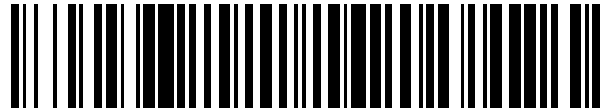


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 142**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
A61P 13/04 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2010 E 10702554 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 2384200**

54 Título: **Agentes terapéuticos de alanina-glioxilato aminotransferasa**

30 Prioridad:

30.01.2009 EP 09151795

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2013

73 Titular/es:

**UNIQUIRE IP B.V. (100.0%)
Meibergdreef 61
1105 BA Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**RODRIGUEZ PENA, MARIA SOL;
PETRY, HARALD;
TWISK, JAAP;
VAN DEVENTER, SANDER JAN HENDRIK;
SALIDO RUIZ, EDUARDO CARLOS y
TORRES RAMIREZ, ARMANDO**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 429 142 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

Agentes terapéuticos de alanina-glioxilato aminotransferasa

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención está en los campos de la medicina y la biología molecular. Más específicamente la invención se refiere a nuevos agentes terapéuticos de proteína y ácido nucleico basados en la alanina glioxilato aminotransferasa (AGXT), en particular una variante de AGXT, incluyendo tratamientos asistidos por terapia genética, y métodos para el uso de estos agentes terapéuticos en el tratamiento y la prevención de condiciones causadas por la ausencia o deficiencia de alanina glioxilato aminotransferasa, incluyendo hiperoxaluria primaria de tipo I.

Antecedentes de la invención

15 [0002] La hiperoxaluria primaria de tipo I (PH1) (OMIM #259900) es un trastorno metabólico raro, heredado en una manera recesiva autosómica. La PHI se caracteriza por una deficiencia de la enzima hepática alanina glioxilato aminotransferasa (AGXT o AGT; EC 2.6.1.44), que está provocada normalmente por una mutación en el gen que codifica en 2q36-q37 (Genbank Acc. No. NM_000030, version 14 June 2008). Una deficiencia de AGXT produce un fallo de detoxificación de glioxilato, con sobreproducción de oxalato. La AGXT convierte el glioxilato en glicina, utilizando alanina como donante del grupo amino, y el cofactor piridoxal-fosfato. Los niveles altos de oxalato en pacientes PHI se excretan por los riñones, que sufren un deterioro progresivo como resultado de la deposición de oxalato de calcio. Después del fallo renal, los niveles de oxalato se elevan hasta el punto de la oxalosis sistémica, una condición de amenaza para la vida. Habitualmente, el tratamiento más eficaz para la PHI es el trasplante de hígado preventivo o trasplante conjunto de hígado y de riñón. No obstante, este tratamiento tiene sus propias limitaciones incluyendo el escaso suministro de órganos adecuados, morbilidad significativa y mortalidad, y exposición crónica a fármacos inmunosupresores.

20 [0003] Así, nuevos tratamientos para la PHI son necesarios. Es un objetivo de la presente invención el de proporcionar una proteína nueva y agentes terapéuticos de ácido nucleico basados en variantes de la alanina glioxilato aminotransferasa (AGXT) y métodos para el uso de estos agentes terapéuticos en el tratamiento y prevención de las condiciones provocadas por la ausencia o deficiencia de alanina glioxilato aminotransferasa, incluyendo hiperoxaluria primaria de tipo I.

Resumen de la invención

35 [0004] La invención se refiere a un agente terapéutico de AGXT I340M, para el uso como medicamento o para el uso en un método de tratamiento. Tal terapéutico se puede utilizar en el tratamiento de una condición que responde a AGXT, por la cual, la condición que responde a AGXT es hiperoxaluria primaria de tipo I.

40 [0005] El agente terapéutico AGXT I340M se selecciona del grupo que consiste en: a) una proteína AGXT I340M que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad de secuencia con SEC ID n°: 2 cuando se alinea óptimamente sobre su longitud total utilizando el programa GAP, y donde la proteína AGXT I340M comprende una metionina en la posición correspondiente a la posición 340 en la SEC ID n°: 2 b) una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AGXT I340M tal y como se define en a); y, c) un virión de un vector de terapia genética vírica que comprende una molécula de ácido nucleico tal y como se define en b).

45 [0006] Un agente terapéutico AGXT basado en el tipo salvaje (no reivindicado) se puede definir de una forma similar al agente terapéutico AGXT I340M anteriormente descrito, excepto que tal agente terapéutico comprendería isoleucina (o un aminoácido diferente de la metionina) en una posición correspondiente a la posición 340 en la SEC ID n°: 2 (es decir, se puede basar en la secuencia de AGXT de tipo salvaje). Aquí, lo que se describe en relación a un agente terapéutico AGXT I340M se puede aplicar de forma similar a un agente terapéutico AGXT basado en la secuencia de AGXT de tipo salvaje.

50 [0007] Un agente terapéutico AGXT I340M según la invención puede comprender además o codificar sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: a) una leucina en una posición correspondiente a la posición 11 en la SEC ID n°: 2 b) una arginina en una posición correspondiente a la posición 41 en la SEC ID n°: 2 c) una isoleucina en una posición correspondiente a la posición 152 en la SEC ID n°: 2 d) una arginina en una posición correspondiente a la posición 170 en la SEC ID n°: 2 e) una treonina en una posición correspondiente a la posición 244 en la SEC ID n°: 2 f) una treonina en una posición correspondiente a la posición 294 en la SEC ID n°: 2 g) una isoleucina en una posición correspondiente a la posición 326 en la SEC ID n°: 2 h) combinaciones de una o más de las sustituciones de aminoácidos b) a g); y, i) la combinación de las sustituciones a) y f).

55 [0008] La invención también se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína AGXT I340M de la invención, donde la secuencia de nucleótidos está enlazada

operativamente a un promotor para la expresión en células humanas y donde, opcionalmente, el promotor no es un promotor de un gen AGXT humano. Preferiblemente, el promotor es un promotor específico del hígado. El promotor específico del hígado se puede seleccionar del grupo que consiste en un promotor α 1-anti-tripsina (AAT), un promotor de globulina fijadora de hormona tiroidea, un promotor de albúmina, un promotor de globulina fijadora de tiroxina (TBG), un promotor híbrido de la región de control hepática (HCR)-ApoCII, un promotor híbrido HCR-hAAT, un promotor AAT combinado con el elemento intensificador del gen de albúmina de ratón (Ealb), un promotor de apolipoproteína E y un promotor que tiene la secuencia de SEC ID n°: 3. El constructo de ácidos nucleicos según este aspecto es preferiblemente un vector de terapia genética vírica, más preferiblemente un vector parvoviral.

[0009] La invención además concierne a un virión parvoviral que comprende un constructo de ácidos nucleicos que codifica el agente terapéutico AGXT I340M.

[0010] También, la invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un agente terapéutico AGXT, constructo de ácidos nucleicos o virión parvoviral de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0011] La invención también proporciona un método para el tratamiento de una condición que responde a AGXT donde el método comprende el paso de la administración de una cantidad eficaz del agente terapéutico AGXT I340M, un constructo de ácidos nucleicos, un virión parvoviral o una composición farmacéutica de la invención a un sujeto con dicha condición que responde a AGXT, por ejemplo, hiperoxaluria primaria de tipo I.

[0012] Además, la invención, proporciona el uso de un agente terapéutico AGXT I340M, un constructo de ácidos nucleicos, un virión parvoviral o una composición farmacéutica de la invención en la producción de un medicamento para el uso en el tratamiento de condiciones que responden a AGXT, por ejemplo, hiperoxaluria primaria de tipo I.

Descripción de las figuras

[0013]

La Fig. 1 muestra un esquema de los vectores rAAV usados. Los vectores rAAV fueron construidos por inserción del ADNc humano de AGXT en un vector plásmido pro-AAV2, bajo el control de un promotor híbrido específico del hígado EalbAAT. Secuencia abajo del ADNc de AGXT (o GFP) se incluyó una señal de poliadenilación bGH. En algunos constructos se ha incluido un elemento regulador postranscripcional WPRE. El cassette de expresión fue flanqueado por repeticiones terminales invertidas de AAV2.

La Fig. 2 muestra excreción miccional de oxalato en ratones macho AGXT^{-/-} tratados con etilenglicol (EG) después de la administración de 5×10^{12} gc/kg de vector terapéutico AA V8.Ealb-hAAT-AGXT-WPRE o vector de control AAV8.Ealb-hAAT-GFP-WPRE.

La Fig. 3a muestra el análisis de Western blot de la expresión de AGXT dentro de hígados de ratones AGXT^{-/-} (de ambos géneros) 8 semanas después de la inyección intravenosa de 5×10^{12} genomas de vector por kg vector AAV8 o AAV5 (éste último también administrado en una dosis diez veces inferior 5×10^{11} vg/kg).

Figuras 3b y 3c (el inserto) muestran la expresión de AGT en las muestras de hígado de ratones macho AGXT^{-/-} inyectados con el AAV8.Ealb-hAAT-AGXT-WPRE o vector de control AAV8.Ealb-hAAT-GFP-WPRE (ampliación 100x) respectivamente.

La Fig. 3d muestra los resultados obtenidos por coloración inmunohistoquímica de secciones de hígado congelado, con porcentajes de hepatocitos transducidos alrededor de 90% para AAV8 y la dosis máxima de AAV5, 60% para 5×10^{12} AAV5 partículas/kg, y hasta 10% (y menos que 1% en mujeres) para 5×10^{11} AAV5 partículas/kg.

La Fig. 4 muestra la excreción miccional de oxalato en ratones macho AGXT^{-/-} tratados con etilenglicol (EG) después de la administración de bien 1×10^{10} , 1×10^{11} o 3×10^{11} gc/kg del vector terapéutico AAV5.Ealb-hAAT-AGXT-WPRE o vector de control AAV5.Ealb-hAAT-GFP-WPRE (en el día de inyección y 27 días más tarde). Se observa una reducción marcada en la oxaluria en ratones tratados con las tres dosis evaluadas, aunque dosis más altas mostraron la reducción más significativa estadísticamente, consiguiendo niveles de excreción de oxalato similares a los ratones de tipo salvaje. Como se esperaba, los ratones AgxtKO inyectados con partículas víricas de control GFP- AAV5 no mostraron una reducción significativa de oxaluria.

Descripción de la invención

Definiciones

[0014] Un "constructo de ácidos nucleicos" se entiende que significa aquí una molécula de ácido nucleico artificial que resulta del uso de tecnología de ADN recombinante. Un constructo de ácidos nucleicos es una molécula de ácido nucleico, bien de cadena doble o sencilla, que ha sido modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos, que están combinados y yuxtapuestos de una forma, que de otra manera no existiría en la naturaleza. Un constructo de ácidos nucleicos es normalmente un "vector", es decir una molécula de ácido nucleico que se puede usar para entregar ácidos nucleicos creados exógenamente, tal como ADN en una célula huésped.

[0015] Un tipo de constructo de ácidos nucleicos es un "cassette de expresión" o "vector de expresión". Estos términos se refieren a secuencias de nucleótidos que son capaces de efectuar la expresión de un gen en una célula huésped o un organismo huésped compatible con tales secuencias. Los cassetes de expresión o vectores de expresión típicamente incluyen por lo menos secuencias reguladoras de transcripción adecuadas y opcionalmente, señales de terminación de transcripción 3'. Factores adicionales necesarios o útiles en la efectuación de la expresión también pueden estar presentes, tales como elementos intensificadores de la expresión.

[0016] El término "homólogo" cuando se usa para indicar la relación entre un ácido nucleico (recombinante) o una molécula polipeptídica dados y un organismo huésped o célula huésped dados, se entiende que significa que en la naturaleza el ácido nucleico o molécula polipeptídica se produce por una célula huésped o un organismo de la misma especie. El término "heterólogo" se puede utilizar para indicar que en la naturaleza el ácido nucleico o molécula polipeptídica se produce por una célula huésped o un organismo de una especie diferente.

[0017] Como se utiliza en este caso, el término "enlazado operativamente" se refiere a un enlace de elementos polinucleótidos (o polipeptídicos) en una relación funcional. Un ácido nucleico está "enlazado operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una secuencia reguladora de transcripción está operativamente enlazada a una secuencia codificante si ésta afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Enlazado operativamente significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son típicamente contiguas y, donde es necesario para unir dos regiones de codificación de proteína, contiguas y en el marco de lectura.

[0018] "Secuencia de control de expresión" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que regula la expresión de una secuencia de nucleótidos a la que está enlazada operativamente. Una secuencia de control de expresión está "enlazada operativamente" a una secuencia de nucleótidos cuando la secuencia de control de expresión controla y regula la transcripción y/o la traducción de la secuencia de nucleótidos. Así, una secuencia de control de expresión puede incluir promotores, potenciadores, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), terminaciones de transcripción, un codón de inicio delante de un gen de codificación de proteína, señal de empalme para intrones, y codones de parada. El término "secuencia de control de expresión" está destinado a incluir, como mínimo, una secuencia cuya presencia se diseña para influenciar la expresión, y pueden incluir también componentes ventajosos adicionales. Por ejemplo, las secuencias líder y las secuencias compañeras de fusión son secuencias de control de expresión. El término puede incluir también el diseño de la secuencia de ácidos nucleicos de manera que, potenciales codones de iniciación indeseables dentro y fuera del marco, son eliminados de la secuencia. También puede incluir el diseño de la secuencia de ácidos nucleicos de manera que potenciales sitios de empalme indeseables son eliminados. Incluye secuencias o secuencias de poliadenilación (pA) que dirigen la adición de una cola poli-A, es decir, una cuerda de residuos de adenina en el extremo 3' de un ARNm, secuencias denominadas secuencias poli-A. También se puede diseñar para mejorar la estabilidad del ARNm. Secuencias de control de expresión que afectan a la transcripción y estabilidad de la traducción, por ejemplo, promotores, al igual que secuencias que efectúan la traducción, por ejemplo, secuencias Kozak, se conocen en las células de insectos. Las secuencias de control de expresión pueden ser de tal naturaleza en cuanto a modular la secuencia de nucleótidos a la que están enlazadas operativamente de manera que niveles de expresión inferiores o niveles de expresión más altos son conseguidos.

[0019] Como se utiliza en este caso, el término "promotor" o "secuencia reguladora de transcripción" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que sirve para controlar la transcripción de una o más secuencias de codificación, y está localizado secuencia arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de transcripción de la secuencia codificante, y está identificado estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para ARN-polimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación de transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluyendo, pero no limitando a sitios de unión de factor de transcripción, sitios de unión de proteínas represoras y proteínas activadoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida por un experto en la técnica que actúe directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor, incluyendo por ejemplo atenuadores o potenciadores, pero también silenciadores.

[0020] Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de tejidos bajo la mayoría de las condiciones fisiológicas y desarrollables. Un promotor "inducible" es un promotor que está regulado de manera fisiológica o de desarrollo, por ejemplo por la aplicación de un inductor químico. Un promotor "específico de tejido" sólo está activo, sustancialmente sólo activo o predominantemente activo en tipos específicos de tejidos o células.

5 [0021] Una "secuencia no traducida 3' " o "3'-UTR" (también frecuentemente denominada región no codificante 3', o extremo 3') se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos que se encuentra secuencia abajo de la secuencia codificante de un gen, que comprende, por ejemplo, un sitio de terminación de transcripción y (en la mayoría, pero no en todos los ARNm eucarióticos) una señal de poliadenilación (tal como por ejemplo AAUAAA o variantes de la misma). Después de la terminación de la transcripción, el ARNm transcrito se puede dividir secuencia abajo de la señal de poliadenilación y se puede adicionar una cola poli-A, que está implicada en el transporte del ARNm al citoplasma (donde tiene lugar la traducción).

10 [0022] Los términos, "sustancialmente idéntico" "identidad sustancial " "esencialmente similar" u o "similitud esencial" significan que dos péptidos o dos secuencias de nucleótidos, cuando están alineados óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT utilizando parámetros por defecto, comparten al menos un porcentaje de identidad de secuencia tal y como se define en otra parte aquí. GAP usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias sobre su longitud total, maximizando del número de coincidencias y minimiza el número de espacios. Generalmente, se utilizan los parámetros por defecto de GAP, con una penalización de creación de espacio = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y una penalización de extensión del espacio = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas). Para los nucleótidos la matriz de puntuación por defecto utilizada es nwsgapdna y para las proteínas la matriz de puntuación por defecto es Blossum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Está claro que cuando se dice que las secuencias de ARN son esencialmente similares o tienen un cierto grado de identidad de secuencia con secuencias de DNA, la timina (T) en la secuencia de ADN es considerada igual al uracilo (U) en la secuencia de ARN. Los alineamientos de secuencia y las puntuaciones para el porcentaje de identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas informáticos, tales como el GCG Wisconsin Package, versión 10.3, disponible de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA o el software de código libre Emboss for Windows (versión actual 2.7.1-07). Alternativamente, el porcentaje de similitud o identidad se puede determinar por búsqueda en bases de datos tales como FASTA, BLAST, etc.

25 Descripción detallada de la invención

30 [0023] AGXT I340M (una variante raramente vista en la población general) produce una actividad significativamente más alta que el alelo mayor más común. Aquí, se muestra que una única administración en la vena de la cola de un vector de AAV de terapia genética incorporando ácidos que codifican AGXT con I340M resultan en una corrección prolongada del fenotipo de hiperoxaluria primaria de tipo I (PH1) en un modelo de ratón, sin evidencia de daño de hígado o toxicidad.

35 [0024] Este método de transferencia genética basado en AAV tiene como resultado la expresión en el hígado del AGXT I340M humano suficientemente robusto para superar el problema potencial que plantea la continua producción de oxalato de los hepatocitos no transducidos. Además, el gen expresado está correctamente dirigido al peroxisoma en el hepatocito de ratón, y éste complementa el déficit del modelo de ratón AGxt1KO.

40 [0025] Por consiguiente, la invención concierne a un agente terapéutico AGXT I340M. Es decir, la invención implica la precognición de ventajas importantes que se pueden obtener a través de tratamientos terapéuticos que comprenden la administración de agentes terapéuticos derivados de la proteína AGXT I340M, y secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína AGXT I340M.

45 [0026] En el contexto de esta invención un agente terapéutico AGXT I340M, puede incluir péptidos AGXT I340M, secuencias de ácidos nucleicos que codifican los mismos, células que expresan tales péptidos o ácidos nucleicos, y derivados de tales péptidos, donde dicho agente terapéutico típicamente mejora o trata la enfermedad cuando se administra en dosis profilácticamente o terapéuticamente eficaces.

50 [0027] Los agentes terapéuticos AGXT I340M, de la invención incluyen modificaciones, derivados y análogos de péptidos AGXT I340M, y ácidos nucleicos que codifican tales péptidos. En algunas formas de realización, el agente terapéutico AGXT I340M, de la invención puede ser un péptido con una secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido de tipo salvaje AGXT I340M existente en la naturaleza como se dispone en SEC ID n°: 2.

55 [0028] El agente terapéutico AGXT I340M, de la invención puede incluir compuestos sustancialmente purificados tales como fragmentos peptídicos, fragmentos de péptido modificado, análogos o sales farmacológicamente aceptables de AGXT I340M. Tales compuestos se denominan colectivamente en este caso péptidos LPL S447X. Los péptidos AGXT I340M pueden incluir homólogos de la secuencia AGXT I340M, incluyendo homólogos de especies diferentes del homo sapiens (que pueden tener aplicaciones veterinarias).

[0029] Los péptidos AGXT I340M pueden incluir isoformas de origen natural o variantes genéticas de AGXT I340M.

60 [0030] Un agente terapéutico AGXT I340M es una proteína AGXT I340M que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, al menos aproximadamente un 95%, al menos aproximadamente un 97%, al menos aproximadamente un

98%, al menos aproximadamente un 99% o al menos aproximadamente un 100% de identidad de secuencia con SEC ID n°: 2 cuando está alineada óptimamente sobre su longitud total utilizando el programa GAP, y donde la proteína AGXT I340M comprende una metionina en una posición correspondiente a la posición 340 en SEC ID n°: 2. Una "posición correspondiente a cierta posición en la SEC ID NO: 2" (p. ej. 340) se entiende aquí como una posición correspondiente a esa posición en SEC ID n°: 2 en una secuencia de aminoácidos de AGXT diferente de SEC ID n°: 2, cuando está alienada óptimamente con SEC ID n°: 2 sobre su longitud total utilizando el programa GAP.

[0031] En una forma de realización la proteína AGXT I340M es una proteína con actividad de alanina glioxilato aminotransferasa (AGXT; EC 2,6,1,44) como se puede evaluar como está descrito por Rumsby et al (Ann Clin Biochem. 1997 Jul;34 (Pt 4):400-4). En una forma de realización preferida, la proteína AGXT I340M es una proteína con una secuencia de aminoácidos donde los residuos del sitio activo, residuos implicados en el enlace de sustratos, unión del co-factor (piridoxal 5'-fosfato) y/o interacción con la subunidad se conservan. Tales residuos se pueden derivar por comparación de las secuencias de aminoácidos de SEC ID n°: 2 con la estructura cristalina 3D de las proteínas AGXT de humanos y de *Anabaena* como se ha descrito por Zhang et al. (2003, J Mol Biol., 331(3):643-52) and Han et al. (2005, Proteins., 58(4):971-5), respectivamente), incluyendo la identificación de residuos del sitio activo en las posiciones 81 (S), 82 (G), 83 (H), 108 (W), 158 (S), 183 (D), 186 (A) 208 (Q) y 209 (K). Según Fold and Function Assignment System (FFAS; Jaroszewski L, Li W, Godzik A. 2002, Protein Sci, 11:1702-1713), la familia AGXT tiene cientos de secuencias homólogas en proteomas pro- y eucarióticos. Se puede acceder a modelos para homólogos de AGXT en <http://www1.jcsg.org/cgi-bin/models/getmor.pl?key=17130350>. Los alineamientos de secuencia de SEC ID n°: 2 con estas secuencias de aminoácidos conocidas de AGXT indicarán regiones conservadas y posiciones de aminoácido, la conservación siendo importante para la estructura y actividad enzimática. Estas regiones y posiciones no tolerarán sustituciones de aminoácidos o tolerarán sólo sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos fuera de estas regiones y posiciones es improbable que afecten inmensamente a la actividad AGXT.

[0032] En una forma de realización preferida, el agente terapéutico AGXT I340M es una proteína AGXT I340M que comprende sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: a) una leucina en una posición correspondiente a la posición 11 en SEC ID n°: 2 b) una arginina en una posición correspondiente a la posición 41 en SEC ID n°: 2 c) una isoleucina en una posición correspondiente a la posición 152 en SEC ID n°: 2 d) una arginina en una posición correspondiente a la posición 170 en SEC ID n°: 2 e) una treonina en una posición correspondiente a la posición 244 en SEC ID n°: 2 f) una treonina en una posición correspondiente a la posición 294 en SEC ID n°: 2 g) una isoleucina en una posición correspondiente a la posición 326 en SEC ID n°: 2 h) combinaciones de una o más de las sustituciones de aminoácidos b) a g); y, i) la combinación de las sustituciones a) y f). En una forma de realización preferida el agente terapéutico AGXT I340M es una proteína AGXT I340M seleccionada del grupo que consiste en: a) una proteína AGXT I340M que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2 y, b) una proteína AGXT I340M que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2 y que comprende las sustituciones de aminoácidos tal y como se definen en a) a i) anteriormente.

[0033] En otra forma de realización, un agente terapéutico AGXT I340M es una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M tal y como se define aquí anteriormente, o un virión de un vector de terapia genética vírica comprendiendo la molécula de ácido nucleico.

[0034] En una forma de realización preferida de la invención, una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M tiene una mejora en el uso sesgado de codones para la célula humana en comparación con la secuencia de nucleótidos de origen natural que codifica para la transferasa.

[0035] La capacidad de adaptación de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M al uso de codones de células humanas se pueden expresar como índice de adaptación de codones (CAI). Un índice de adaptación de codones se define aquí como una medida de la capacidad de adaptación relativa del uso del codón de un gen hacia el uso del codón de genes humanos altamente expresados. La capacidad de adaptación relativa (w) de cada codón es la proporción del uso de cada codón, respecto a aquel del codón más abundante para el mismo aminoácido. El CAI se define como la media geométrica de estos valores relativos de capacidad de adaptación. Los codones no sinónimos y los codones de terminación (dependiendo del código genético) son excluidos. Los valores de CAI varían de 0 a 1, con valores más altos que indican una proporción más alta de los codones más abundantes (Véase Sharp and Li , 1987, Nucleic Acids Research 15: 1281-1295 ; véase también: Kim et al., Gene. 1997, 199:293-301 ; zur Megede et al., Journal of Virology, 2000, 74: 2628-2635). Preferiblemente, una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M tiene un CAI de al menos aproximadamente 0.8, al menos aproximadamente 0.85, al menos aproximadamente 0.90, al menos aproximadamente 0.92, al menos aproximadamente 0.94, al menos aproximadamente 0.95, al menos aproximadamente 0.96 o al menos aproximadamente 0.97. La secuencia codificante se puede adaptar además para la expresión mejorada en la célula huésped de insecto por métodos descritos en WO 2004/059556, y modificando el contenido de CpG de la secuencia codificante como se describe en WO 2006/015789. Se entiende que tales adaptaciones adicionales pueden causar que no todos los codones en la secuencia de nucleótidos que codifica para la adaptación de aminoácidos común en la primera

secuencia de nucleótidos sean codones comunes.

[0036] En una forma de realización de invención, una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID n°: 1.

[0037] La invención también concierne a un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M de la invención como aquí se define aquí anteriormente. En el constructo de ácidos nucleicos la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M está preferiblemente enlazada operativamente a una secuencia de control de expresión compatible con células mamíferas, por ejemplo, un promotor, preferiblemente un promotor compatible con células mamíferas. Muchos de estos promotores se conocen en la técnica (véase Sambrook and Russel, 2001, *supra*). Los promotores constitutivos que son ampliamente expresados en muchos tipos de células, tales como el promotor CMV pueden ser utilizados. No obstante, serán más preferidos los promotores que son, inducibles, específicos de tejido, específico del tipo de célula, o específico de ciclo celular. En una forma de realización preferida una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M está enlazada operativamente a un promotor específico del hígado. Los promotores específicos del hígado son particularmente preferidos para el uso en la conjunción de la desaminasa no eritroidea.

[0038] Preferiblemente, en un constructo de la invención las secuencias de control de expresión para la expresión específica del hígado se seleccionan por ejemplo del grupo que consiste en un promotor α 1-anti-trypsin (AAT), un promotor de globulina fijadora de hormona tiroidea, un promotor de albúmina, un promotor de globulina fijadora de tiroxina (TBG), un promotor híbrido de la región de control hepática (HCR)-ApoCII, un promotor híbrido HCR-hAAT, un promotor AAT combinado con el elemento intensificador del gen de albúmina de ratón (Ealb) y un promotor de apolipoproteína E. Entre otros ejemplos se incluyen el promotor E2F para la expresión selectiva de tumor, y, en particular, la expresión selectiva de células neurológicas de tumor (Parr et al., 1997, Nat. Med. 3:1145-9) o el promotor IL-2 para el uso en células mononucleares de la sangre (Hagenbaugh et al., 1997, J Exp Med; 185: 2101-10). En una forma de realización particularmente preferida de la invención, el promotor puede tener la secuencia de SEC ID n°: 3. En otra forma de realización del constructo de ácidos nucleicos, una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M está enlazada operativamente a un promotor para la expresión en células humanas que no es un promotor de un gen AGXT, por ejemplo no es un promotor de un gen AGXT humano.

[0039] En otra forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos de la invención comprende una 3'-UTR (o secuencia no traducida 3') secuencia abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M. Las secuencias 3'-UTR adecuadas están disponibles para el experto en la materia. Se pueden derivar de cualquier gen de mamífero y preferiblemente humano y comprenderán normalmente un sitio de terminación de transcripción y una señal de poliadenilación (tal como por ejemplo AAUAAA o variantes de la misma). En una forma de realización particularmente preferida el constructo de ácidos nucleicos comprende una 3'-UTR derivada del gen de porfobilinógeno deaminasa humana tal como por ejemplo SEC ID n°: 4.

[0040] En otra forma de realización preferida del constructo de ácidos nucleicos de la invención, la secuencia de control de expresión que está enlazada operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M, está precedida secuencia arriba por un aislante poli-A para terminar la transcripción de repaso por posibles unidades de transcripción secuencia arriba. Una 3'-UTR como se ha descrito anteriormente e incluyendo preferiblemente al menos una secuencia de terminación de transcripción se puede utilizar para este propósito. Un aislante poli-A preferido es un aislante poli-A sintético con la secuencia de SEC ID n°: 5.

[0041] En una forma de realización preferida, el constructo de ácidos nucleicos de la invención comprende una secuencia de consenso Kozak alrededor del codón iniciador de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M.

[0042] La secuencia de consenso de Kozak se define aquí como GCCRCC(AUG)A (SEC ID n°: 6), donde R es una purina (es decir, A, adenosina o G, guanosina) y donde (AUG) representa el codón iniciador de la secuencia que codifica la proteína AGXT I340M. En una forma de realización preferida, la secuencia de consenso de Kozak puede estar precedida por otro triplete GCC.

[0043] La invención también proporciona un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M que está enlazada operativamente a una secuencia de control de expresión tal y como se define aquí anteriormente, donde el constructo es un vector de expresión que es conveniente para terapia genética de mamíferos, preferiblemente terapia genética de seres humanos. Un constructo de ácidos nucleicos preferido según la invención es un vector de terapia genética vírica. Los vectores de terapia genética víricos se conocen bien en la técnica e incluyen por ejemplo vectores basados en un adenovirus, un parvovirus tal como un virus adeno-asociado (AAV), un virus del herpes, un virus de sífilis y un retrovirus. Un vector de terapia genética vírica preferida es un AAV, vector adenoviral o un vector lentiviral.

[0044] Los vectores de terapia genética particularmente preferidos en el contexto de la presente invención son los vectores parvovirales. Así, en este aspecto preferido la invención se refiere el uso de parvovirus animales, en particular dependovirus tales como AAV infeccioso humano o símico, y sus componentes (p. ej., un genoma de parvovirus animal) para el uso como vectores para la introducción y/o expresión de las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína AGXT I340M en células mamíferas.

[0045] Los virus de la familia Parvoviridae son virus animales de ADN pequeño. La familia Parvoviridae se puede dividir en dos subfamilias: el Parvovirinae, que infectan vertebrados, y el Densovirinae, que infectan insectos. Los elementos de la subfamilia Parvovirinae son aquí denominados como los parvovirus e incluyen el género Dependovirus. Como se puede deducir del nombre de su género, los miembros del Dependovirus son únicos en que ellos normalmente requieren cocontagio con un virus auxiliar tal como adenovirus o virus del herpes para una infección productiva en el cultivo celular. El género Dependovirus incluye AAV, que infecta normalmente seres humanos (p. ej., serotipos 2, 3A, 3B, 5, y 6) o primates (p. ej., serotipos 1 e 4, que se piensa que se han originado de los simios, pero también infectan seres humanos), y virus relacionados que infectan otros animales de sangre caliente (p. ej., bovinos, caninos, equinos, y virus adeno-asociados de ovino).

[0046] Además la información sobre los serotipos AAV y las estrategias para diseñar vectores AAV híbridos derivados de serotipos AAV está descrita en Wu et al. (2006, Molecular Therapy 14:316-327). Convenientemente, la presente invención está ejemplificada posteriormente y descrita aquí por referencia a AAV. Es no obstante entendido que la invención no se limita a AAV pero puede ser igualmente aplicada a vectores AAV híbridos derivados de dos o más serotipos AAV diferentes y para otros parvovirus y híbridos del mismo.

[0047] La organización genómica de todos los serotipos AAV bien conocidos es muy similar. El genoma de AAV es una molécula de ADN lineal, de dos hebras, que es inferior a aproximadamente 5,000 nucleótidos (nt) de longitud. Las secuencias repetidoras terminales invertidas (ITR) flanquean las secuencias de nucleótidos de codificación única para las proteínas de replicación no estructural (Rep) y las proteínas estructurales (VP). Las proteínas de VP (VP1; -2 y -3) forman la cápsida. Los 145 nt terminales son autocomplementarios y están organizados de modo que un dúplex intramolecular energéticamente estable formando una horquilla en forma de T puede ser formado. Estas estructuras de horquilla actúan como origen para la replicación de ADN vírico, sirviendo como cebadores para el complejo de ADN polimerasa celular. Después de la infección por wtAAV en células mamíferas los genes Rep (es decir, Rep78 y Rep52) son expresados del promotor P5 y el promotor P19, respectivamente y ambas proteínas Rep tienen una función en la replicación del genoma vírico. Un evento de unión en el ORF Rep produce la expresión en efecto de cuatro proteínas Rep (es decir, Rep78; Rep68; Rep52 y Rep40). No obstante, se ha demostrado que el ARNm no empalmado, que codifica las proteínas Rep78 y Rep52, en células mamíferas son suficientes para producción del vector AAV. También en las células de insecto las proteínas Rep78 y Rep52 bastan para la producción del vector AAV.

[0048] Un "vector recombinante parviral o AAV" (o "vector rAAV") aquí se refiere a un vector que comprende una o más secuencias polinucleótidas de interés, genes de interés o "transgenes" que se flanquean por al menos una secuencia repetidora terminal invertida parvoviral o de AAV (ITR). Tales vectores rAAV se pueden replicar y empaquetar en partículas víricas infecciosas en caso de existir en una célula huésped de insecto que están expresando productos genéticos rep y cap AAV (es decir, proteínas Rep y Cap AAV). Cuando un vector rAAV se incorpora en un constructo de ácidos nucleicos más grande (p. ej. en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido o baculovirus usado para la clonación o la transfección), luego el vector rAAV es típicamente denominado como un "pro-vector" que puede ser "rescatado" por replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento AAV y funciones auxiliares necesarias.

[0049] Así, la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AGXT I340M como se define aquí anteriormente, donde el constructo de ácidos nucleicos es un vector recombinante parvoviral o vector AAV y así comprende al menos una ITR parvoviral o AAV. Preferiblemente, en el constructo de ácidos nucleicos la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína AGXT I340M se flanquea por ITRs parvovirales o de AAV en cada lado. Cualquier ITR parvoviral o de AAV se puede utilizar en los constructos de la invención, incluyendo ITRs de AAV1, AAV2, AAV4, y/o AAV5. Las ITRs de AAV2 son las más preferidas. Se dan ejemplos de secuencias ITR preferidas para el uso en constructos de ácidos nucleicos preferidos de la invención SEC ID n°: 7 (ITR izquierda o secuencia arriba) y SEC ID n°: 8 (ITR derecha o secuencia abajo).

[0050] AAV es capaz de infectar varias células mamíferas. Véase, por ejemplo, Tratschin et al. (1985, Mol. Cell Biol. 5:3251-3260) y Grimm et al. (1999, Hum. Gene Ther. 10:2445-2450). No obstante, el tropismo celular de AAV difiere entre serotipos. Véase, por ejemplo, Davidson et al. (2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:3428-3432), que analiza las diferencias entre AAV2, AAV4, y AAV5 en cuanto al tropismo celular del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos y la eficiencia de transducción y véase Goncalves, 2005, Virol J. 2(1):43 que analiza métodos para la modificación del tropismo AAV. Para la transducción de células de hígado viriones rAAV con proteínas cápsidas AAV1, AAV8 y AAV5 son preferidas (Nathwani et

al., 2007, Blood 109(4): 1414-1421 ; Kitajima et al., 2006, Atherosclerosis 186(1):65-73), de las cuales es viriones rAAV con AAV5 u 8 proteínas cápsidas son más preferidas.

[0051] Las secuencias AAV que se pueden utilizar en la presente invención para la producción de vectores AAV recombinantes en células de insecto se pueden derivar del genoma de cualquier serotipo AAV. Generalmente, los serotipos AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa a nivel de aminoácido y de ácido nucleico, proporcionan un conjunto idéntico de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente físicamente y funcionalmente equivalentes, y se replican y ensamblan por mecanismos prácticamente idénticos. Para la secuencia genómica de los varios serotipos AAV y una visión de conjunto de las similitudes genómicas véase por ejemplo GenBank Accession number U89790 ; GenBank Accession number J01901 ; GenBank Accession number AF043303 ; GenBank Accession number AF085716 ; Chlorini et al. (1997, J. Vir. 71: 6823-33); Srivastava et al. (1983, J. Vir. 45:555-64); Chlorini et al. (1999, J. Vir. 73:1309-1319); Rutledge et al. (1998, J. Vir. 72: 309-319); y Wu et al. (2000, J. Vir. 74: 8635-47). Serotipos AAV 1, 2, 3, 4 y 5 son fuentes preferidas de secuencias de nucleótidos AAV para uso en el contexto de la presente invención. Preferiblemente las secuencias ITR de AAV para el uso en el contexto de la presente invención son derivadas de AAV1, AAV2, y/o AAV4. Asimismo, el las secuencias de codificación Rep (Rep78/68 y Rep52/40) son preferiblemente derivadas de AAV1, AAV2, y/o AAV4. Las secuencias que codifican las proteínas cápsidas VP1, VP2, y VP3 para el uso en el contexto de la presente invención pueden no obstante ser tomadas de cualquiera de los 42 serotipos conocidos, más preferiblemente de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 o de las recientemente desarrolladas partículas tipo AAV obtenidas por, por ejemplo, técnicas de redistribución de cápsida y bibliotecas de cápsida AAV.

[0052] Las secuencias Rep e ITR de AAV están particularmente conservadas entre la mayoría de serotipos. Las proteínas Rep78 de varios serotipos AAV son por ejemplo más de un 89% idénticas y la identidad de la secuencia de nucleótidos total a nivel de genoma entre AAV2; AAV3A, AAV3B, y AAV6 es de alrededor del 82% (Bantel-Schaal et al., 1999, J. Virol., 73(2):939-947). Además, se conoce que las secuencias Rep e ITRs de muchos serotipos AAV se complementan eficazmente de forma cruzada (es decir, sustituyen funcionalmente) secuencias correspondientes de otros serotipos en la producción de partículas AAV en células mamíferas. US2003148506 informa de que las secuencias Rep AAV e ITRs también complementan de forma cruzada eficazmente otras secuencias Rep e ITR en las células de insecto.

[0053] Se conoce que las proteínas VP de AAV determinan el tropismo celular del virión AAV. Las secuencias de codificación de la proteína VP están significativamente menos conservadas que las proteínas Rep y los genes entre diferentes serotipos AAV. La capacidad de las secuencias Rep e ITR para complementar de forma cruzada secuencias correspondientes de otros serotipos permite la producción de partículas rAAV pseudotipadas que comprenden las proteínas cápsidas de un serotipo (por ejemplo; AAV5) y las secuencias Rep y/o ITR de otro serotipo AAV (p. ej., AAV2). Tales partículas rAAV pseudotipadas son una parte de la presente invención.

[0054] Las secuencias modificadas "AAV" también se pueden usar en el contexto de la presente invención, por ejemplo para la producción de vectores rAAV en las células de insecto. Tales secuencias modificadas por ejemplo incluyen secuencias con al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95%, o más de identidad en la secuencia de nucleótidos y/o de aminoácidos (p. ej., una secuencia con aproximadamente un 75-99% de identidad en la secuencia de nucleótidos) con una ITR, Rep o VP de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 se puede usar en lugar de las secuencias ITR, AAV, Rep o VP de tipo salvaje.

[0055] Aunque similar a los otros serotipos AAV en muchos aspectos, AAV5 difiere de otros serotipos AAV humanos y símicos más que otros serotipos humanos y símicos conocidos. En vista de lo mismo, la producción de rAAV5 puede diferir de la producción de otros serotipos en las células de insecto. Donde se emplean métodos de la invención para producir AAV5, se prefiere que uno o más constructos comprendiendo, colectivamente en el caso más de un constructo, una secuencia de nucleótidos que incluye una ITR AAV5, una secuencia de nucleótidos comprenda una secuencia codificante Rep AAV5 (es decir, una secuencia de nucleótidos comprende una Rep78 AAV5). Tales secuencias ITR y Rep se pueden modificar a voluntad para obtener una producción eficaz de vectores rAAV5 o rAAV5 pseudotipados en las células de insecto. Por ejemplo, el codón de inicio de las secuencias Rep puede ser modificado, los sitios de empalme de VP se pueden modificar o eliminar, y/o el codón de inicio VP1 y los nucleótidos cercanos se pueden modificar para mejorar la producción de vectores rAAV5 en la célula de insecto.

[0056] Si se usa un vector adenoviral en la invención, un vector adenoviral preferido se puede modificar para reducir la respuesta del huésped como ha sido revisado por Russell (2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-2604), or as described in US20080008690 and by Zaldumbide and Hoeben (Gene Therapy 2008:239-246).

[0057] La invención así se refiere a un virión parvoviral que comprende un constructo de ácidos nucleicos como se define aquí anteriormente, y una proteína cápsida parvoviral tal y como se define aquí anteriormente.

[0058] La invención también proporciona un método para producir un virión recombinante parvoviral (rAAV) (que comprende un vector recombinante parvoviral (rAAV) tal como se ha definido anteriormente) en una célula de insecto. Preferiblemente, el método comprende los pasos de: (a) cultivar una célula de insecto como se define aquí anteriormente bajo unas condiciones de manera que el vector recombinante parvoviral (rAAV) es producido; y, (b) recuperar el vector recombinante parvoviral (rAAV). Se entiende aquí que el vector recombinante parvoviral (rAAV) producido en el método es preferiblemente un virión infeccioso parvoviral o AAV que comprende los ácidos nucleicos del vector recombinante parvoviral (rAAV). Las condiciones de crecimiento para células de insecto en el cultivo, y la producción de productos heterólogos en las células de insecto en el cultivo son bien conocidos en la técnica y están descritas por ejemplo en las referencias citadas anteriormente en el diseño molecular de células de insectos. Los métodos preferidos y constructos para la producción de viriones rAAV de la invención están descritos en por ejemplo WO2007/046703 y WO2007/148971.

[0059] Preferiblemente los métodos para producir viriones recombinantes parvovirales comprenden además el paso de purificación por afinidad del (viriones comprendiendo el) vector recombinante parvoviral (rAAV) utilizando un anticuerpo anti-AAV, preferiblemente un anticuerpo inmovilizado. El anticuerpo anti-AAV es preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Un anticuerpo especialmente adecuado es un anticuerpo camélido de cadena única o un fragmento del mismo como por ejemplo obtenible de camellos o llamas (ver por ejemplo Muyldermans, 2001, *Biotechnol.* 74: 277-302). El anticuerpo para la purificación por afinidad de rAAV es preferiblemente un anticuerpo que se enlaza específicamente a un epítipo en una proteína cápsida AAV, por la cual preferiblemente el epítipo es un epítipo que está presente en la proteína cápsida de más de un serotipo AAV. Por ejemplo el anticuerpo se puede crecer o seleccionar basándose en la unión específica a la cápsida AAV2 pero al mismo tiempo también se puede enlazar específicamente a las cápsidas AAV1, AAV3 y AAV5.

[0060] La invención concierne además a un agente terapéutico AGXT I340M para el uso como un medicamento o para el uso en un método de tratamiento. El agente terapéutico AGXT I340M para el uso como un medicamento puede ser una proteína AGXT I340M o una molécula de ácido nucleico como se ha definido aquí anteriormente, o un virión de un vector de terapia genética, tal como por ejemplo un virión parvoviral tal como se ha definido anteriormente.

[0061] También, la invención concierne a un agente terapéutico AGXT I340M como se define aquí para el uso en el tratamiento de una condición que responde a AGXT.

[0062] Una condición que responde a AGXT puede ser una condición provocada por una deficiencia (por ejemplo una deficiencia parcial o deficiencia completa (o deficiencia sustancialmente completa)) de alanina glioxilato aminotransferasa. Una deficiencia de alanina glioxilato aminotransferasa pretende incluir la ausencia, (parcial completa o sustancialmente completa) o ubicación subcelular equivocada de la alanina glioxilato aminotransferasa. La deficiencia de AGXT conduce a una enfermedad denominada hiperoxaluria primaria de tipo I, que se denomina también oxalosis I, aciduria glicólica, deficiencia de alanina glioxilato aminotransferasa, y deficiencia de alanina glioxilato aminotransferasa peroxisomal y/o hepática. Por consiguiente, la invención concierne al tratamiento de la hiperoxaluria primaria tipo I. El tratamiento según la invención incluye el tratamiento de uno o más síntomas, tal como la mejora de lo mismos, de tal indicación.

[0063] La invención también concierne a una composición farmacéutica que incluye un agente terapéutico AGXT I340M, un constructo de ácidos nucleicos o un virión parvoviral como se define aquí anteriormente. La composición farmacéutica además comprende preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable. Cualquier portador farmacéuticamente aceptable adecuado o excipiente se puede usar en las presentes composiciones (véase por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Alfonso R Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997).

[0064] Las formas farmacéuticas preferidas estarían en combinación con una solución salina estéril, una solución de dextrosa, o una solución tamponada, u otros fluidos estériles farmacéuticamente aceptables. Alternativamente, un soporte sólido, se puede utilizar tal como, por ejemplo, microesferas de microsoporte.

[0065] También, la invención proporciona un método para tratar una condición que responde a AGXT donde el método comprende el paso de la administración de una cantidad eficaz de un agente terapéutico AGXT I340M, un constructo de ácidos nucleicos, un virión parvoviral o una composición farmacéutica tal y como se define aquí a un sujeto con la condición que responde a AGX. La condición que responde a AGXT puede ser una deficiencia de alanina glioxilato aminotransferasa tal como por ejemplo hiperoxaluria primaria de tipo I.

[0066] Además, la relación de invención para usar un agente terapéutico AGXT I340M, un constructo de ácidos nucleicos, un virión parvoviral o una composición farmacéutica tal y como se define aquí en la producción de un medicamento para uso en el tratamiento de una condición que responde a AGXT.

[0067] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los elementos después de la palabra están incluidos, pero los elementos no mencionados específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" no excluye la

posibilidad de que más de uno del elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que allí haya uno y sólo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" así normalmente significa "al menos uno".

[0068] Los siguientes ejemplos se ofrecen para uso ilustrativo sólo, y no se destinan a limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplos

1. Ejemplo 1

[0069] El ADNc de AGXT humano de tipo salvaje y diferentes alelos mayores y menores y la combinación de los mismos fueron expresados con marcadores de histidina en el E. coli (Top 10, Invitrogen). Las proteínas AGXT expresadas fueron purificadas por cromatografía de afinidad de metal según procedimientos estándar.

[0070] La proteína purificada fue sometida a análisis SDS/PAGE y a ensayos de actividad de alanina glioxilato aminotransferasa (Rumsby et al., Ann Clin Biochem. 1997 Jul;34 (Pt 4):400-4.). Los valores medios de la actividad (umoles/h/g proteína total) de las proteínas AGXT como están expresadas en el E. coli se dan en la tabla 1.

[0071] Tabla 1. Valores medios de actividad (umoles/h/g proteína total) de las proteínas AGXT como están expresadas en E.coli. pTrcHis = vector vacío, pTrcHisAGXT*WT = AGXT de tipo salvaje (Genbank Acc. No. NM_000030); T indica el alelo I244T; M indica el alelo I340M; *L indica el alelo P11L; y R indica el alelo G170R.

Combinaciones de estas letras indican proteínas con las sustituciones de aminoácidos correspondientes en una proteína.

CONSTRUCTO	ACTIVIDAD MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
pTrcHis (Top10)	0.370	0.169
pTrcHisAGXT*WT	36.351	11.735
pTrcHisAGXT*T	26.517	3.636
pTrcHisAGXT*M	45.920	8.399
pTrcHisAGXT*L	12.489	2.694
pTrcHisAGXT*LM	21.255	4.016
pTrcHisAGXT*LR	2.122	0.534
pTrcHisAGXT*LRM	8.617	1.289
pTrcHisAGXT*LT	0.923	0.319
pTrcHisAGXT*LTM	3.562	0.811

[0072] P11L es suficiente para promover una reducción significativa en la actividad. Así, el efecto de las mutaciones depende significativamente de los antecedentes alélicos. Tanto G170R como I244T, en el haplotipo menor, suponen una reducción significativa de actividad. El polimorfismo I340M, en caso de existir en combinación con cualquier mutación, produce mejor actividad residual. La expresión de AGXT de tipo salvaje con I340M (una variante raramente vista en la población general) produce una actividad significativamente más alta que el alelo mayor más común.

2. Ejemplo 2

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Experimentos animales, análisis de orina y sanguíneo

[0073] Todos experimentos animales fueron aprobados por el comité institucional de ética de experimentación animal, y realizado según las leyes españolas y europeas. Ratones B6;129SvAgxt^{tm1Ull} fueron genotipados como se describe [Salido et al. PNAS 2006;103(48):18249-54. PMID: 17110443], criados y mantenidos en una instalación libre de patógenos, con libre acceso al alimento estándar (A04, Safe, France) y agua. Los ratones fueron colocados en jaulas metabólicas para un único ratón (modelo 3600M, Tecniplast) y se permite que se aclimaten y se habitúen a una dieta en polvo de - 4 g/día, sin oxalato (con <0.4 µmol/g oxalato, 0.5% Ca²⁺, y 0.25% Mg²⁺ (Harlan TD#01699, Indianapolis, Ind., USA,) durante 3 días antes del inicio de la recogida de orina. Dos recogidas de orina de 24 hr se realizaron cada semana en tubos estrechos conteniendo 50 µl 6 N HCl. El ensayo de oxalato-oxidasa (<http://www.greiner-diagnostic.com>) fue utilizado para las medidas de oxalato en orina, mientras que la prueba de picrato alcalino de Jaffe fue usada para medir creatinina en orina. Muestras de orina de veinticuatro horas que fueron <1 ml para ratones de 3 meses de edad fueron típicamente vistas en jaulas con signos de recogida de orina incompleta, y fueron excluidas del estudio. De forma similar, muestras con alimento o contaminación fecal fueron excluidas. Al final del estudio, los ratones fueron sacrificados, y la sangre fue recogida para el análisis bioquímico. Creatinina de suero, BUN, GOT y GPT fueron medidos en un autoanalizador (A25, Biosystems, Spain). Muestras de suero

fueron también usadas, diluidas 1:100 en PBS, en el análisis de Western blot de proteína AGTX recombinante humana, para controlar la presencia de anticuerpos de ratón anti-AGXT.

[0074] Las muestras de hígado fueron cosechadas para la histología, el ensayo enzimático, y el análisis Northern y Western blot. Las muestras de riñón fueron recogidas para el análisis histológico. Cinco machos fueron seleccionados para un estudio histológico más extensivo que incluye cerebro, pulmón, corazón, estómago, hígado, bazo, páncreas, riñón, testículo y vesícula seminal. El ADN y la proteína fueron también extraídos de estos tejidos.

[0075] Para los experimentos de terapia genética, ratones de 12-16 semanas de edad fueron sujetos e inyectados en la vena de la cola utilizando una jeringa de 1 ml con una aguja 27G. Partículas AAV fueron disueltas en una disolución de sacarosa al 5% en PBS.

2.1.2 Análisis histológico

[0076] Los tejidos fueron fijados en un 4% de paraformaldehído tamponado y bien introducidos en parafina o bien crioprotectados en un 20% de sacarosa y congelados rápidamente en el nitrógeno líquido. Se hizo una tinción de hematoxilina y de eosina en todos tejidos, y una tinción de oxalato de calcio (Yasue, 1969 Acta Histochemica et Cytochemica 2:83-95) fue realizada en las secciones de riñón. Secciones de riñón de un paciente PH1 con nefrocalcinosis fueron usadas como control positivo para la tinción de oxalato de calcio. Para medir los depósitos, dos secciones aleatorias teñidas para CaOx se representaron digitalmente y se procesaron con software de análisis de imagen (ImagePro). El umbral para áreas positivas fue establecido automáticamente, y el área de los depósitos fue expresada como un porcentaje del área digitalizada total.

2.1.3 Ensayo enzimático AGT, Western blot e inmunohistoquímica

[0077] La actividad AGT y el análisis Western blot fueron determinados como se describe [Salido et al. PNAS 2006;103(48): 18249-54. PMID: 17110443]. La inmunohistoquímica se llevó a cabo en secciones congeladas, incubando con anticuerpo de conejo anti-AGXT humano 1:5000 (una donación de Dr. C. Danpure) durante 2 hrs, seguidos de 5 min. Lavados con PBS, 3 veces, y suero de anti-conejo conjugado-HRP (Dako), durante 30 min. después otros 3 lavados con PBS, una solución de DAB-H₂O₂ se utilizó como cromógeno, y algunas secciones fueron contrateñidas con hematoxilina. Las secciones de control fueron también tintadas con anticuerpos anti-GS 1:5000 (Santa Cruz Biotechnologies) para marcar las zonas perivenulares.

2.1.4 Construcción de AAV recombinante, producción y análisis de ADN

[0078] Los plásmidos AAV usados en este estudio contienen el cassette de expresión flanqueado por dos ITRs del AAV2 y una secuencia de relleno apropiada para ajustar el tamaño del genoma a la capacidad de empaquetamiento óptima descrita para AAV. El cassette de expresión tiene los siguientes elementos: la 5'-ITR de AAV2, un promotor específico del hígado EalbAATp con secuencias reguladoras del intensificador de albúmina (Kramer et al., 2003, Mol Ther. 7(3):375-85), bien ADNc AGXT humano (que codifica la variante AGXT I340M - SEC ID n°: 2) o bien DNAc GFP mejorado, la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), y la 3'-ITR de AAV2. Cassetes de expresión similares se hicieron también sin la secuencia WPRE. Los cuatro plásmidos AAV usados en este estudio son nombrados ssAAV-EalbAAT-AGT-poliA-WPRE, ssAAV-EalbAAT-AGT-poliA (expresando el gen terapéutico), ssAAV-EalbAAT-GFP-poliA-WPRE y ssAAV-EalbAAT-GFP-poliA (expresando el gen reportero eGFP).

[0079] Los vectores AAV2/8 fueron producidos por co-transfección mediada por fosfato de calcio en 293 células de tres plásmidos diferentes pAdDeltaF6, p5E18-VD2/8 y el agente terapéutico (AAV-poliA-EalbAAT-AGT-WPRE) o gen reportero (AAV-poliA-EalbAAT-GFP-WPRE), (Hermens et al, 1999, Human Gene Therapy, 10:1885-91 and Gao et al 2002, Proc Natl Acad Sci USA 99:11854-9). De forma similar, los vectores AAV2/5 fueron producidos en cambio usando p5E18-VD2/5. Brevemente, 293 células fueron co-transfectadas con pAdDeltaF6, bien p5E18-VD2/8 o bien p5E18-VD2/5, y el vector objetivo por fosfato cálcico y el virus fue cosechado por un proceso de hielo y deshielo de las células, 48h después de la transfección. El virus fue purificado por cromatografía en columna de intercambio iónico y centrifugado con gradiente de iodixanol seguido de filtración y además concentración contra una solución salina tamponada de fosfato (PBS) al 5% de sacarosa. Los títulos de virus en cuanto a copias de genoma/ml fueron determinados por Q-PCR realizados por triplicado, utilizando protocolos TaqMan (Applied Biosystems), y cebadores pr300fw (5'-CCCTGTTTGCTCCTCCGATAA-3') y pr301rv (5'-GTCCGTATTAAGCAGTGGATCCA-3'), que amplifican un fragmento de 95 de pares de bases de la región promotora hAAT. La composición de la proteína y la pureza fue determinada por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

[0080] El número de genomas de vector AAV por célula de distintos tejidos fue determinado por análisis PCR en tiempo real con cebadores correspondientes a las secuencias AGXT y WPRE. El ADN genómico de distintos tejidos de ratón (hígado,

corazón, cerebro, riñón, pulmón, bazo, testículo y vesícula seminal) fue aislado por tratamiento de proteinasa K y extracción con fenol. Aproximadamente 100 ng de ADN genómico fueron usados como modelo para PCR. Diluciones del plásmido de vector rAAV fueron usadas para generar una curva estándar para la determinación de copias del genoma del vector.

5 2.2 Resultados y discusión

[0081] Los vectores rAAV fueron construidos por inserción del ADNc AGXT humano en un plásmido de vector AAV2, bajo el control de un promotor híbrido específico de hígado EalbAAT. Los ADNcs fueron seguidos por una señal de poliadenilación bGH y, en algunos constructos, un elemento regulador postranscripcional WPRE (Figura 1).

[0082] El cassette de expresión fue flanqueado por las secuencias repetidoras terminales invertidas de AAV2. Los vectores AAV2/8 y AAV2/5 fueron producidos por co-transfección mediada por fosfato de calcio en 293 células de tres plásmidos diferentes pAdDeltaF6, bien p5E18-VD2/8 o bien p5E18-VD2/5 y el agente terapéutico (bien AAV- EalbAAT-AGT- poliA-WPRE o bien AAV- EalbAAT-AGT- poliA) o el gen indicador (bien AAV- EalbAAT-GFP- poliA-WPRE o bien AAV- EalbAAT-GFP- poliA), (Hermens et al, 1999 and Gao et al, 2002 Proc Natl Acad Sci USA 99:11854-9).

[0083] En una primera serie de experimentos, utilizamos vectores AAV8 en dosis de 5×10^{12} partículas víricas/kg de peso corporal, con el objetivo de transducir la mayor parte de los hepatocitos, en ratones macho Agxt1KO (n= 10 animales por grupo). Nuestro objetivo era una corrección prolongada de la hiperoxaluria en un periodo de seguimiento de 50 días. Además, deseábamos probar la reserva funcional proporcionada por la transferencia genética después de una prueba de desafío con etilenglicol, un precursor de glioxilato.

[0084] Los ratones fueron colocados en jaulas metabólicas, alimentados con una dieta sin oxalato y agua ad-libitum, y se permitió que se ajustaran durante 3 días. La excreción de oxalato basal fue medida en orina a 24 hr., recogida en tubos acidificados, utilizando un equipo basado en oxalato oxidasa. La concentración de creatinina fue también medida por el método del ácido pícrico alcalino. La excreción media de oxalato diario fue 2.06 ± 0.74 $\mu\text{mols}/24\text{hrs}$. Preparaciones purificadas, de titulación alta ($1.7\text{-}6.3 \times 10^{11}$ partículas víricas / ml) de vectores rAAV2-AGXT-2/8 fueron administradas a ratones adultos Agxt1KO, de 12-16 semanas de edad, por inyecciones individuales en la vena de la cola en dosis de 5×10^{12} partículas virales/kg peso corporal, en 0.2 ml de sacarosa en PBS. Un grupo adicional de 5 machos $\text{Agxt}^{+/+}$, no inyectados con ningún vector, fueron usados como control normal.

[0085] La excreción de oxalato en orina fue seguida durante un periodo de observación total de 50 días, la Figura 2 muestra la excreción media de oxalato para animales inyectados bien con el vector de expresión de ADNc de AGXT humano o bien con el control de expresión de GFP. Durante las dos primeras semanas del estudio, los ratones fueron sometidos a una prueba de desafío con 0.25 ml de etilenglicol (EG) 0.5M en tres ocasiones, por alimentación forzada, para seguir la respuesta a una sobrecarga discreta del ciclo del glioxilato. Tanto la oxaluria basal como el aumento en los niveles de oxalato después de la administración del precursor de glioxilato (EG) fueron significativamente inferiores en el grupo tratado, en comparación con los controles, como se resalta después de tan sólo 6 días post-inyección, bajando los niveles de oxalato en orina en animales tratados 4 semanas después de la inyección hasta el rango normalmente observado en los ratones de tipo salvaje (0.37 ± 0.11 vs. 0.31 ± 0.13 $\mu\text{mols}/24\text{hr}$, respectivamente, $p=0.028$).

[0086] La respuesta a la administración de 0,25 ml de etilenglicol 0,5M fue significativamente menguada en ratones tratados con AGXT-AAV8 en comparación con aquellos que recibieron GFP-AAV8 ($0,34 \pm 0,37$ $\mu\text{mol}/24\text{hrs}$ vs. $1,24 \pm 0,57$ $\mu\text{mol}/24\text{hrs}$, respectivamente, $p= 0,001$). Después de 4 semanas, un 0.5% de EG fue incluido en el agua potable, y el aumento en la excreción de oxalato fue significativamente menor en animales tratados con AGXT-AAV8 que en los controles inyectados con GFP-AAV8 (aumento de 0.18 ± 0.34 vs. 2.11 ± 1.31 $\mu\text{mols}/24\text{hr}$, respectivamente, $p < 0.001$) e incluso más pequeño que en los ratones de tipo salvaje sometidos a la misma prueba de desafío (0.50 ± 0.21 $\mu\text{mols}/24\text{hr}$, $p= 0.005$). Estos datos concuerdan con la inyección de AGXT-AAV8 explicando una reserva funcional más grande en ratones tratados que incluso en animales de tipo salvaje. Durante las dos últimas semanas del experimento, los ratones fueron sometidos a un 0.7% de EG en el agua potable, que dio como resultado un aumento de oxaluria significativamente menor en animales tratados con AGXT-AAV8 que en controles inyectados con GFP-AAV8 (aumento de 0.54 ± 0.56 vs. 2.46 ± 0.7 $\mu\text{mols}/24\text{hr}$, respectivamente, $p=0.000$), una diferencia que no es significativamente diferente de la observada en los controles de tipo salvaje que bebieron un 0.7% de etilenglicol (aumento de 0.92 ± 0.33 , $p=0.06$).

[0087] Durante el periodo de estudio, tres animales en el grupo de control murieron con hallazgo patológico de nefrocalcinosis (véase abajo). Ninguno de los ratones tratados con AAV8-AGXT murió. Al final de la séptima semana de estudio, los ratones fueron sacrificados y los tejidos y la sangre fueron recogidos. Todos riñones de los ratones inyectados con AAV8-GFP, pero ninguno de los ratones que recibieron AAV8-AGXT, mostraban algún grado de nefrocalcinosis al final del estudio. Cuatro ratones mostraron pocos depósitos de oxalato de calcio (CaOx) en la región medular sólo; tres ratones presentaron moderados depósitos de CaOx en el córtex y médula; y en los tres ratones que murieron hubo nefrocalcinosis severa y difundida. No se pudo obtener plasma de los ratones que murieron prematuramente, pero las concentraciones de

nitrógeno ureico en sangre (BUN) fueron significativamente elevadas entre los restantes siete ratones tratados AAV8-BUN en comparación con aquellos que recibieron AAV8-AGXT (26.7±9.9 vs 19.1±1-3 mg/dl, respectivamente, p=0.04).

[0088] La actividad de la enzima hepática AGT y proteína, fueron determinadas por análisis Western blot e inmunohistoquímica, en todos los animales sacrificados al final de la séptima semana después de la inyección. La actividad de AGT fue significativamente más alta en ratones *Agxt^{fl}* inyectados con AGXT-AAV2/8 que en los controles GFP-AAV2/8 (24,9±10,6 vs. 4,1±1,5 nmol/min*mg proteína, p=0,002). La actividad residual significativa está presente en los extractos de hígado de animales *Agxt^{fl}*, principalmente con alanina como un sustrato (actividad AGT), pero también cuando la serina fue usada como un sustrato (actividad SGT actividad) [Salido et al. "Alanine-glyoxylate aminotransferase-deficient mice, a model for primary hyperoxaluria that responds to adenoviral gene transfer." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 103.48 (2006): 18249-54].

[0089] Los análisis Western blot de proteína AGT en el hígado, como se muestra en la Figura 3a, revelaron una expresión robusta de AGT en ratones tratados con rAAV- (líneas 2 a 10) en comparación con el tipo salvaje (línea 1) mientras que ninguna proteína pudo ser detectada en los ratones control *Agxt1KO* tratados con GFP-AAV2/8.

[0090] Los índices de transducción y expresión de AGXT-AAV2/8 en diferentes tejidos de animales tratados fue determinado por análisis Western blot. El cerebro, el pulmón, el bazo, el riñón, las vesículas seminales y los testículos no contenían proteína AGT detectable, pero muestras del corazón mostraron consistentemente bajos niveles de proteína AGT proteína, evidentes después de exposiciones más largas de película (datos no mostrados). La presencia de ADN de AGXT-AAV2/8 en varios tejidos fue evaluada por PCR, utilizando cebadores que se unen a la región 3' de la secuencia codificante de AGXT y la secuencia WPRE. Se hicieron curvas estándar con plásmidos AGXT-AAV8 y de interleucina 2 de ratón (mIL2), y las variaciones en la cantidad de ADN plantilla fueron corregidas aplicando amplificaciones paralelas del gen mIL2. En hígados de ratones tratados con AGXT-AAV8, encontramos 899±74 copias de vector por genoma diploide con el análisis de PCR en tiempo real. La estimación del número de copias de vector por genoma de ratón en otros tejidos fue: 4.4±0.8 (riñón), 1.6±0.6 (pulmón), 0.7±0.1 (bazo), 1.3±0.1 (testículos), y 3.3±0.6 (corazón). Así, dos meses después de la inyección de 5×10^{12} partículas víricas por ratón, se detectan cerca de mil copias de rAAV por hepatocito transducido, similar a lo que otros han declarado para este tipo de vectores [Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, Kay MA: Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. J Virol. 2005 79(1):214-24 .PMID: 15596817].

[0091] Por inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo de conejo anti-AGT, podrían observarse diferencias sorprendentes entre hígados de ratones *Agxt1KO* tratados con bien AGXT-AAV2/8 o bien GFP-AAV2/8 (Figura 3b). De hecho, la mayor parte de los hepatocitos de ratones inyectados con partículas AGXT-AAV2/8 han mostrado algún grado de inmunocolocación, con patrón granuloso citoplásmico característico (Figura 3c) mientras que ninguna tinción de AGT fue observada en los ratones de control inyectados con eGFP-AAV2/8, que, recíprocamente, mostraron una fluorescencia verde abundante en las secciones de tejido de hígado bajo el microscopio UV (no mostrado).

[0092] Los cultivos primarios de hepatocitos aislados, realizados en un ratón de cada grupo, se utilizaron para averiguar la localización subcelular de la proteína AGT expresada por microscopía confocal (datos no mostrados). Una intensa inmuofluorescencia AGT fue observada en los peroxisomas de los hepatocitos tratados con AGXT-AAV2/8, que muestra colocalización con la proteína peroxisomal PMP70, pero no con el marcador mitocondrial (mitotracker).

[0093] Las transaminasas del suero (alanina aminotransferasa ALT/GPT y aspartato aminotransferasa AST/GOT) no eran elevadas (58,7±6,2 y 39±6,9 U/L, vs. 56,3±10,8 y 37,9±4,1 U/L, respectivamente, en ratones no tratados), y ninguna lesión del hígado fue detectada en las secciones H&E. Esto está de acuerdo con la ausencia de daño en el hígado o toxicidad declarada por otros que utilizan este tipo de vector rAAV en dosis similares [Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, Kay MA: Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice. J Virol. 2005 79(1):214-24 .PMID: 15596817], [Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, Russell DW, Chamberlain JS: Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. Nat Med. 2004 Aug;10(8):828-34. Epub 2004 Jul 25 . PMID: 15273747]. Además, no hemos detectado ningún título significativo de anticuerpo de AGXT, por análisis Western blot, en las muestras de suero de ratones tratados con AGXT-AAV2/8.

[0094] Inspeccionamos cuidadosamente todos los hígados de nuestros ratones, incluyendo análisis histológico, y no encontramos ninguna evidencia de oncogénesis después 50 días de seguimiento, de acuerdo con un gran estudio a largo plazo que no encontró ninguna evidencia de tumorigénesis en ratones tratados con AAV [Bell et al. "No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice." Mol.Ther. 12.2 (2005): 299-306].

[0095] Estudios precedentes han mostrado que AAV5 es un vector mejor para la transducción de hígado humano. En un segundo grupo de experimentos, utilizamos diferentes dosis de vectores AAV5, desprovistos de la secuencia WPRE, a bien 1.5×10^{13} , 5×10^{12} , o 5×10^{11} partículas víricas /kg peso corporal, y vectores AAV8, con WPRE, a 5×10^{12} partículas víricas / kg, en ratones *Agxt1KO* tanto hembras como machos (n= 5 animales por grupo). El objetivo de este conjunto de experimentos

fue comparar el efecto de la transferencia genética con AAV5 con respecto a los resultados conseguidos con el serotipo capaz de llevar a cabo la transducción de la mayoría de hepatocitos en ratones, concretamente AAV8. También deseábamos evaluar las posibles diferencias de género en la respuesta. Los ratones Agxt1KO fueron colocados en jaulas metabólicas, alimentados con una dieta sin oxalato y agua ad-libitum, y se permitió que se ajustaran durante 3 días, y la excreción de oxalato fue medida en la orina de 24 hr.

[0096] Preparaciones purificadas de titulación alta ($4.5\text{-}10 \times 10^{11}$ partículas víricas/ml) de vectores rAAV2-AGXT-2/5 y -2/8, al igual que vectores rAAV2-eGFP-2/5, fueron administradas a ratones adultos Agxt1KO, de 12-16 semanas de edad, por inyecciones únicas en la vena de la cola en 0.2-0.3 ml de sacarosa en PBS.

[0097] La excreción de oxalato en orina fue seguida durante un periodo de observación total de 35 días, la Figura 4 muestra la excreción media de oxalato para animales inyectados con vector de expresión de ADNc de AGXT humano o el control de expresión de GFP, a varias dosis de AAV5. Todas las dosis de vector AGXT evaluadas indujeron una reducción significativa de excreción de oxalato, en comparación con los controles de GFP. Durante la última semana del estudio, ratones macho fueron sometidos a pruebas de desafío con un 0.5% de etilenglicol (EG) en el agua potable, para seguir la respuesta a una sobrecarga del ciclo de glioxilato. Los aumentos en la excreción de oxalato después de la administración del precursor de glioxilato fueron significativamente inferiores en los grupos que recibieron AGXT-AAV8 ($0.44 \pm 0.49 \mu\text{mol}/24\text{hrs}$) y la dosis máxima de AGXT-AAV5 ($1.41 \pm 1.09 \mu\text{mol}/24\text{hrs}$) que en aquellos inyectados con GFP-AAV5 ($4.49 \pm 1.41 \mu\text{mol}/24\text{hrs}$) ($p=0.008$ en ambas comparaciones por parejas). Por otro lado, los aumentos en la excreción de oxalato siguientes a la administración después de la prueba de desafío de ratones que recibieron AGXT-AAV8 y la dosis máxima de AGXT-AAV5 no eran significativamente diferentes de aquellos observados en los ratones de tipo salvaje ($0.55 \pm 0.24 \mu\text{mol}/24\text{hrs}$).

[0098] Estos resultados concuerdan con el análisis de expresión de AGXT en el hígado al final del estudio. Tanto la actividad AGT como el análisis Western blot mostraron niveles más altos de expresión cuando se usan vectores AAV8, en comparación con vectores AAV5, tanto en machos como en hembras. Sin embargo, los niveles de expresión conseguidos con 1.5×10^{13} AAV5 partículas / Kg peso corporal fueron consistentemente superiores a aquellos observados en los ratones de tipo salvaje. Dosis inferiores (5×10^{12} y 5×10^{11} AAV5 partículas / kg) todavía tuvieron como resultado una expresión significativa de AGT en hígados de machos, mientras que estas dosis resultaron en una señal relativamente-baja en hígados de hembra.

[0099] Se obtuvieron resultados paralelos por tinción inmunohistoquímica de secciones de hígado congelado, con porcentajes de hepatocitos transducidos alrededor de un 90% para AAV8 y la dosis máxima de AAV5, un 60% para 5×10^{12} partículas de AAV5/kg, y hasta un 10% (y menos de un 1% en hembras) para 5×10^{11} partículas de AAV5/kg (Fig. 3d).

[0100] Nuestros experimentos establecen que la transferencia genética con vectores capaces de llevar a cabo la transducción de una proporción grande de hepatocitos, tales como AAV2/8 y rAAV2/5, es una terapia nueva prometedora para la hiperoxaluria primaria de tipo I. En este tipo de enfermedad, donde los hepatocitos no transducidos continuarían produciendo oxalato, el objetivo terapéutico puede sólo ser conseguido si suficientes hepatocitos son transducidos de modo que la producción total de oxalato por el hígado tratado permanece bien por debajo de la capacidad de los riñones para excretar oxalato. El caudal de filtración glomerular relativamente grande (GFR) del ratón, estimado a alrededor de 13 ml/min Kg peso corporal [Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, Schnermann J. Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Mar;278(3):F339-51. Review. PMID: 10710537], puede explicar la ausencia de nefrocalcinosis en ratones Agxt1KO, a menos que estén sometidos a pruebas de desafío de precursores de glioxilato. La administración de etilenglicol, a dosis que no producen lesiones renales en el ratón, aumenta la excreción de oxalato a niveles que conducen a nefrocalcinosis en ratones Agxt1KO, pero no en controles de tipo salvaje [Salido EC, Li XM, Lu Y, Wang X, Santana A, Roy-Chowdhury N, Torres A, Shapiro LJ, Roy-Chowdhury J. Alanine-glyoxylate aminotransferase-deficient mice, a model for primary hyperoxaluria that responds to adenoviral gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(48):18249-54]. Tanto rAAV2/8 como rAAV2/5, a dosis por encima de 5×10^{11} partículas víricas / kg peso corporal son capaces de menguar el aumento observado en los ratones que bebieron un 0.5% de etilenglicol a niveles similares a aquellos observados en los ratones de tipo salvaje. Resultados similares (no mostrados) fueron obtenidos con ratones alimentados con un 0.5% de glicolato en la dieta. Aunque AAV8 y dosis altas de AAV5 parecen corregir la excreción de oxalato de forma similar en machos y hembras, correcciones sustancialmente peores se consiguieron en ratones hembra inyectados con las dosis inferiores de los constructos AAV5. Diferencias de género en la expresión de vectores AAV han sido declaradas previamente [Davidoff AM, Ng CY, Zhou J, Spence Y, Nathwani AC. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):480-8; Pañeda A, Vanrell L, Mauleon I, Crettaz JS, Berraondo P, Timmermans EJ, Beattie SG, Twisk J, van Deventer S, Prieto J, Fontanellas A, Rodriguez-Pena MS and Gonzalez-Aseguinolaza G. Effect of AAV serotype and genome structure over liver transduction and biodistribution in mice of both genders. *Hum Gene Ther* 2009, 20(8):908-17], pero poco se conoce sobre los mecanismos implicados.

[0101] En resumen, mostramos que una única administración en la vena de la cola de rAAV2-AGXT-2/5 o 2/8 tiene como

resultado la corrección prolongada del fenotipo de ratón PH1, sin evidencias de daño en el hígado o toxicidad.

[0102] Este método de transferencia genética basado en AAV tiene como resultado la expresión en el hígado del ADNc de AGXT humano suficientemente robusto como para superar el potencial problema planteado por la producción de oxalato continuo de hepatocitos no transducidos. También demostramos que el producto del gen humano AGXT está correctamente dirigido al peroxisoma en el hepatocito de ratón, y éste complementa el déficit del modelo de ratón Agxt1KO.

Listado de secuencias

5 [0103]

<110> Tratamientos Moleculares de Amsterdam (AMT) IP B.V.

<120> Tratamientos de alanina glioxilato aminotransferasa

15 <130> P6022296PCT

<150> EP09151795.3

<151> 2009-01-30

20 <160> 8

<170> PatentIn version 3.3

25 <210> 1

<211> 1179

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30 <220>

<221> misc_feature

<223> Alelo AGXT I340M Humano (rs4426527)

<220>

35 <221> CDS

<222> (1)..(1179)

<400> 1

ES 2 429 142 T3

atg Met 1	gcc Ala	tct Ser	cac His	aag Lys 5	ctg Leu	ctg Leu	gtg Val	acc Thr 10	ccc Pro	ccc Pro	aag Lys	gcc Ala	ctg Leu	ctc Leu 15	aag Lys	48
ccc Pro	ctc Leu	tcc Ser	atc Ile 20	ccc Pro	aac Asn	cag Gln	ctc Leu	ctg Leu 25	ctg Leu	ggg Gly	cct Pro	ggt Gly	cct Pro 30	tcc Ser	aac Asn	96
ctg Leu	cct Pro	cct Pro 35	cgc Arg	atc Ile	atg Met	gca Ala	gcc Ala 40	ggg Gly	ggg Gly	ctg Leu	cag Gln	atg Met 45	atc Ile	ggg Gly	tcc Ser	144
atg Met 50	agc Ser	aag Lys	gat Asp	atg Met	tac Tyr	cag Gln 55	atc Ile	atg Met	gac Asp	gag Glu	atc Ile 60	aag Lys	gaa Glu	ggc Gly	atc Ile	192
cag Gln 65	tac Tyr	gtg Val	ttc Phe	cag Gln	acc Thr 70	agg Arg	aac Asn	cca Pro	ctc Leu	aca Thr 75	ctg Leu	gtc Val	atc Ile	tcc Ser	ggc Gly 80	240
tcg Ser	gga Gly	cac His	tgt Cys	gcc Ala 85	ctg Leu	gag Glu	gcc Ala	gcc Ala 90	ctg Leu	gtc Val	aat Asn	gtg Val	ctg Leu	gag Glu 95	cct Pro	288
ggg Gly	gac Asp	tcc Ser	ttc Phe 100	ctg Leu	gtt Val	ggg Gly	gcc Ala	aat Asn 105	ggc Gly	att Ile	tgg Trp	ggg Gly	cag Gln 110	cga Arg	gcc Ala	336
gtg Val	gac Asp	atc Ile 115	ggg Gly	gag Glu	cgc Arg	ata Ile	gga Gly 120	gcc Ala	cga Arg	gtg Val	cac His	ccg Pro 125	atg Met	acc Thr	aag Lys	384
gac Asp	ccc Pro 130	gga Gly	ggc Gly	cac His	tac Tyr	aca Thr 135	ctg Leu	cag Gln	gag Glu	gtg Val	gag Glu 140	gag Glu	ggc Gly	ctg Leu	gcc Ala	432
cag Gln 145	cac His	aag Lys	cca Pro	gtg Val	ctg Leu 150	ctg Leu	ttc Phe	tta Leu	acc Thr	cac His 155	ggg Gly	gag Glu	tcg Ser	tcc Ser	acc Thr 160	480

ES 2 429 142 T3

ggc	gtg	ctg	cag	ccc	ctt	gat	ggc	ttc	ggg	gaa	ctc	tgc	cac	agg	tac	528
Gly	Val	Leu	Gln	Pro	Leu	Asp	Gly	Phe	Gly	Glu	Leu	Cys	His	Arg	Tyr	
				165					170					175		
aag	tgc	ctg	ctc	ctg	gtg	gat	tcg	gtg	gca	tcc	ctg	ggc	ggg	acc	ccc	576
Lys	Cys	Leu	Leu	Leu	Val	Asp	Ser	Val	Ala	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	Pro	
			180					185					190			
ctt	tac	atg	gac	cgg	caa	ggc	atc	gac	atc	ctg	tac	tcg	ggc	tcc	cag	624
Leu	Tyr	Met	Asp	Arg	Gln	Gly	Ile	Asp	Ile	Leu	Tyr	Ser	Gly	Ser	Gln	
		195					200					205				
aag	gcc	ctg	aac	gcc	cct	cca	ggg	acc	tcg	ctc	atc	tcc	ttc	agt	gac	672
Lys	Ala	Leu	Asn	Ala	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Leu	Ile	Ser	Phe	Ser	Asp	
	210					215					220					
aag	gcc	aaa	aag	aag	atg	tac	tcc	cgc	aag	acg	aag	ccc	ttc	tcc	ttc	720
Lys	Ala	Lys	Lys	Lys	Met	Tyr	Ser	Arg	Lys	Thr	Lys	Pro	Phe	Ser	Phe	
	225				230					235					240	
tac	ctg	gac	atc	aag	tgg	ctg	gcc	aac	ttc	tgg	ggc	tgt	gac	gac	cag	768
Tyr	Leu	Asp	Ile	Lys	Trp	Leu	Ala	Asn	Phe	Trp	Gly	Cys	Asp	Asp	Gln	
				245					250					255		
ccc	agg	atg	tac	cat	cac	aca	atc	ccc	gtc	atc	agc	ctg	tac	agc	ctg	816
Pro	Arg	Met	Tyr	His	His	Thr	Ile	Pro	Val	Ile	Ser	Leu	Tyr	Ser	Leu	
			260					265					270			
aga	gag	agc	ctg	gcc	ctc	att	gcg	gaa	cag	ggc	ctg	gag	aac	agc	tgg	864
Arg	Glu	Ser	Leu	Ala	Leu	Ile	Ala	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Asn	Ser	Trp	
		275					280					285				
cgc	cag	cac	cgc	gag	gcc	gcg	gcg	tat	ctg	cat	ggg	cgc	ctg	cag	gca	912
Arg	Gln	His	Arg	Glu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Leu	His	Gly	Arg	Leu	Gln	Ala	
	290				295						300					
ctg	ggg	ctg	cag	ctc	ttc	gtg	aag	gac	ccg	gcg	ctc	cgg	ctt	ccc	aca	960
Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Phe	Val	Lys	Asp	Pro	Ala	Leu	Arg	Leu	Pro	Thr	
	305				310					315					320	
gtc	acc	act	gtg	gct	gta	ccc	gct	ggc	tat	gac	tgg	aga	gac	atc	gtc	1008
Val	Thr	Thr	Val	Ala	Val	Pro	Ala	Gly	Tyr	Asp	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	
				325					330					335		
agc	tac	gtc	atg	gac	cac	ttc	gac	att	gag	atc	atg	ggt	ggc	ctt	ggg	1056
Ser	Tyr	Val	Met	Asp	His	Phe	Asp	Ile	Glu	Ile	Met	Gly	Gly	Leu	Gly	
			340				345					350				
ccc	tcc	acg	ggg	aag	gtg	ctg	cgg	atc	ggc	ctg	ctg	ggc	tgc	aat	gcc	1104
Pro	Ser	Thr	Gly	Lys	Val	Leu	Arg	Ile	Gly	Leu	Leu	Gly	Cys	Asn	Ala	
		355					360					365				
acc	cgc	gag	aat	gtg	gac	cgc	gtg	acg	gag	gcc	ctg	agg	gcg	gcc	ctg	1152
Thr	Arg	Glu	Asn	Val	Asp	Arg	Val	Thr	Glu	Ala	Leu	Arg	Ala	Ala	Leu	
	370				375						380					
cag	cac	tgc	ccc	aag	aag	aag	ctg	tga								1179
Gln	His	Cys	Pro	Lys	Lys	Lys	Leu									
	385				390											

5

<210> 2

<211> 392

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 429 142 T3

Met Ala Ser His Lys Leu Leu Val Thr Pro Pro Lys Ala Leu Leu Lys
 1 5 10 15
 Pro Leu Ser Ile Pro Asn Gln Leu Leu Leu Gly Pro Gly Pro Ser Asn
 20 25 30
 Leu Pro Pro Arg Ile Met Ala Ala Gly Gly Leu Gln Met Ile Gly Ser
 35 40 45
 Met Ser Lys Asp Met Tyr Gln Ile Met Asp Glu Ile Lys Glu Gly Ile
 50 55 60
 Gln Tyr Val Phe Gln Thr Arg Asn Pro Leu Thr Leu Val Ile Ser Gly
 65 70 75 80
 Ser Gly His Cys Ala Leu Glu Ala Ala Leu Val Asn Val Leu Glu Pro
 85 90 95
 Gly Asp Ser Phe Leu Val Gly Ala Asn Gly Ile Trp Gly Gln Arg Ala
 100 105 110
 Val Asp Ile Gly Glu Arg Ile Gly Ala Arg Val His Pro Met Thr Lys
 115 120 125
 Asp Pro Gly Gly His Tyr Thr Leu Gln Glu Val Glu Glu Gly Leu Ala
 130 135 140
 Gln His Lys Pro Val Leu Leu Phe Leu Thr His Gly Glu Ser Ser Thr
 145 150 155 160
 Gly Val Leu Gln Pro Leu Asp Gly Phe Gly Glu Leu Cys His Arg Tyr
 165 170 175
 Lys Cys Leu Leu Leu Val Asp Ser Val Ala Ser Leu Gly Gly Thr Pro
 180 185 190
 Leu Tyr Met Asp Arg Gln Gly Ile Asp Ile Leu Tyr Ser Gly Ser Gln
 195 200 205
 Lys Ala Leu Asn Ala Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ile Ser Phe Ser Asp
 210 215 220
 Lys Ala Lys Lys Lys Met Tyr Ser Arg Lys Thr Lys Pro Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 Tyr Leu Asp Ile Lys Trp Leu Ala Asn Phe Trp Gly Cys Asp Asp Gln
 245 250 255
 Pro Arg Met Tyr His His Thr Ile Pro Val Ile Ser Leu Tyr Ser Leu
 260 265 270
 Arg Glu Ser Leu Ala Leu Ile Ala Glu Gln Gly Leu Glu Asn Ser Trp

ES 2 429 142 T3

275	280	285
Arg Gln His Arg Glu Ala Ala Tyr Leu His Gly Arg Leu Gln Ala		
290	295	300
Leu Gly Leu Gln Leu Phe Val Lys Asp Pro Ala Leu Arg Leu Pro Thr		
305	310	315
Val Thr Thr Val Ala Val Pro Ala Gly Tyr Asp Trp Arg Asp Ile Val		
325	330	335
Ser Tyr Val Met Asp His Phe Asp Ile Glu Ile Met Gly Gly Leu Gly		
340	345	350
Pro Ser Thr Gly Lys Val Leu Arg Ile Gly Leu Leu Gly Cys Asn Ala		
355	360	365
Thr Arg Glu Asn Val Asp Arg Val Thr Glu Ala Leu Arg Ala Ala Leu		
370	375	380
Gln His Cys Pro Lys Lys Lys Leu		
385	390	

- 5 <210> 3
- <211> 673
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> Promotor AAT Humano combinado con el elemento intensificador de gen de albúmina de ratón (Ealb)
- <400> 3

```

tcgaggttcc tagattacac tacacattct gcaagcatag cacagagcaa tgttctact 60
taattacttt cattttcttg taccctcaca gcctagaaaa taacctgcgt tacagcatcc 120
actcagtatc ccttgagcat gagggtgacac tacttaacat agggacgaga tggtactttg 180
tgtctcctgc tctgtcagca gggcacagta cttgctgata ccagggaatg tttgttctta 240
aataccatca ttccggacgt gtttgccttg gccagttttc catgtacatg cagaaagaag 300
tttgactga tcaatacagt cctctgcctt taaagcaata ggaaaaggcc aacttgtcta 360
cgtttagtat gtggctgtag atctgtaccc gccaccccct ccaccttggga cacaggacgc 420
tgtggtttct gagccaggta caatgactcc ttctggttaag tgcagtggaa gctgtacact 480
gcccaggcaa agcgtccggg cagcgtaggc gggcgactca gatcccagcc agtggactta 540
gcccctgttt gtcctccga taactggggt gaccttggtt aatattcacc agcagcctcc 600
cccgttgccc ctctggatcc actgcttaaa tacggacgag gacagggccc tgtctcctca 660
gcttcaggca cca 673
  
```

- 15
- <210> 4
- <211> 96
- 20 <212> ADN

ES 2 429 142 T3

	<213> Homo sapiens		
	<400> 4		
		tccgtcgacc cgggcggccg atcgctagcc tttgaatgta accaatccta ctaataaacc	60
5		agttctgaag gtgttgtgtg tgcgcgtgtg gagttg	96
	<210> 5		
	<211> 66		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Aislante poli-A sintético		
15	<400> 5		
		aattcaataa agagctctta ttttcattct cgaggtgtgg ttggttttct tgtgtggggg	60
		cggatc	66
	<210> 6		
20	<211> 10		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> Secuencia de consenso de Kozak		
	<400> 6		
	gccrccaugg 10		
30	<210> 7		
	<211> 145		
	<212> ADN		
	<213> Virus adeno-asociado 2		
35	<400> 7		
		ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc	60
		cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg	120
		gccaactcca tcactagggg ttcct	145
	<210> 8		
40	<211> 146		
	<212> ADN		
	<213> Virus adeno-asociado 2		
	<400> 8		
45			

REIVINDICACIONES

- 5 1. Agente terapéutico AGXT I340M para el uso como medicamento, donde el agente terapéutico AGXT I340M es seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 a) una proteína AGXT I340M que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad de secuencia con SEC ID n°: 2 cuando está alineada óptimamente sobre su longitud total utilizando el programa GAP, y donde la proteína AGXT I340M comprende una metionina en una posición correspondiente a la posición 340 en SEC ID n°: 2;
- b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AGXT I340M tal y como se define en a); y,
- 15 c) un virión de un vector de terapia genética vírica que comprende una molécula de ácido nucleico tal y como se define en b).
2. Agente terapéutico AGXT I340M para el uso en el tratamiento de la hiperoxaluria primaria de tipo I, donde el agente terapéutico AGXT I340M es seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 a) una proteína AGXT I340M que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad de secuencia con SEC ID n°: 2 cuando está alineada óptimamente sobre su longitud total utilizando el programa GAP, y donde la proteína AGXT I340M comprende una metionina en una posición correspondiente a la posición 340 en SEC ID n°: 2;
- b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AGXT I340M tal y como se define en a); y,
- 25 c) un virión de un vector de terapia genética vírica que comprende una molécula de ácido nucleico tal y como se define en b).
3. Uso de un agente terapéutico AGXT I340M para la producción de un medicamento para el tratamiento de la hiperoxaluria primaria de tipo I, donde el agente terapéutico AGXT I340M se selecciona del grupo que consiste en:
- 30 a) una proteína AGXT I340M que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad de secuencia con SEC ID n°: 2 cuando está alineada óptimamente sobre su longitud total utilizando el programa GAP, y donde la proteína AGXT I340M comprende una metionina en una posición correspondiente a la posición 340 en SEC ID n°: 2;
- b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AGXT I340M tal y como se define en a); y,
- 35 c) un virión de un vector de terapia genética vírica que comprende una molécula de ácido nucleico tal y como se define en b).
4. Agente terapéutico AGXT I340M para el uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o un uso según la reivindicación 3, donde la proteína AGXT I340M comprende sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:
- 40 a) una leucina en una posición correspondiente a la posición I en SEC ID n°: 2;
- b) una arginina en una posición correspondiente a la posición 41 en SEC ID n°: 2;
- 45 c) una isoleucina en una posición correspondiente a la posición 152 en SEC ID n°: 2;
- d) una arginina en una posición correspondiente a la posición 170 en SEC ID n°: 2;
- e) una treonina en una posición correspondiente a la posición 244 en SEC ID n°: 2;
- f) una treonina en una posición correspondiente a la posición 294 en SEC ID n°: 2;
- g) una isoleucina en una posición correspondiente a la posición 326 en SEC ID n°: 2
- 50 h) combinaciones de una o más de las sustituciones de aminoácidos b) a g); y,
- i) la combinación de las sustituciones a) y f).
5. Agente terapéutico AGXT I340M para el uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2 o un uso según la reivindicación 3, donde la proteína AGXT I340M se selecciona del grupo que consiste en:
- 55 a) una proteína AGXT I340M comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2 y,
- b) una proteína AGXT I340M comprendiendo la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2 y que comprende una o más sustituciones de aminoácidos tal y como se define en la reivindicación 4.
6. Agente terapéutico AGXT I340M para el uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o un uso según la reivindicación 3, donde el agente terapéutico AGXT I340M es una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AGXT I340M tal y como se define en la reivindicación 4 o 5.

- 5 7. Constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína AGXT I340M tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la secuencia de nucleótidos está enlazada operativamente a un promotor para la expresión en células humanas y, opcionalmente, donde el promotor no es un promotor de un gen AGXT humano.
8. Construcción de ácido nucleico según la reivindicación 7, donde el promotor es un promotor específico del hígado.
- 10 9. Constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 8, donde el promotor específico del hígado se selecciona del grupo que consiste en un promotor α 1-anti-trypsin (AAT), un promotor de globulina fijadora de hormona tiroidea, un promotor de albúmina, un promotor de globulina fijadora de tiroxina (TBG), un promotor híbrido de la región de control hepática (HCR)-ApoCII, un promotor híbrido HCR-hAAT, un promotor AAT promotor combinado con el elemento intensificador del gen de albúmina de ratón (Ealb) y un promotor de apolipoproteína E.
- 15 10. Constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 7, donde el promotor tiene la secuencia de SEC ID n°: 3.
11. Constructo de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde el constructo es un vector de terapia genética vírica, preferiblemente un vector parvoviral.
- 20 12. Virión parvoviral que comprende un constructo de ácidos nucleicos tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.
- 25 13. Composición farmacéutica que incluye un agente terapéutico AGXT I340M para el uso tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un constructo de ácidos nucleicos tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 o un virión parvoviral tal y como se define en la reivindicación 12 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 14. Constructo de ácidos nucleicos tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, un virión parvoviral tal y como se define en la reivindicación 12 o una composición farmacéutica tal y como se define en la reivindicación 13 para el uso en el tratamiento de la hiperoxaluria primaria de tipo I.
- 35 15. Uso de un constructo de ácidos nucleicos tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, un virión parvoviral tal y como se define en la reivindicación 12 o una composición farmacéutica tal y como se define en la reivindicación 13 en la producción de un medicamento para el uso en el tratamiento de hiperoxaluria primaria de tipo I.

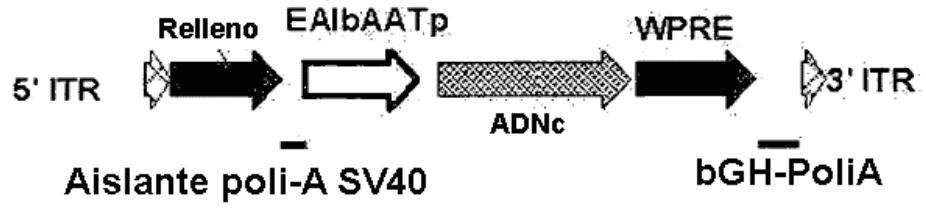


Fig. 1

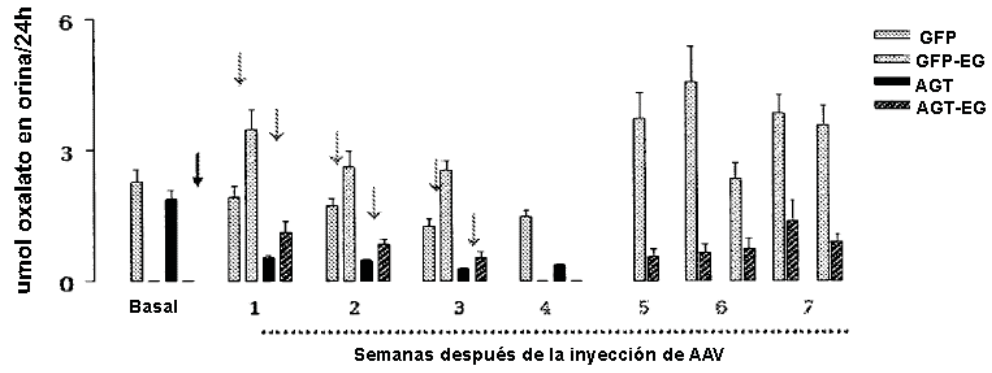


Fig. 2

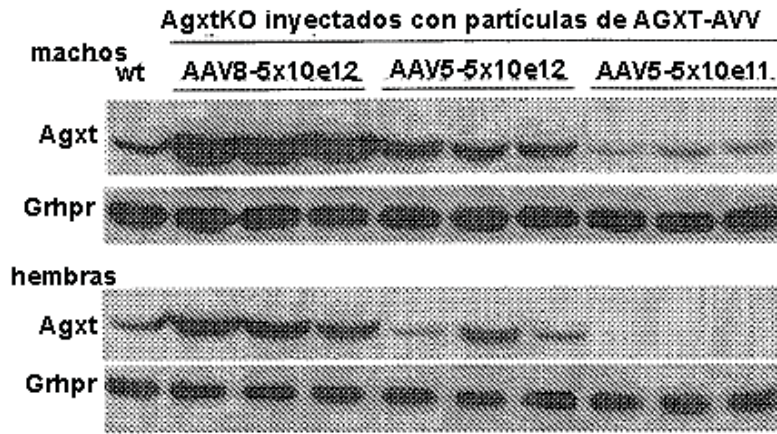


Fig. 3a

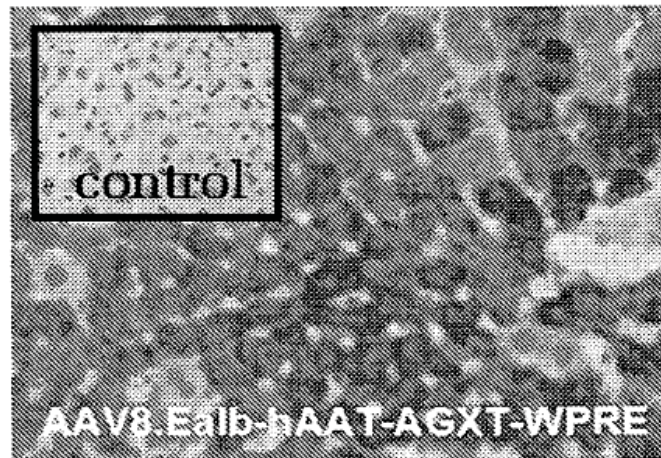


Fig. 3b y 3c

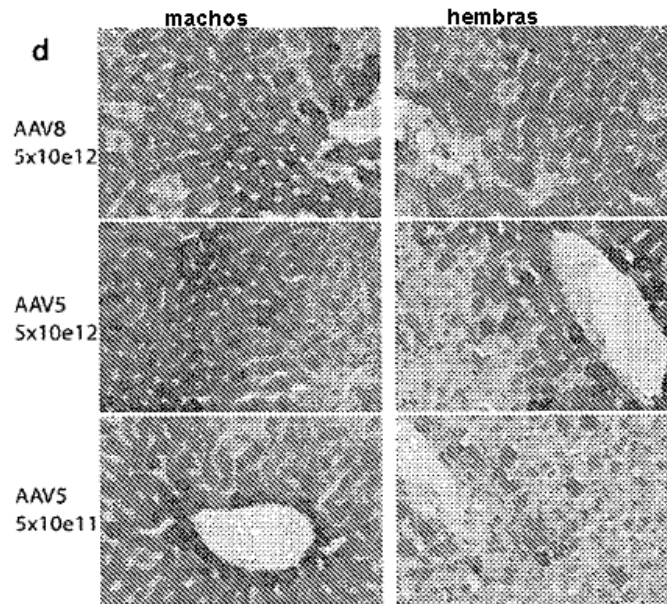


Fig. 3d

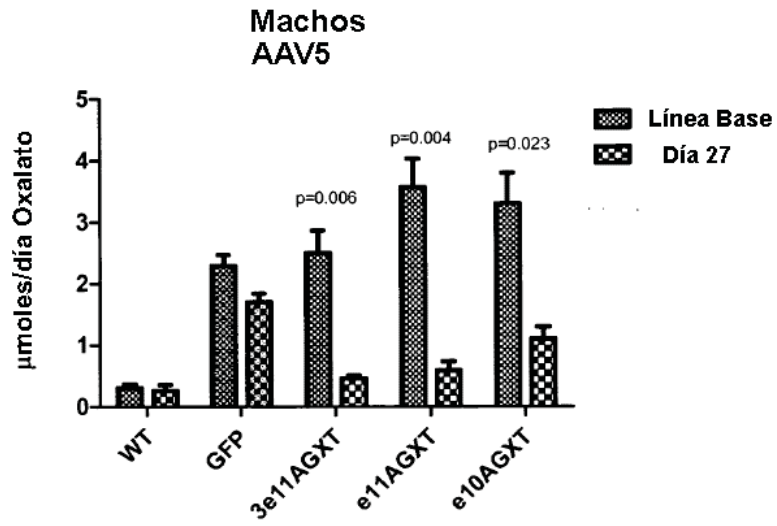


Fig. 4