAAGTCAT
6361	TCTGAGAATA	GTGTATGCGG	CGACCGAGTT	GCTCTTGC	GGCGTCAATA	CGGGATAATA
6421	CCGCGCCACA	TAGCAGAACT	TTAAAAGTGC	TCATCATTGG	AAAACGTTCT	TCGGGGCGAA

# ES 2 950 358 T3

6481	AACTCTCAAG	GATCTTACCG	CTGTTGAGAT	CCAGTTCGAT	GTAACCCACT	CGTGCACCCA
6541	ACTGATCTTC	AGCATCTTT	ACTTCACCA	GCGTTCTGG	GTGAGCAAAA	ACAGGAAGGC
6601	AAAATGCCGC	AAAAAAGGGA	ATAAGGGCGA	CACGGAAATG	TTGAATACTC	ATACTCTTCC
6661	TTTTCAATA	TTATTGAAGC	ATTATCAGG	GTTATTGTCT	CATGAGCGGA	TACATATTG
6721	AATGTATTTA	AAAAAATAAA	CAAATAGGGG	TTCCGCGCAC	ATTTCGGCGA	AAAGTGCCAC
6781	CTGACGCGCC	CTGTAGCGGC	GCATTAAGCG	CGCGGGGTGT	GGTGGTTACG	CGCAGCGTGA
6841	CCGCTACACT	TGCCAGCGCC	CTAGCGCCCG	CTCCTTCGC	TTTCTCCCT	TCCTTCTCG
6901	CCACGTCGC	CGGCTTCCC	CGTCAAGCTC	TAAATCGGGG	GCTCCCTTA	GGGTTCCGAT
6961	TTAGTGCCTT	ACGGCACCTC	GACCCCAAAA	AACTTGATTA	GGGTGATGGT	TCACGTAGTG
7021	GGCCATCGCC	CTGATAGACG	GTTCAGGCC	CTTGACGTT	GGAGTCCACG	TTCTTTAATA
7081	GTGGACTCTT	GTTCACAACT	GGAACAAACAC	TCAACCCAT	CTCGGTCTAT	TCTTTGATT
7141	TATAAGGGAT	TTTGCCTGATT	TCGGCCTATT	GGTTAAAAAA	TGAGCTGATT	TAACAAAAAT
7201	TTAACCGCAA	TTTAACAAA	ATATTAAACGC	TTACAATTTC	CATTGCCAT	TCAGGCTGCG
7261	CAACTGTGTTG	GAAGGGCGAT	CGGTGCGGGC	CTCTTCGCTA	TTACGCCAGC	TGGCGAAAGG
7321	GGGATGTGCT	GCAAGGCAGT	TAAGTTGGGT	AACGCCAGGG	TTTCCCGAGT	CACGACGTTG
7381	AAAACGACG	GCCAGTGAGC	GCGTATTCCC	TAACGATCAC	GTCGGGGTCA	CCAAATGAAG
7441	CCTTCTGCTT	CATGCATGTG	CTCGTAGTCG	TCAGGGAAATC	AACGGTCCGG	CCATCAACCC
7501	AGGTGCACAC	CAATGTGGTG	AATGGTCAAA	TGGCGTTAT	TGTATCGAGC	TAGGCACTTA
7561	AATACAAATAT	CTCTGCAATG	CGGAATTTCAG	TGGTCGTC	AATCCGTC	CCTCCCTATG
7621	AAAAGCGAA	ACTACTATAT	CCTGAGGGGA	CTCCTAACCG	CGTACAACCG	AAGCCCCGCT
7681	TTTCGCCTAA	ACATGCTATT	GTCCCCCTCAG	TCAAGCCTTG	CCCGTTACAA	CCCGATTGCG
7741	AAGCCTTGCC	CTCCCCACAT	TATCCGTAGC	ATTATTCCT	AGCAGTCATC	AGAGCTACAG
7801	AAGATACTCT	ATGCTGTAGC	CAAGTCTACA	AGTTTACTAT	TCAGCGACCT	CCTATATTCC
7861	GCGTGCCAGC	CGATCAATTA	CCAATCCAAC	CAGCTATCAC	ACGGAATACA	AGAACTCGCC
7921	TACGCTCTTC	TTTCGGGCTG	CTTATAAGCC	TCCTGTAATT	TTTTTATATT	CCTCGTTAAG
7981	TCCTCAGACT	TGGCAAGGAG	AATGTAGATT	TCCACAGTAT	ATATGTTTC	ACAAAAGGAA
8041	GGAGAGAAAC	AAAAGAAAAT	GGCACTGACT	AAACTTCAGC	TAGTGGTATA	GGAAAGTAAT
8101	TCTGCTTAAC	AGAGATTGCA	GTGATCTCTA	TGTATGTCCT	GAAGAATTAT	GTTGTACTTT
8161	TTTCCCCCAT	TTTAATCA	AACAGTGCTT	TACAGGAGTC	AGAATGGTTT	CTTTACTGTT
8221	TGTCAATTCT	ATTATTCAA	TACAGAACAA	TAGCTCTAT	AACTGAAATA	TATTTGCTAT
8281	TGTATATTAT	GATTGTCCT	CGAACCATGA	ACACTCCTCC	AGCTGAATT	CACAATTCC
8341	CTGTCATCTG	CCAGGCCATT	AAGTTATTCA	TGGAAGATCT	TTGAGGAACA	CTGCAAGTTC
8401	ATATCATAAA	CACATTGAA	ATTGAGTATT	GTTTGCTATT	GTATGGAGCT	ATGTTTGCT
8461	GTATCCTCAG	AATAAAAGTT	TGTTATAAAG	CATTACACCC	CATAAAAAGA	TAGATTTAAA
8521	TATTCCAAC	ATAGGAAAGA	AAGTGTGTCT	GCTCTTCACT	CTAGTCTCAG	TTGGCTCCTT
8581	CACATGCACG	CTTCTTTATT	TCTCCTATT	TGTCAAGAAA	ATAATAGGTC	AAGTCTGTT
8641	CTCATTATG	TCCGTCTAG	CGTGGCTCAG	ATGCACATTG	TACATACAAG	AAGGATCAAA
8701	TGAAACAGAC	TTCTGGTCTG	TTACTACAA	CATAGTAATA	AGCACACTAA	CTAATAATTG
8761	CTAATTATGT	TTTCCATCTC	CAAGGTTCCC	ACATTTTCT	GTTTCTTAA	AGATCCCAT
8821	ATCTGGTTGT	AACTGAAGCT	CAATGGAACA	TGAGCAATAT	TTCCCACT	TCTCTCCCAT
8881	CCAACAGTCC	TGATGGATTA	GCAGAACAGG	CAGAAAACAC	ATTGTTACCC	AGAATTAAAA
8941	ACTAATATT	GCTCTCATT	CAATCCAAA	TGGACCTATT	GAAACTAAAA	TCTAACCCAA
9001	TCCCATTAAA	TGATTTCTAT	GGTGTCAAAG	GTCAAACCTC	TGAAGGGAAC	CTGTGGGTGG
9061	GTCACAATT	AGACTATATA	TTCCCCAGGG	CTCAGCCAGT	GTCTGTACAT	ACAGCTAGAA
9121	AGCTGTATTG	CCTTTAGCAG	TCAAGCTCGA	AAGGTAAGCA	ACTCTCTGGA	ATTACCTTCT
9181	CTCTATATTA	GCTCTTACTT	GCACCTAAC	TTTAAAAAAAT	TAACAATTAT	TGTGCTATGT
9241	GTTGTATCTT	TAAGGGTGAA	GTACCTGCGT	GATACCCCT	ATAAAAAACTT	CTCACCTGTG
9301	TATGCATTCT	GCACATT	ATTATGTGTA	AAAGCTTTGT	GTTTGTTC	AGGAGGCTTA
9361	TTCTTGTGC	TTAAAATATG	TTTTAATT	CAGAACATCT	TATCCTGTG	TTCACATATCT
9421	GATATGCTT	GCAGTTTGCT	TGATTAACCT	CTAGCCCTAC	AGAGTGCACA	GAGAGCAAAA
9481	TCATGGTGT	CAGTGAATT	TGGGGAGTTA	TTTTAATGTG	AAAATTCTCT	AGAAGTTAA
9541	TTCCGCAAA	GTGCAGCTGC	TGATCACTAC	ACAAGATAAA	AATGTGGGGG	GTGCATAAAC
9601	GTATATTCTT	ACAATAATAG	ATACATGTGA	ACTTATATAC	AGAAAAGAAA	ATGAGAAAAA
9661	TGTGTGTGT	TATACTCACA	CACGTGGTCA	GTAAAAACTT	TTGAGGGGTT	TAATACAGAA
9721	AATCCAATCC	TGAGGCCCCA	GCACTCAGTA	CCCATATAAA	GGGCTGGGCT	CTGAAGGACT
9781	TCTGACTT	ACAGATTATA	TAATCTCAG	GAAAGCAACT	AGATTCA	TGGCTCCAAA
9841	AGCTGTGCTT	TATATAAGCA	CACTGGCTAT	ACAATAGTTG	TACAGTTCA	CTCTTTATAA
9901	TAGAACAGA	CAGAACAACT	ATAAACTT	TATTGGTCTA	TGTCA	AAAGATTCA
9961	TCAGTGGCTC	TGTTTATAG	TAACATTGC	TATTGTTATCA	TGTCTGCATT	TCTCTTCTGT
10021	CTGAATGTCA	CCACTAAAAAT	TTAACTCCAC	AGAAAGTTA	TACTACAGTA	CACATGCATA
10081	TCTTGAGCA	AAGCAAACCA	TACCTGAAAG	TGCAATAGAG	CAGAATATGA	ATTACATGCG

### ES 2 950 358 T3

10141	TGTCTTTCTC	CTAGACTACA	TGACCCATA	TAAATTACAT	TCCTTATCTA	TTCTGCCATC
10201	ACCAAAACAA	AGGTAAAAAT	ACTTTGAAG	ATCTACTCAT	AGCAAGTAGT	GTCACACAAA
10261	CAGATATTTTC	TCTACATTAA	TTTTAGGGA	ATAAAAATAA	GAAATAAAAT	AGTCAGCAAG
10321	CCTCTGCTTT	CTCATATATC	TGTCCAAACC	TAAAGTTAC	TGAAATTGTC	TCTTGAAATT
10381	TCCAGTTTG	CAAGCCTATC	AGATTGTGTT	TTAACATCAGAG	GTACTGAAAA	GTATCAATGA
10441	ATTCTAGCTT	TCACTGAACA	AAAATATGTA	GAGGCAACTG	GCTTCTGGGA	CAGTTTGCTA
10501	CCCAAAAGAC	AACTGAATGC	AAATACATAA	ATAGATTAT	GAATATGGTT	TTGAACATGC
10561	ACATGAGAGG	TGGATATAGC	AACAGACACA	TTACCACAGA	ATTACTTAA	AACTACTTGT
10621	TAACATTAA	TTGCCTAAAA	ACTGCTCGTA	ATTACTGTT	GTAGCCTACC	ATAGAGTACC
10681	CTGCATGGTA	CTATGTACAG	CATTCCATCC	TTACATTTTC	ACTGTTCTGC	TGTTTGCTCT
10741	AGACAACTCA	GAGTTCACCA	TG			

(SEQ ID NO:8)

### Figura 6

## ES 2 950 358 T3

### Secuencia de ADN del adaptador de SBC102 (242 pb)

Característica	Localización (pb)
De gen de OV	1-149
CDS parcial de hLAL	150-242

```
1 CCCGGGTTGT TAACATTTAA TTGCCTAAAA ACTGCTCGTA ATTTACTGTT GTAGCCTACC
61 ATAGAGTACC CTGCATGGTA CTATGTACAG CATTCCATCC TTACATTTTC ACTGTTCTGC
121 TGTTTGCTCT AGACAACTCA GAGTTCACCA TGAAAATGCG GTTCTTGGGG TTGGTGGTCT
181 GTTTGGTTCT CTGGACCCCTG CATTCCGAGG GGTCCGGAGG GAAACTGACA GCTGTGGATC
241 CT
```

(SEQ ID NO:9)

**Figura 7**

**Secuencia de ADN deSyn SBC102 (1575 pb)**

<b>Característica</b>	<b>Localización (pb)</b>
Promotor parcial de OV	1-355
hLAL CDS	356-1575

1	CCATTATCTG	GTTGTAAC TG	AAGCTCAATG	GAACATGAGC	AATATTC CCC	AGTCTTCTCT
61	CCCATCCAAC	AGTCCTGATG	GATTAGCAGA	ACAGGCAGAA	AACACATTGT	TACCCAGAAT
121	TAAAAACTAA	TATTTGCTCT	CCATTCAATC	CAAATGGAC	CTATTGAAAC	TAAAATCTAA
181	CCCAATCCC A	TTAAATGATT	TCTATGGTGT	CAAAGGTCAA	ACTTCTGAAG	GGAACCTGTG
241	GGTGGGTCAC	AATTCA GACT	ATATATTCCC	CAGGGCTCAG	CCAGTGTCTG	TACATACAGC
301	TAGAAAGCTG	TATTGCCTT	AGCAGTCAAG	CTCGAAAGAC	AACTCAGAGT	TCACCATGAA
361	AATGCGGTTC	TTGGGGTTGG	TGGTCTGT TT	GGTTCTCTGG	ACCC TGC ATT	CCGAGGGGTC
421	CGGAGGGAAA	CTGACAGCTG	TGGATCCTGA	AAACAAACATG	AATGTCAGTG	AAATTATCTC
481	TTACTGGGGA	TTCCCTAGTG	AGGAATA CCT	AGTTGAGACA	GAAGATGGAT	ATATTCTGTG
541	CCTTAACCGA	ATTCCCTCATG	GGAGGAAGAA	CCATTCTGAC	AAAGGTCCC A	AACCAGTTGT
601	CTTCCTGCAA	CATGGCTTGC	TGGCAGATTC	TAGTA ACTTG	GTCACAA ACC	TTGCCAACAG
661	CAGCCTGGGC	TTCATTCTTG	CTGATGCTGG	TTTGAC GTG	TGGATGGC A	ACAGCAGAGG
721	AAATACCTGG	TCTCGGAAAC	ATAAGACACT	CTCAGTTCT	CAGGATGAAT	TCTGGCTT
781	CAGTTATGAT	GAGATGGCAA	AATATGACCT	ACCAGCTTCC	ATTAAC TTCA	TTCTGAATAA
841	GA CTGGCCAA	GAACAAGTGT	ATTATGTGGG	TCATTCTCAA	GGCACCACTA	TAGGTTTAT
901	AGCATTTC A	CAGATCCCTG	AGCTGGCTAA	AAGGATTA AA	ATGTTTTTG	CCCTGGTCC
961	TGTGGCTTCC	GTCGCCTTCT	GTACTAGCCC	TATGGC AAAA	CTGGGACGAC	TGCCAGATCA
1021	TCTCATTAA G	GACCTTTG	GAGACAA AGA	ATTCTTCC	CAGAGTGC GT	TTTGAAAGTG
1081	GCTGGGTACC	CACGTTGCA	CTCATGTCAT	ACTGAAGGAG	CTCTGTGGAA	ATCTCTGTT
1141	TCTTCTGTGT	GGATTTAATG	AGAGAAATT	AAATATGTCT	AGAGTGGATG	TGTATACAAC
1201	ACATTCTCCT	GCTGGAACTT	CTGTGCAAAA	CATGTTACAC	TGGAGCCAGG	CTGTTAAATT
1261	CCAAAAGTTT	CAAGCCTT	ACTGGGGAAAG	CAGTGCC AAG	AATTATTT C	ATTACAACCA
1321	GAGTTATCCT	CCCACATACA	ATGTGAAGGA	CATGCTTGT	CCGACTGCAG	TCTGGAGCGG
1381	GGGTCA CGAC	TGGCTTGCAG	ATGTCTACGA	CGTCAATATC	TTACTGACTC	AGATCACCAA
1441	CTTGGGTGTT	CATGAGAGCA	TTCCGGAATG	GGAGCATTT	GACTTCATTT	GGGGCCTGGA
1501	TGCCCTTGG	AGGCTTATA	ATAAGATTAT	TAATCTAATG	AGGAAATATC	AGT GATT CGA
1561	AGCGGCCGCC	CCGGG				

(SEQ ID NO:10)

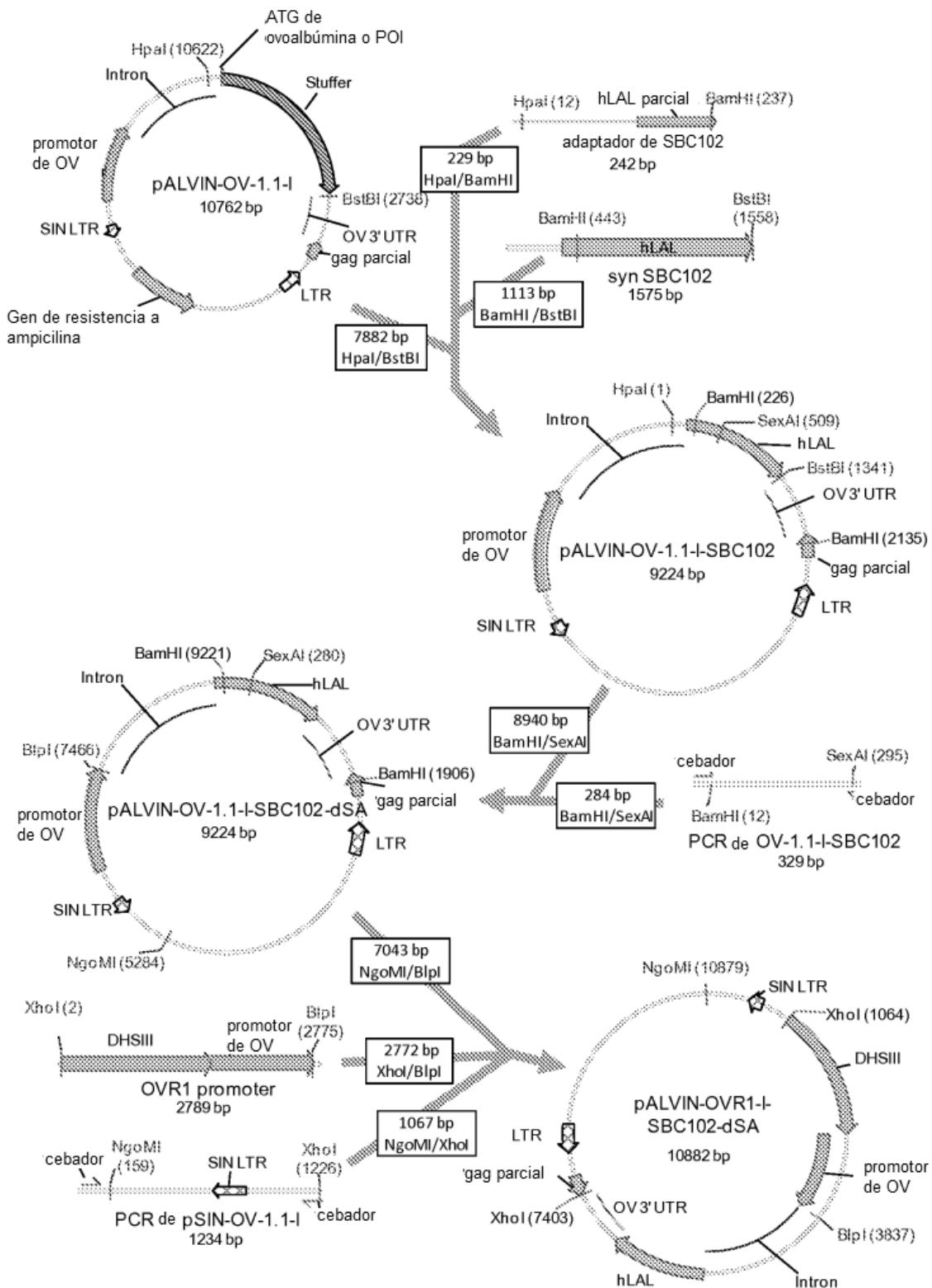
**Figura 8**

**Secuencia de ADN de promotor de OVR1 (2789 pb)**

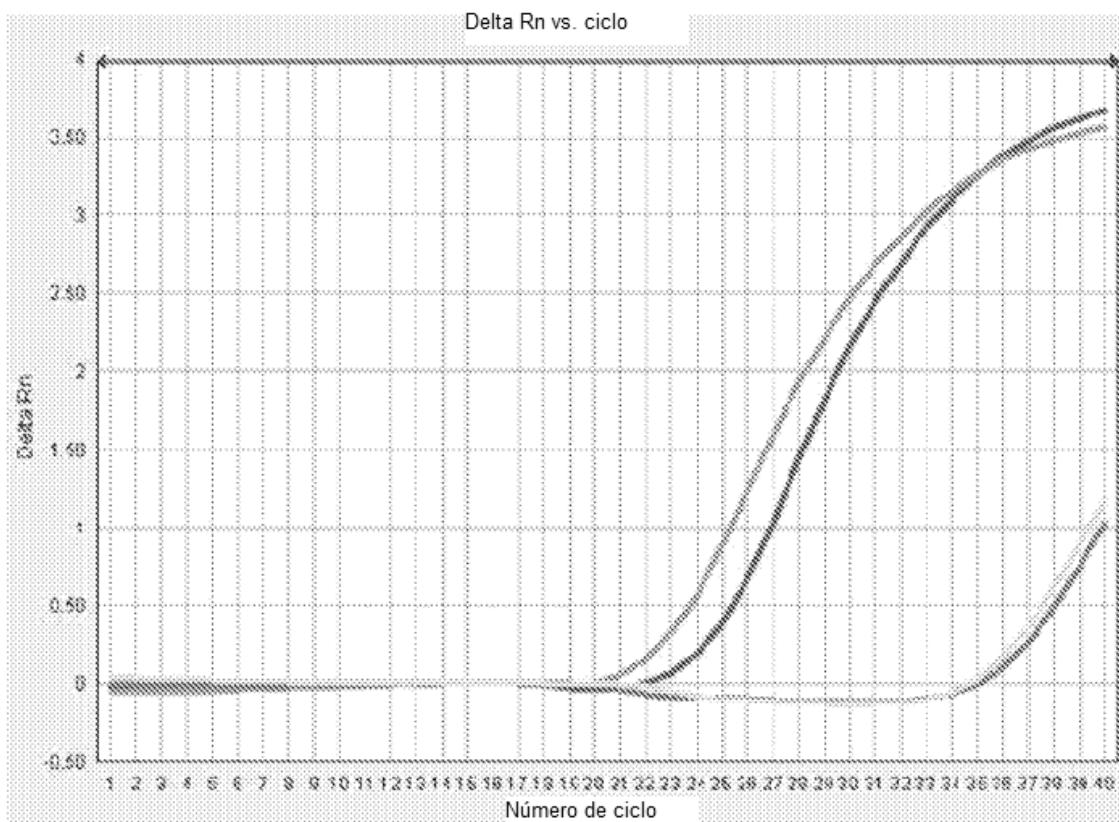
<b>Característica</b>	<b>Localización (pb)</b>									
De la región DSHIII del gen de OV	7-1658									
Promotor de OV	1658-2789									
1	CTCGAGTCTC	TTCAGAATGG	CACAGCACCG	CTGCAGAAAA	ATGCCAGGTG	GACTATGAAC				
61	TCACATCCAA	AGGAGCTTGA	CCTGATACCT	GATTTCTTC	AAACAGGGGA	AACAACACAA				
121	TCCCCACAAA	CAGCTCAGAG	AGAAACCACATC	ACTGATGGCT	ACAGCACCAA	GGTATGCAAT				
181	GGCAATCCAT	TCGACATTCA	TCTGTGACCT	GAGCAAAATG	ATTATCTCT	CCATGAATGG				
241	TTGCTCTTT	CCCTCATGAA	AAGGCAATT	CCACACTCAC	AATATGCAAC	AAAGACAAAC				
301	AGAGAACAAAT	TAATGTGCTC	CTTCCTAATG	TTAAAATTGT	AGTGGCAAAG	AGGAGAACAA				
361	AATCTCAAGT	TCTGAGTAGG	TTTTAGTGAT	TGGATAAGAG	GCTTGACCT	GTGAGCTCAC				
421	CTGGACTTCA	TATCCTTTG	GATAAAAAGT	GCTTTATAA	CTTCAGGTC	TCCGAGTCTT				
481	TATTCTATGAG	ACTGTTGGTT	TAGGGACAGA	CCCACAATGA	AATGCCTGGC	ATAGGAAAGG				
541	GCAGCAGAGC	CTTAGCTGAC	CTTTCTTGG	GACAAGCATT	GTCAAACAAT	GTGTGACAAA				
601	ACTATTTGTA	CTGCTTTGCA	CAGCTGTGCT	GGGCAGGGCA	ATCCATTGCC	ACCTATCCCA				
661	GGTAACCTTC	CAACTGCAAG	AAGATTGTTG	CTTACTCTCT	CTAGACCCCC	AAGTCAAACC				
721	AACTATGCAG	GTATGCTGAC	AAACACTATGA	TGACAGCCTG	TTCTGATCAA	GATCTCATTT				
781	GTTCATGGAC	AATTTTTGTT	GCTTGCAGCT	GGTCTCCAT	TGGGAAAGAG	TGTAGTATAT				
841	CCTTCTCATC	TGACAGAAA	GCAGAAATT	TCATGCTCCA	CACTTAATCT	ACATTGTTT				
901	AAACCACCGG	CTACTTCTTG	GAGAGGAAAA	ATGGCTTTA	TAAGACTCAC	AAAACAAAGC				
961	TCTGCAAGTC	AAATGCATAC	AAAACCTGTC	TGTAGGTCTG	GAATCAGGAC	ACTATGTGGA				
1021	AGTCAAATAG	AGCAGCTTA	AAAAGCCTT	GGGATCATT	TCATCTTATA	TTTGCAGCAC				
1081	GATACTATGA	CAGTGATAAC	TGACATAACT	GCATCAATT	CCTTGATATT	TTATTGTCT				
1141	TAAAGTACAA	GACATAGAGA	TGGACGTAAA	GATGGACATA	TGACTCAGGT	CTGGACAGGT				
1201	CCGTGGTCCA	TGTATGATAA	AAGAGATGAA	GGGAAGGAGA	ATTGAGACTG	TCTAAGAAGG				
1261	GCTTCAGGGA	CGTTCTGAAG	GCAGATTG	CTGAATCAGA	TGTACTGTCC	AAGTCTCATA				
1321	TGTAGCAATG	GAAGGCTGAT	ATTGGAGAAA	TATAAAGAAA	TGGCTGTGAA	CTCAAAGTGA				
1381	CCCTGAACAG	AAAAGGGATA	TGGAGTTAAA	ATAATGTCAC	AGAACTGAGG	TTTATATGAT				
1441	ATACCATGGG	CTGCAGAGGG	TCAGAGTGC	CCACCATGGG	CCTCTCTGG	GCTGCAGGGA				
1501	ACTTCTGTT	TACACCTGGA	ACACCTCCTG	CCCTCCTCCG	CACTGACCTC	AGTGTCTAC				
1561	GGGCTGTTTC	TCTCACATT	TCTCACTCAC	CTCTCCCAAC	TACCATTGTA	CAGCAGTTGT				
1621	TCTTACATAT	TGCTCCTCCT	GAGGTACATC	TAGCATCGTT	AAGTCCTCAG	ACTTGGCAAG				
1681	GAGAATGTAG	ATTTCACAG	TATATATGTT	TTCACAAAAG	GAAGGAGAGA	AACAAAAGAA				
1741	AATGGCACTG	ACTAAACTTC	AGCTAGTGGT	ATAGGAAAGT	AATTCTGCTT	AACAGAGATT				
1801	GCAGTGATCT	CTATGTATGT	CCTGAAGAAT	TATGTTGTAC	TTTTTCCCC	CATTTTAAA				
1861	TCAAAACAGTG	CTTTACAGAG	GTCAGAATGG	TTTCTTACT	GTGTTGCAAT	TCTATTATTT				
1921	CAATACAGAA	CAATAGCTTC	TATAACTGAA	ATATATTGC	TATTGTATAT	TATGATTGTC				
1981	CCTCGAACCA	TGAACACTCC	TCCAGCTGAA	TTTCACATT	CCTCTGTCAT	CTGCCAGGCC				
2041	ATTAAGTTAT	TCATGGAAGA	TCTTGAGGA	ACACTGCAAG	TTCATATCAT	AAACACATT				
2101	GAAATTGAGT	ATTGTTTGC	ATTGTATGGA	GCTATGTTT	GCTGTATCCT	CAGAATAAAA				
2161	GTTTGTATA	AAGCATTAC	ACCCATAAAA	AGATAGATT	AAATATTCCA	ACTATAGGAA				
2221	AGAAAGTGTG	TCTGCTCTTC	ACTCTAGTCT	CAGTTGGCTC	CTTCACATGC	ACGCTTCTTT				
2281	ATTTCTCTTA	TTTTGTCAAG	AAAATAATAG	GTCAAGTCTT	GTTCTCATTT	ATGTCCTGTC				
2341	TAGCGTGGCT	CAGATGCACA	TTGTACATAC	AAGAAGGATC	AAATGAAACA	GACTTCTGGT				
2401	CTGTTACTAC	AACCATAGTA	ATAAGCACAC	TAACATAAA	TTGCTAATT	TGTTTCCAT				
2461	CTCCAAGGTT	CCCACATT	TCTGTTTCT	TAAAGATCCC	ATTATCTGGT	TGTAACTGAA				
2521	GCTCAATGGA	ACATGAGCAA	TATTCCCAG	TCTTCTCTCC	CATCCAACAG	TCCTGATGGA				
2581	TTAGCAGAAC	AGGCAGAAA	CACATTGTTA	CCCAGAATTA	AAAACATAATA	TTTGCTCTCC				
2641	ATTCAATCCA	AAATGGACCT	ATTGAAACTA	AAATCTAAC	CAATCCCATT	AAATGATTTC				
2701	TATGGTGTCA	AAGGTCAAAAC	TTCTGAAGGG	AACCTGTGGG	TGGGTACAA	TTCAGACTAT				
2761	ATATTCCCCA	GGGCTCAGCC	AGTGTCTGT							

(SEQ ID NO: 11)

**Figura 9**

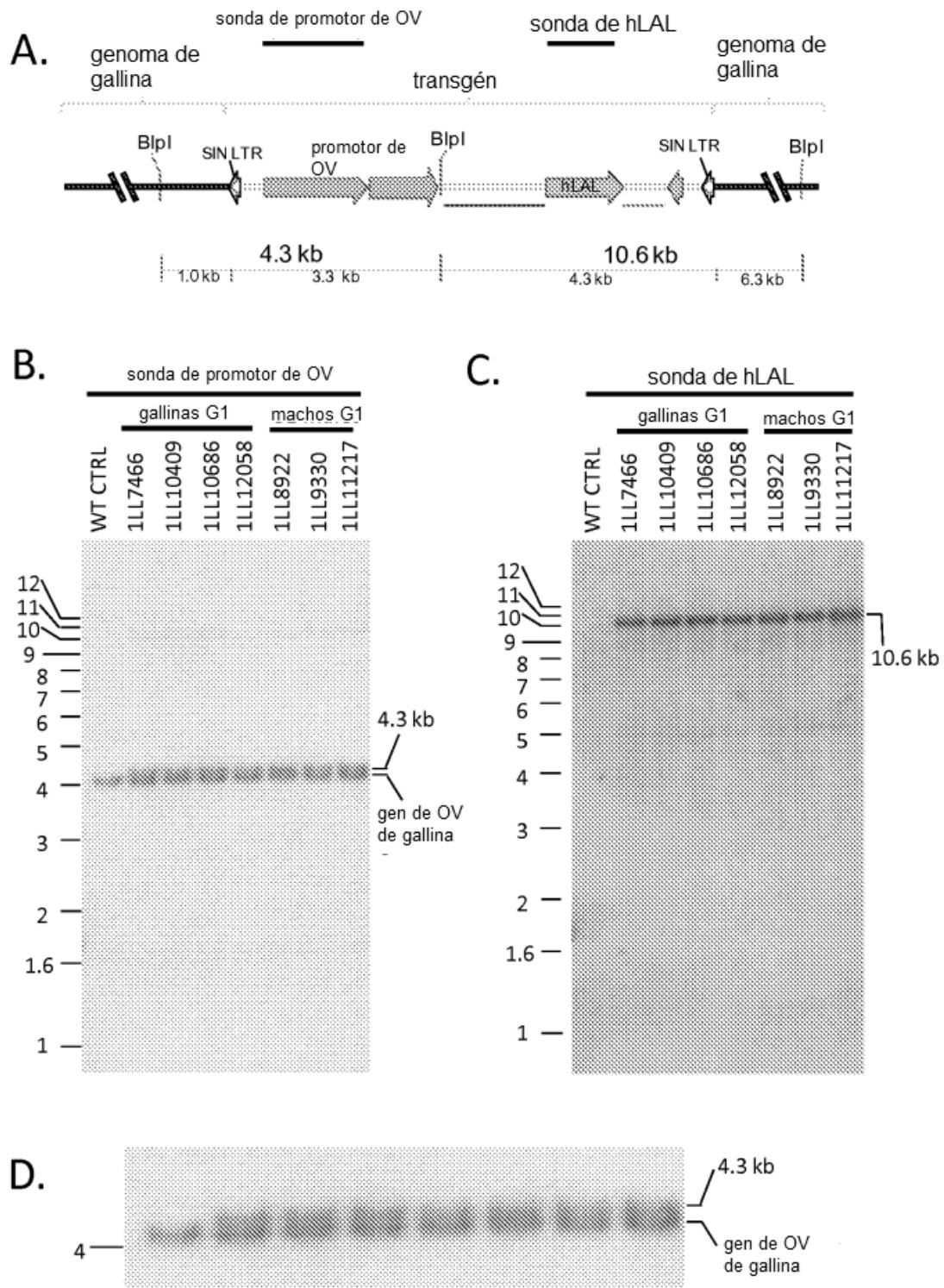
**Figura 10**

# ES 2 950 358 T3

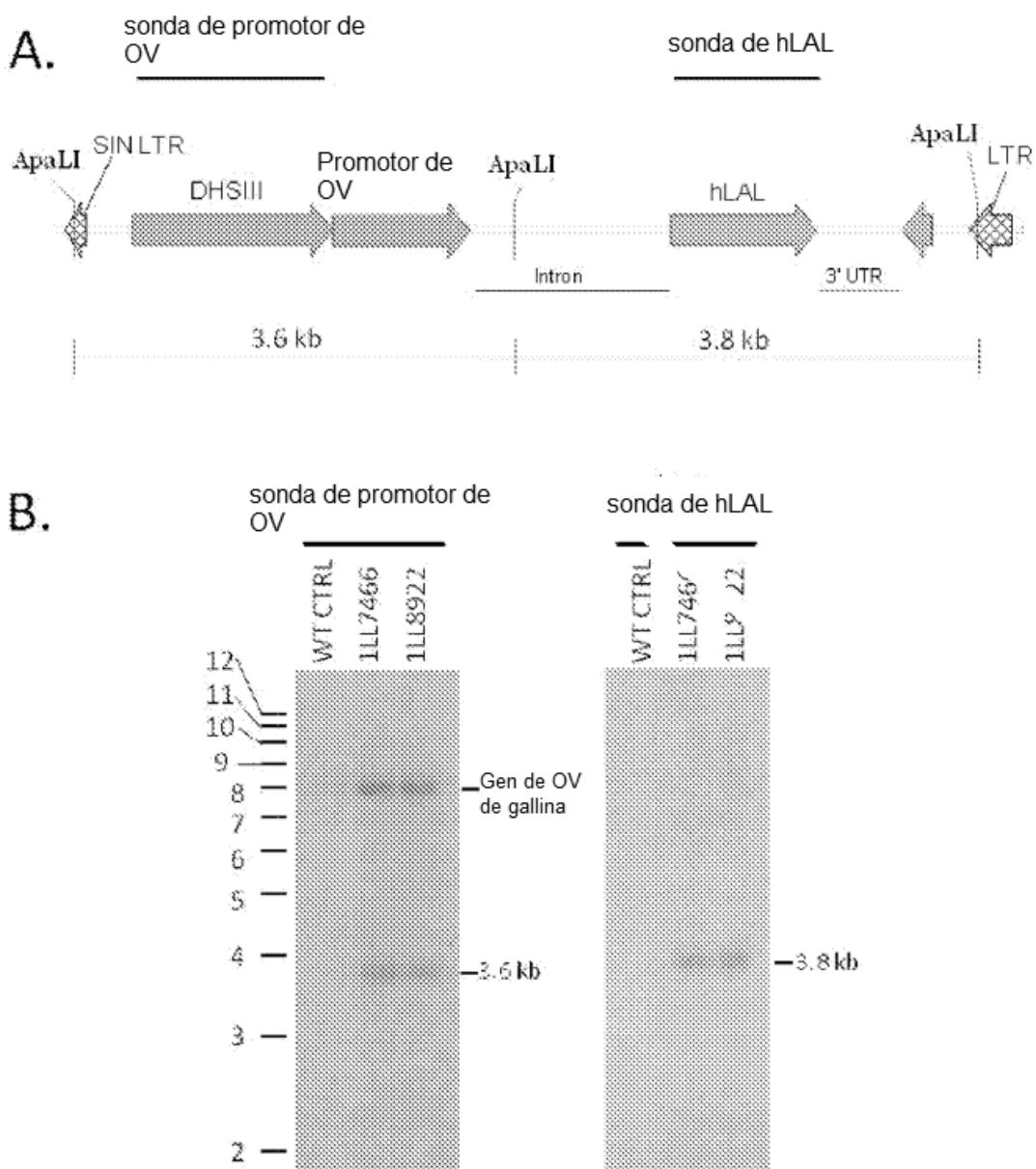


**Figura 11**

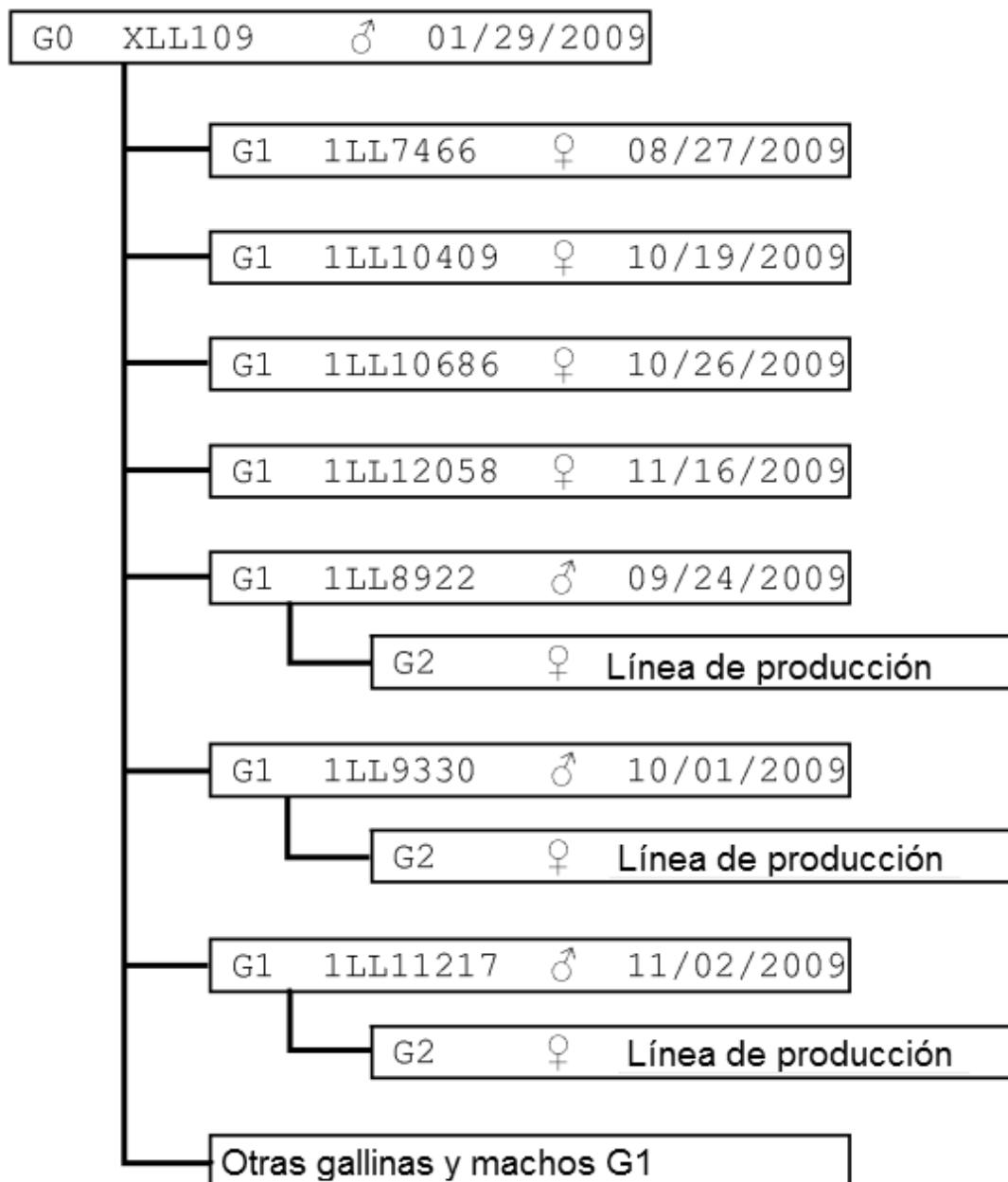
ES 2 950 358 T3

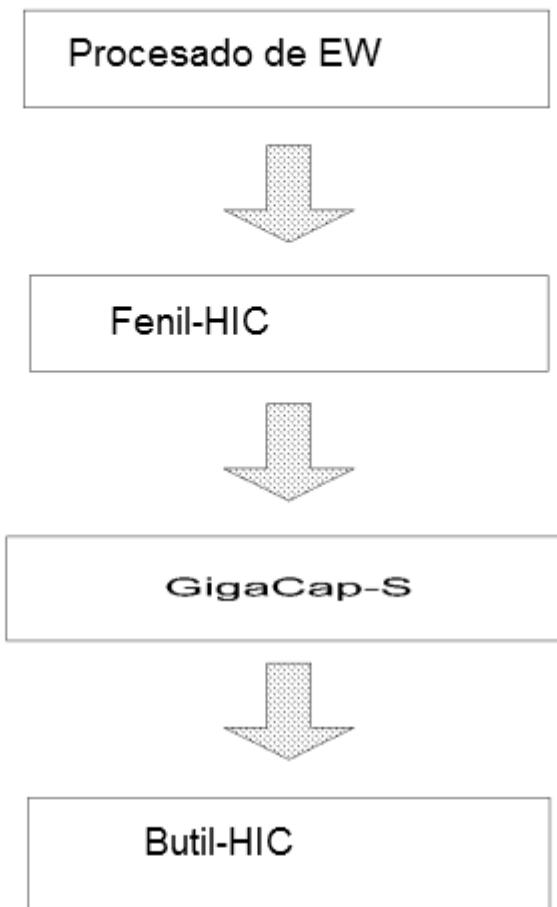


**Figura 12**

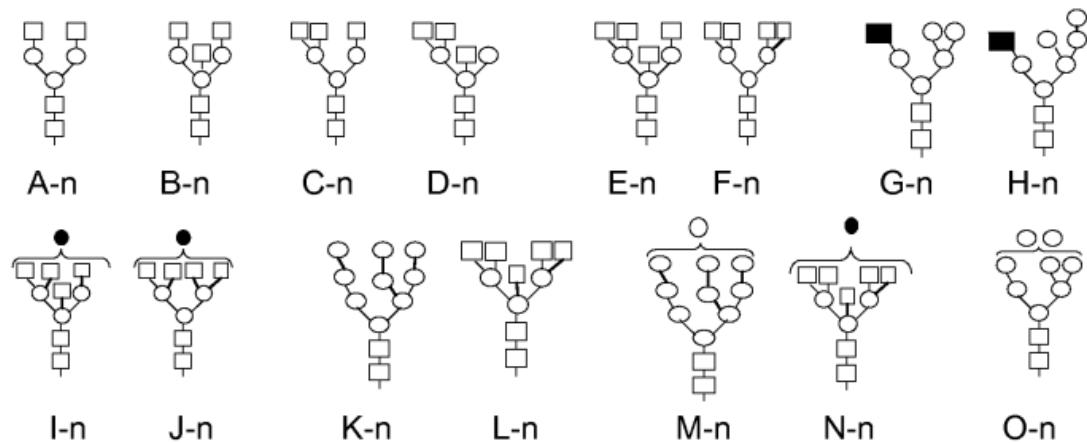


**Figura 13**

**Figura 14**



**Figura 15**



Cuadrado = N-acetil glucosamina

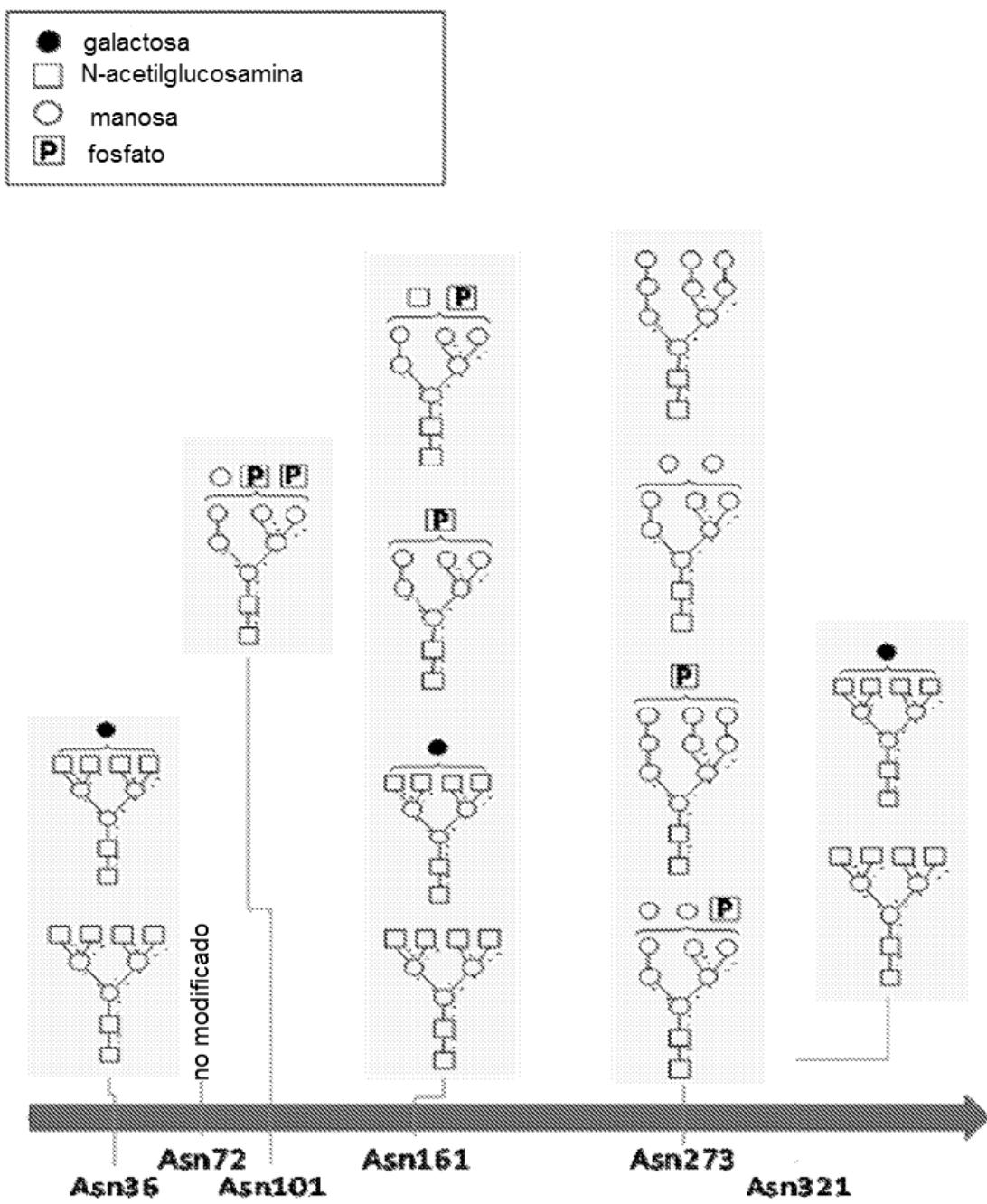
Cuadrado relleno = Manosa-6-fosfato

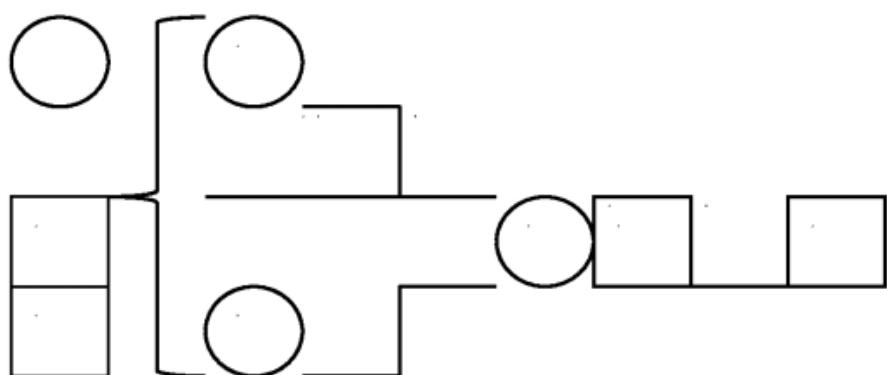
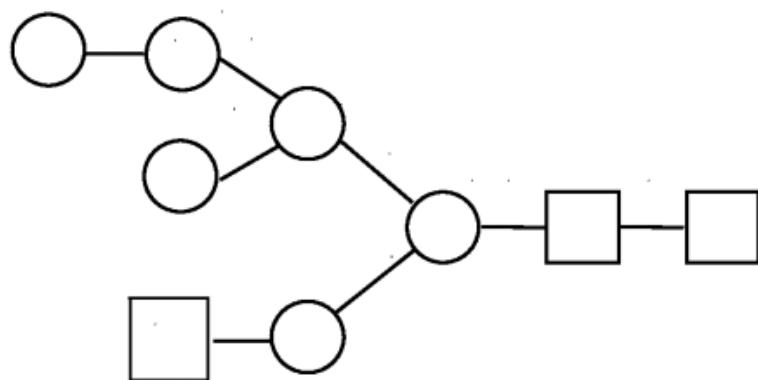
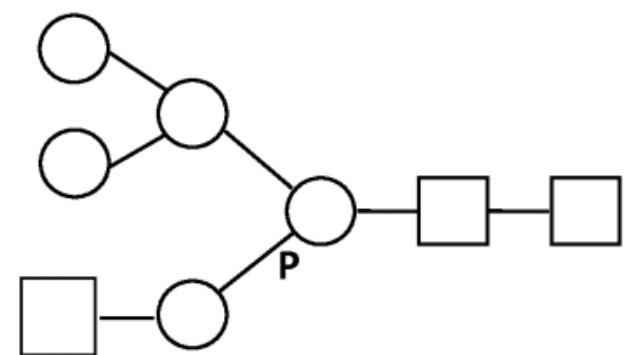
Círculo = Manosa

Círculo relleno = Galactosa

Triángulo relleno = fucosa

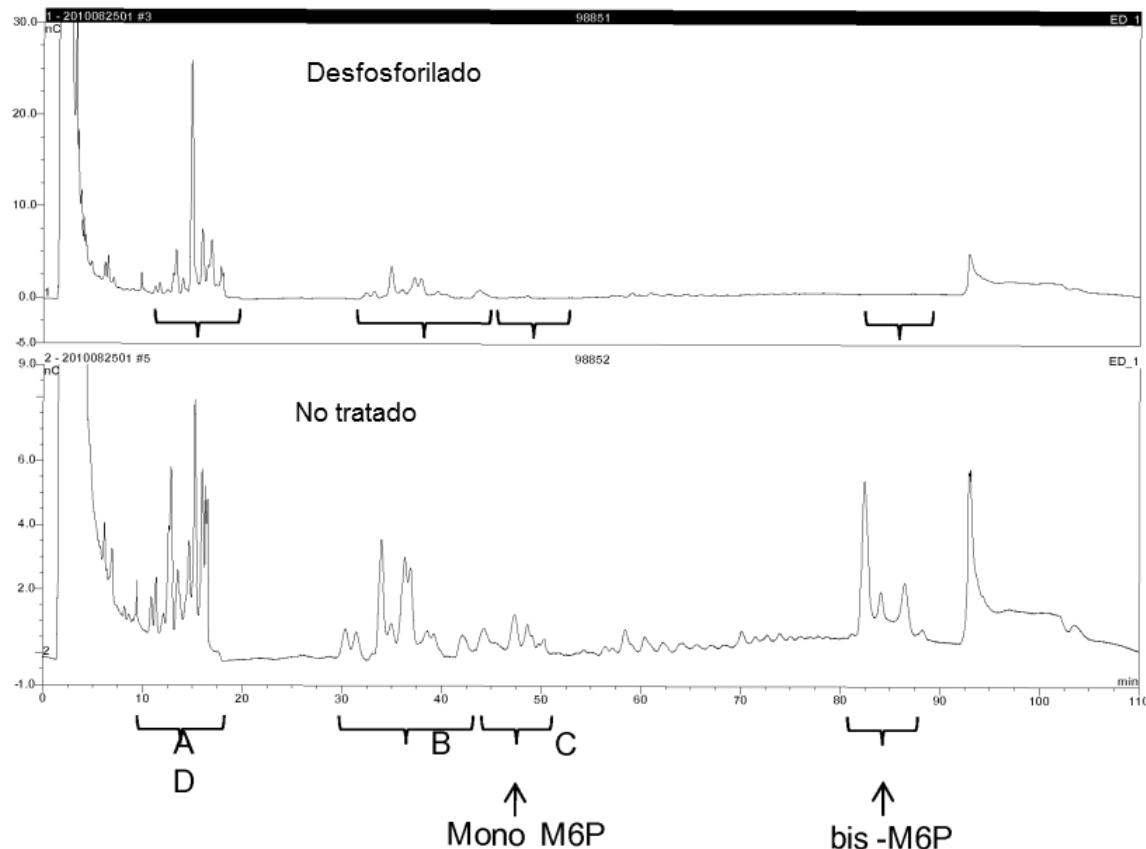
**Figura 16**

**Figura 17**



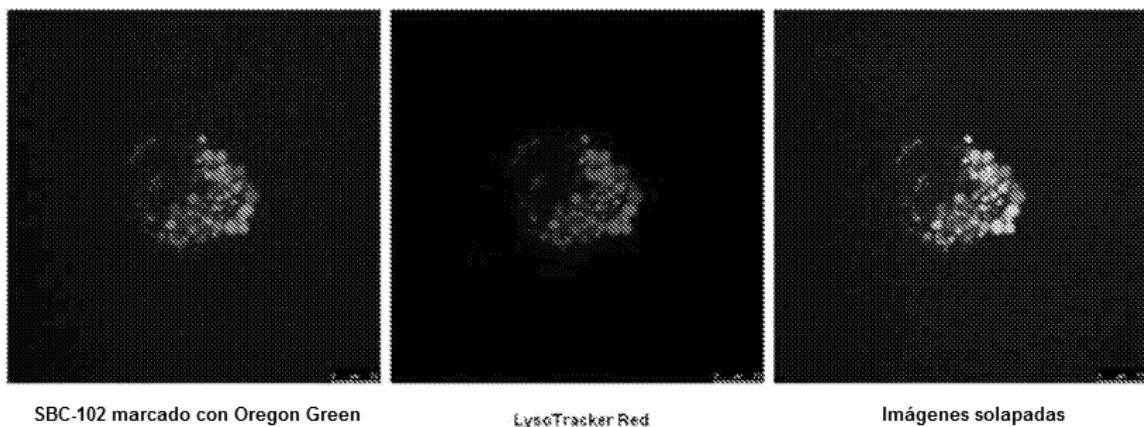
**Figura 18**

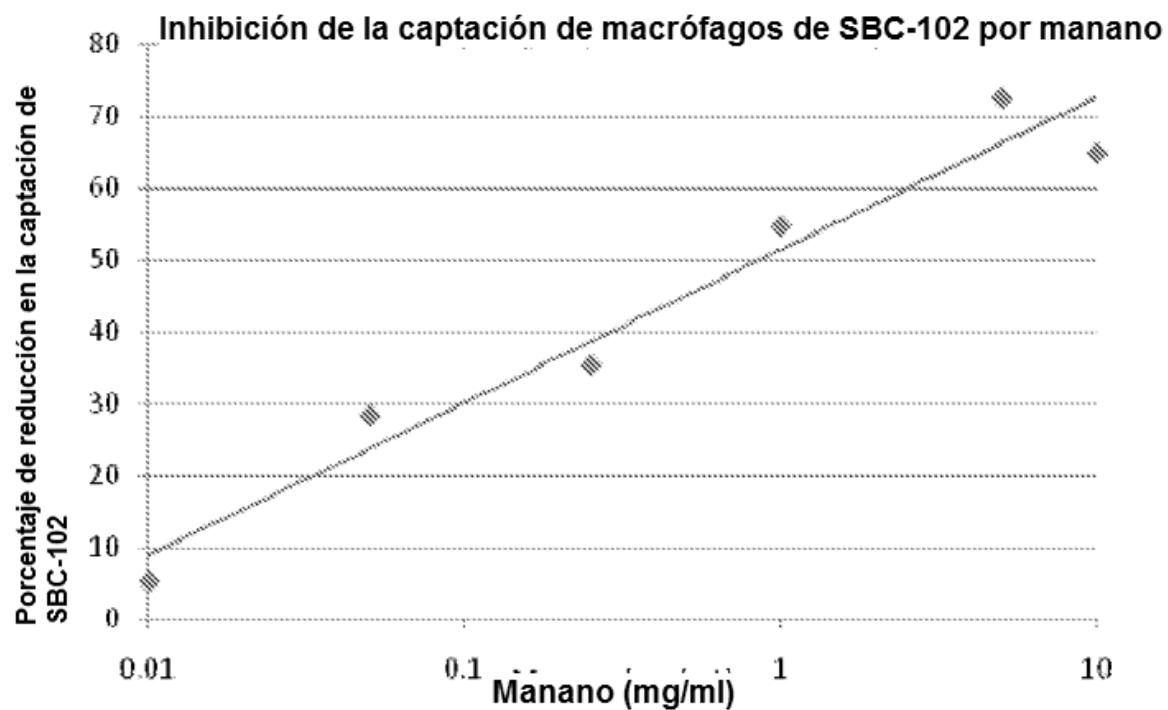
# ES 2 950 358 T3



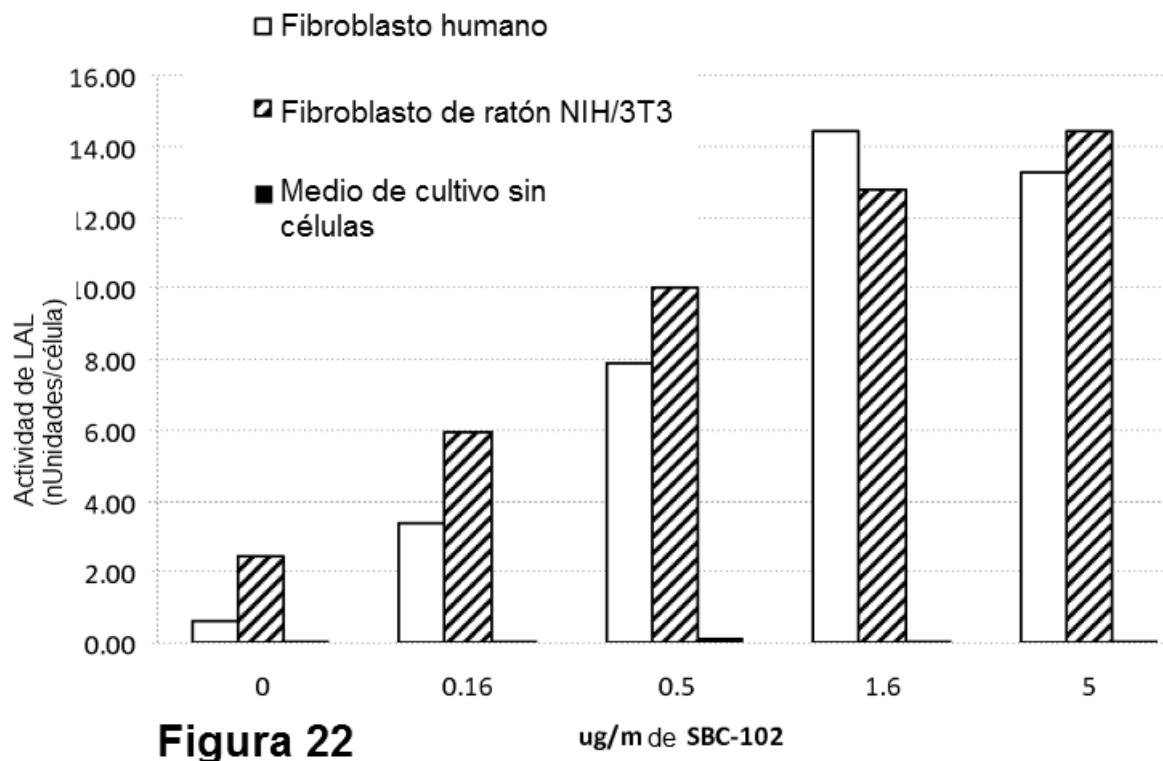
**Figura 19**

**Figura 20**





**Figura 21**



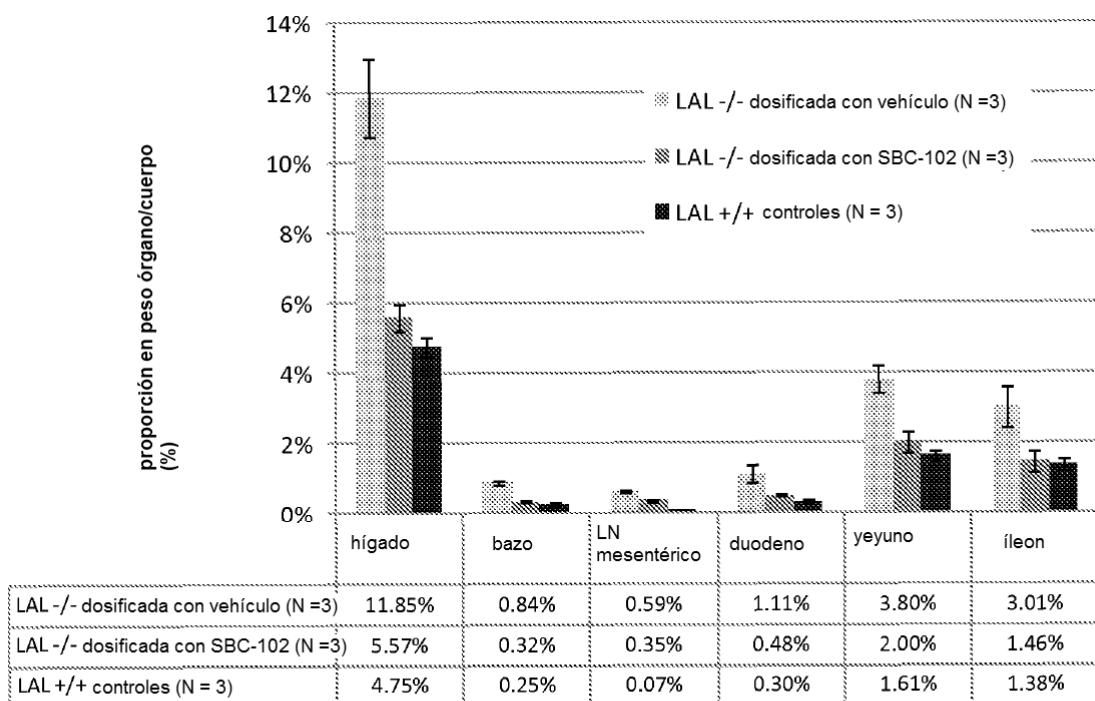


Figura 23

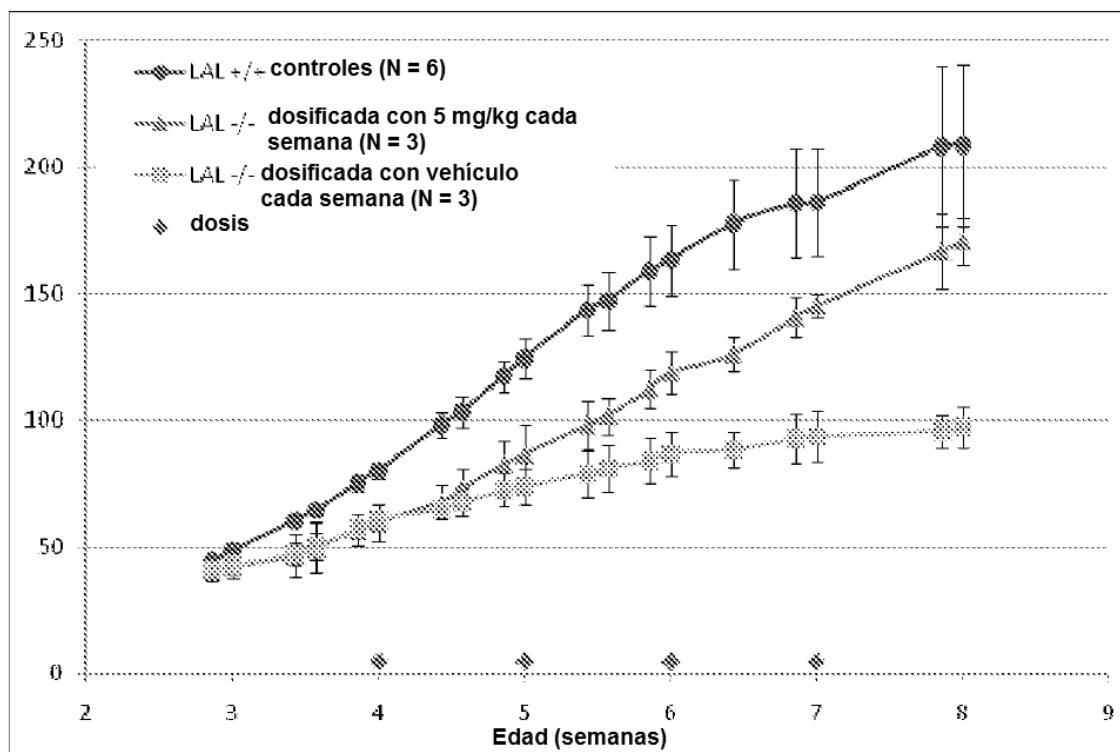
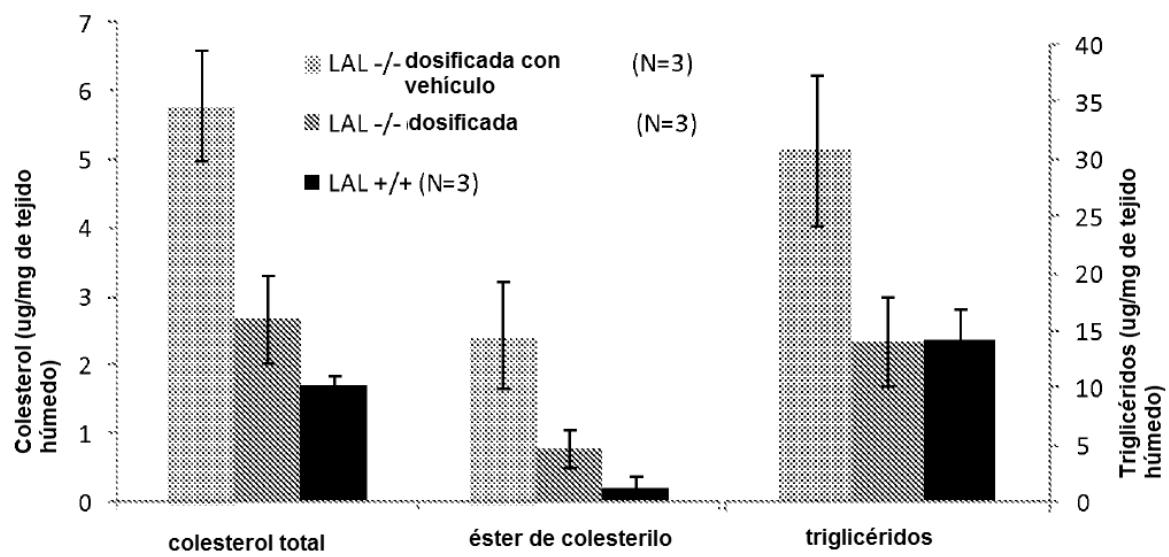


Figura 24



**Figura 25**

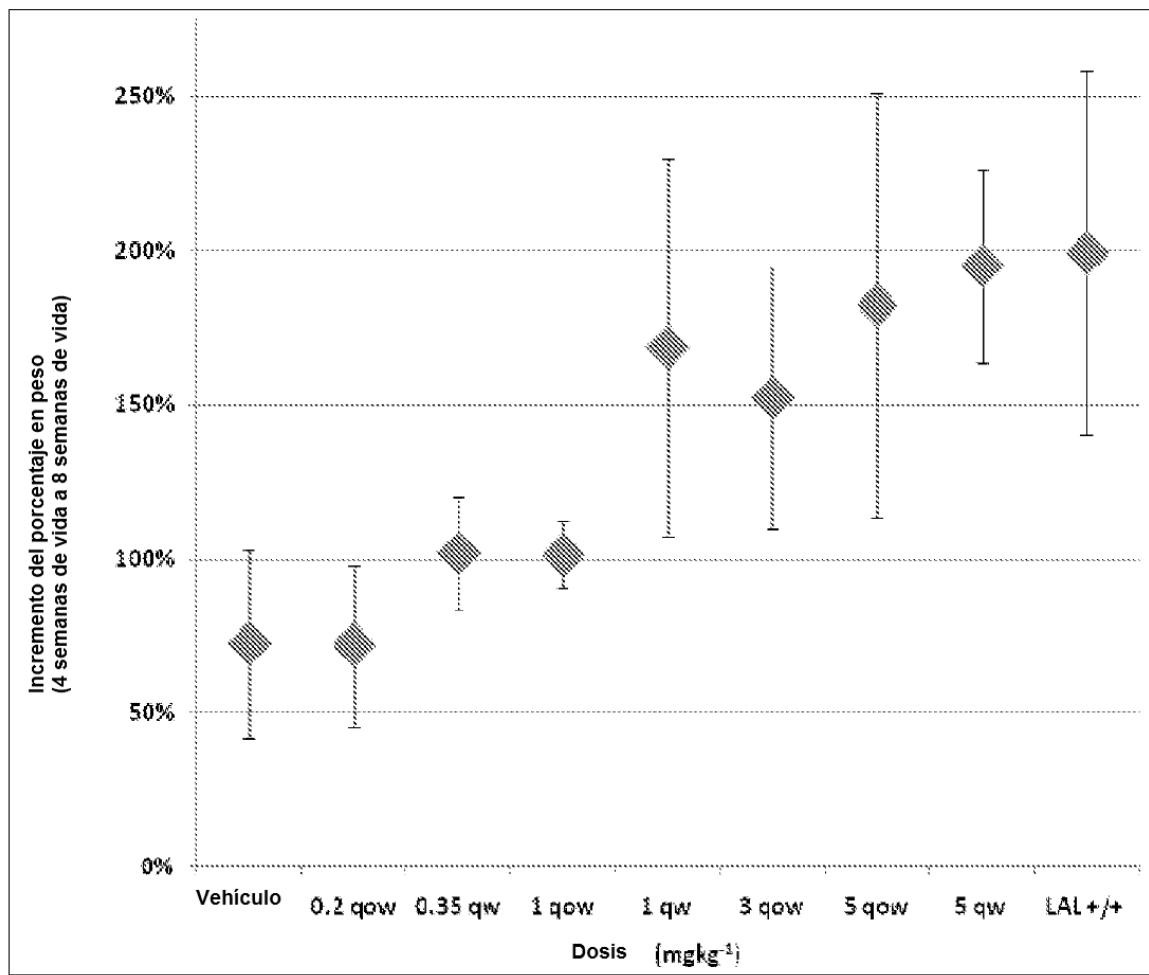
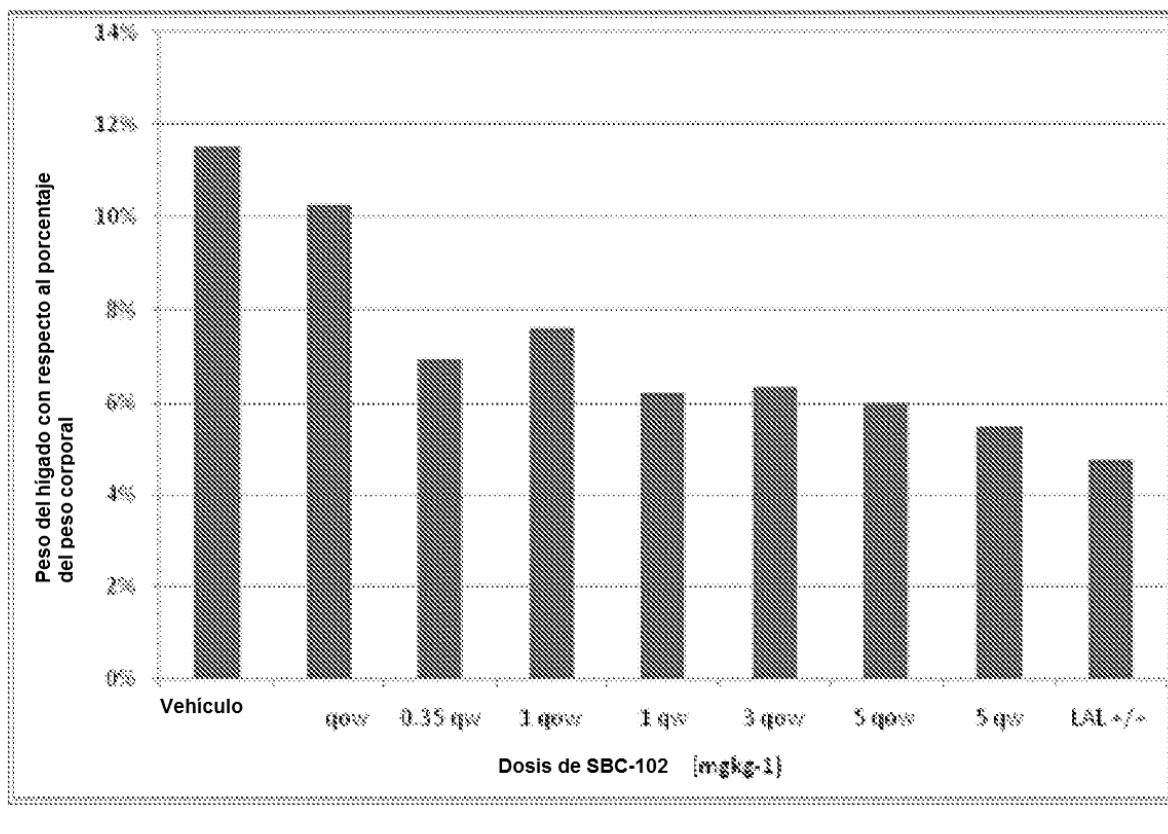
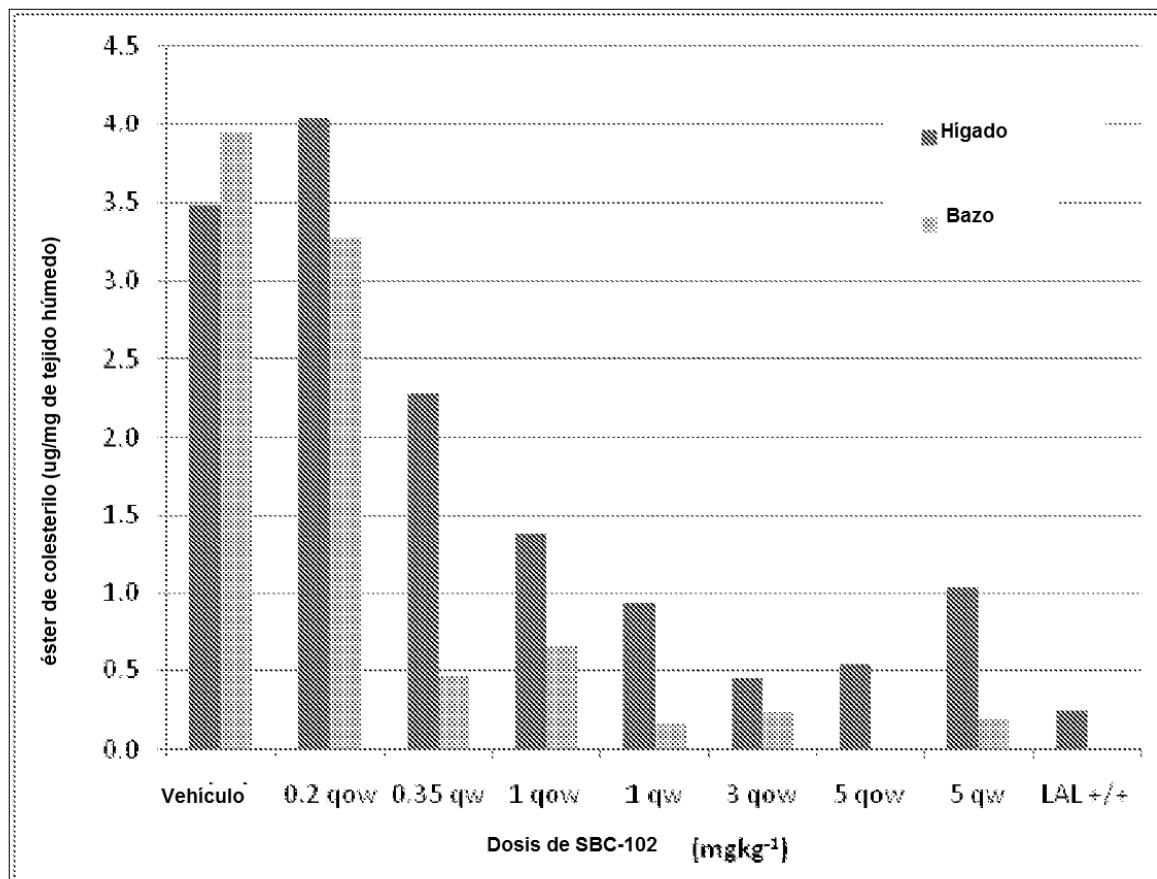


Figura 26



qw: cada semana  
qow: cada dos semanas

**Figura 27**



qow: cada dos  
semanas  
qw: cada semana

**Figura 28**

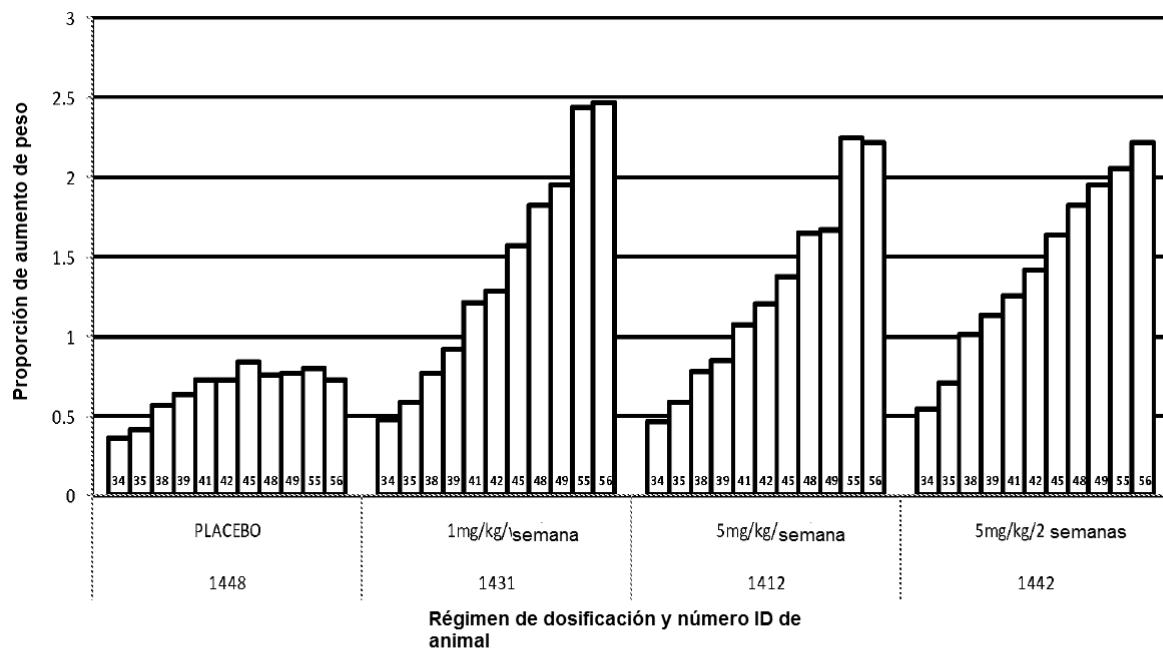
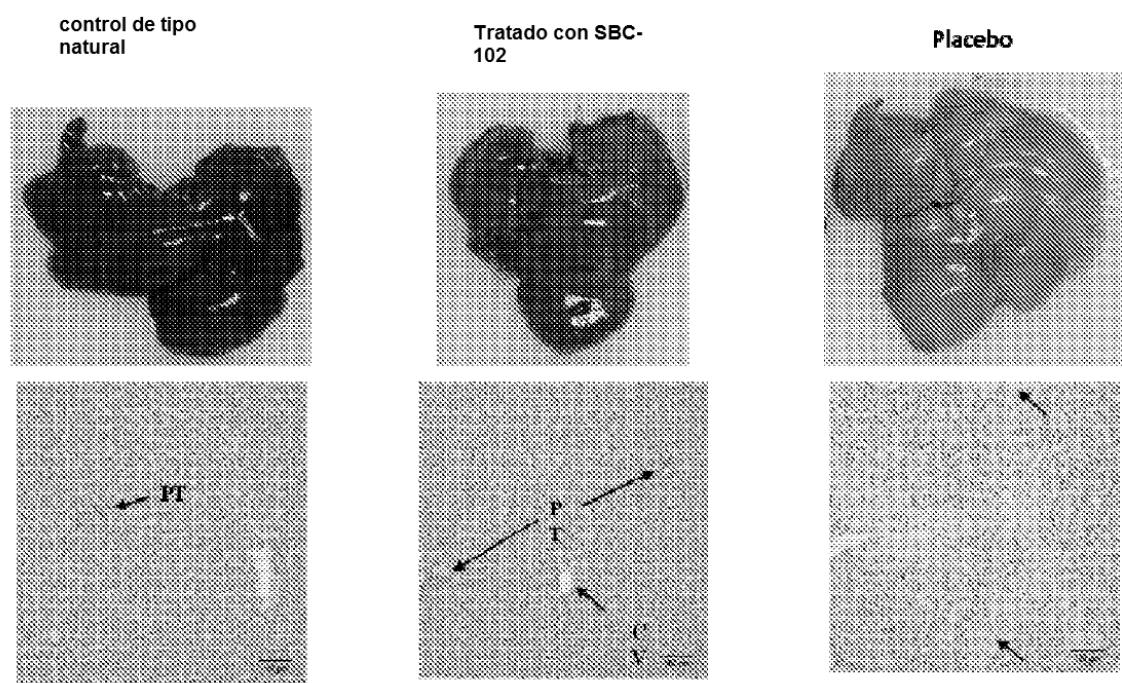


Figura 29



**Figura 30**