

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 540**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C12N 9/88** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2009 E 09788347 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2352823**

54 Título: **Terapia génica de porfobilinógeno deaminasa**

30 Prioridad:

**29.09.2008 EP 08165393**

**29.09.2008 US 100881 P**

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

**15.10.2014**

73 Titular/es:

**UNIQUE IP B.V. (50.0%)**

**Meibergdreef 61**

**1105 BA Amsterdam, NL y**

**PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FONTANELLAS ROMÁ, ANTONIO;**

**GONZÁLEZ ASEGUINOLAZA, GLORIA;**

**RODRÍGUEZ PENA, MARÍA SOL;**

**PAÑEDA RODRÍGUEZ, MARÍA ASTRID;**

**TWISK, JAAP;**

**PRIETO VALTUEÑA, JESÚS MARÍA;**

**PETRY, HARALD y**

**VAN DEVENTER, SANDER JAN HENDRIK**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 507 540 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

Terapia génica de porfobilinógeno deaminasa

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a viriones de parvovirus que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica porfobilinógeno deaminasa humana o un constructo de ácidos nucleicos que alberga tal secuencia.

La presente invención se refiere además a métodos para su uso en el tratamiento y prevención de enfermedades provocadas por la deficiencia de porfobilinógeno deaminasa.

Más específicamente, los vectores de terapia génica de la invención se pueden utilizar en métodos para paliar los síntomas de tales enfermedades, incluyendo la porfiria aguda intermitente.

15 Antecedentes de la invención

[0002] La porfiria aguda intermitente (PAI) es una enfermedad metabólica heredada caracterizada por una deficiencia de porfobilinógeno deaminasa (PBGD), la tercera enzima de la vía de síntesis del hemo.

La actividad enzimática es ~50 % de la normal en aquellos que heredan el rasgo genético.

La enfermedad se hereda de manera autosómica dominante y es la más común de las porfirias agudas.

20 Aunque ésta ocurre en todas las razas es predominante en el norte de Europa, principalmente en Suecia, Gran Bretaña e Irlanda.

En EE.UU. y otros países, la prevalencia estimada es 5/100.000 y en el norte de Suecia llega a ser 60-100/100.000.

Se han descrito más de 225 mutaciones en el gen de PBGD hasta la fecha.

25 La característica clínica dominante es un ataque intermitente agudo debido a una disfunción del sistema nervioso, incluyendo dolor abdominal y trastornos neurovisceral y circulatorios.

Se ha informado de dolor abdominal en el 85-95 % de los casos y es la característica más común, seguido de o asociado a los cambios neurológicos.

Puede ocurrir la progresión hacia parálisis respiratoria y bulbar y muerte si la PAI no es reconocida y no se retiran fármacos nocivos, tales como fármacos metabolizados por las enzimas hepáticas del citocromo P450, que pueden precipitar un ataque.

Puede ocurrir también muerte súbita como resultado de una arritmia cardíaca.

A veces se da también cáncer primario de hígado y deterioro de la función renal.

[0003] Una deficiencia heredada de PBGD no es suficiente para que aparezcan los síntomas.

35 Una proporción alta de sujetos que heredan una mutación PBGD nunca desarrollan síntomas porfíricos, es decir, hay una penetrancia clínica muy baja.

Los síntomas clínicos en portadores de PAI se asocian con la producción y excreción aumentadas de los precursores de porfirina ácido delta-aminolevulínico (ALA) y porfobilinógeno (PBG) como resultado de la demanda aumentada de síntesis del hemo debido a un fármaco u otros factores desencadenantes que provocan el ataque agudo.

40 En estas condiciones la deficiencia de PBGD limita la síntesis del hemo y como resultado se deteriora la represión de ALA sintasa (ALAS1) mediada por el hemo.

Hay evidencia indicando que el hígado es la fuente principal del exceso de precursores de porfirina.

Estos compuestos permanecen elevados entre ataques en aquellos sujetos propensos a crisis porfíricas repetidas y aumentan más durante las crisis.

45 Pueden reducirse hasta niveles normales si la enfermedad permanece inactiva durante un largo periodo de tiempo.

[0004] Los ataques agudos ocurren normalmente después de la pubertad y pueden ser inducidos en individuos latentes por factores endocrinos y hormonas esteroideas, y una variedad de factores medioambientales incluyendo fármacos, factores nutricionales, ingesta calórica y de carbohidratos restringida, tabaco, hormonas esteroideas y anticonceptivos orales, envenenamiento por plomo, infecciones intercurrentes, cirugía y estrés psicológico.

Los fármacos están entre los factores más importantes que precipitan los ataques agudos y una lista de fármacos seguros está disponible en [www.drugsporphyria.com](http://www.drugsporphyria.com).

50 Tabaco, etanol y fármacos metabolizados por CYP450, incrementan enormemente la demanda del hemo hepático y suponen la inducción de ALAS1, la cual aumenta la producción de precursores de porfirina y precipita un ataque agudo.

Además, ALAS1 está regulada positivamente por el coactivador 1α del receptor y activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1α), que se induce en el hígado en ayunas.

Entre los factores de precipitación las hormonas esteroideas parecen jugar un papel importante.

60 Este concepto es apoyado por el hecho de que la enfermedad raramente se manifiesta antes de la pubertad y que los anticonceptivos orales pueden exacerbar los ataques en algunas mujeres con deficiencia de PBGD.

Además, las mujeres (80%) son afectadas más frecuentemente que los hombres (20%).

[0005] Los ataques agudos se tratan con infusiones de glucosa y hemina (Normosang, Orphan Europe).

65 La glucosa parece oponerse a la inducción de ALAS1 mediada por PGC-1α.

La hemina restaura la reserva del hemo regulador y suprime la inducción hepática de ALAS1.

Algunas mujeres desarrollan ataques premenstruales que se pueden prevenir mediante análogos de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).

Algunos pacientes exhiben ataques agudos recurrentes y una disfunción neurológica discapacitante significativa.

El daño neurológico avanzado y los síntomas crónicos y subagudos son insensibles a la terapia con hemo.

5 Esta es una afección potencialmente mortal que puede ser curada solo por trasplante alogénico de hígado que, en tres pacientes hasta la fecha, previene la acumulación de ALA y PBG neurotóxicas.

[0006]. Sin embargo el trasplante de hígado tiene disponibilidad limitada de donantes compatibles, y una morbilidad y mortalidad significativas.

10 [0007] Así, la terapia de sustitución de genes es una alternativa potencial al trasplante de hígado en estos pacientes donde la función del hígado es completamente normal salvo por la deficiencia de PBGD.

La terapia génica es un procedimiento que consiste en la introducción de un gen específico en las células para controlar la enfermedad a través del uso de vectores.

15 La viabilidad de las terapias de entrega de genes con el objetivo de corregir el déficit de enzima hepática se explora en modelos experimentales de PAI (ratones PAI).

La transferencia de genes mediada por vectores adenovirales de PBGD a ratones porfíricos mostró eficacia terapéutica a corto plazo como resultado de la expresión hepática transitoria de PBGD (Johansson, 2004, Mol. Ther. 10(2):337-43). Estos resultados establecieron un estudio demostrativo preliminar, que demuestra que la entrega del gen PBGD mediada por vector vírico puede mejorar transitoriamente las manifestaciones severas de ataques porfíricos inducidos por fenobarbital en ratones PAI.

[0008] EP 1 049 487 describe sólo a un nivel conceptual la construcción de vectores rAAV que contienen un ADNc humano de PBGD.

25 [0009] No obstante, hay todavía una necesidad en la técnica, de vectores mejorados y protocolos para entrega de hPBGD mediada por AAV a sujetos con necesidad de ella.

#### Resumen de la invención

30 [0010] Según la invención, se proporciona un virión de parvovirus que comprende: a) un constructo de ácidos nucleicos que comprende: i) una secuencia de nucleótidos, es decir, un ácido nucleico o polinucleótido, que codifica una porfobilinógeno deaminasa (PBGD) humana y que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID n°: 1; y, ii) un promotor AAT combinado con el elemento potenciador del gen de albúmina de ratón (Ealb); y, iii) proteínas de la cápside de AAV de serotipo 5.

[0011] Preferiblemente, en el constructo de ácidos nucleicos, la secuencia de nucleótidos que codifica la porfobilinógeno deaminasa humana está operativamente enlazada al promotor.

40 [0012] Preferiblemente, el virión de parvovirus es un vector vírico adeno-asociado (AAV).

[0013] La presente invención se refiere a estos viriones de parvovirus para usar como medicamento, y para usar en el tratamiento de una afección provocada por una deficiencia en la porfobilinógeno deaminasa, donde, preferiblemente la afección es porfiria aguda intermitente (PAI).

45 [0014] La invención también se refiere al uso de un virión de parvovirus de la invención para usar en la producción de un medicamento para utilizarlo en el tratamiento de una afección provocada por una deficiencia en la porfobilinógeno deaminasa.

#### 50 Descripción de la invención

##### Definiciones

[0015] Un "ácido nucleico" incluye cualquier molécula compuesta por o que comprende nucleótidos monoméricos.

55 El término "secuencia de nucleótidos" se puede utilizar de forma intercambiable con "ácido nucleico" en este documento.

Un ácido nucleico puede ser un oligonucleótido o un polinucleótido.

Un ácido nucleico puede ser un ADN o un ARN. Un ácido nucleico puede ser químicamente modificado o artificial.

60 Ácidos nucleicos artificiales incluyen ácido peptidonucleico (APN), morfolino y ácido nucleico bloqueado (ANB), así como ácido nucleico glicólico (AGN) y ácido nucleico de treosa (ATN). Cada uno de estos se distingue del ADN o ARN de origen natural por cambios en el esqueleto de la molécula.

Además, se pueden utilizar nucleótidos de fosforotioato.

Otros análogos de desoxinucleótidos incluyen metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforoditioatos, N3'P5'-fosforamidatos y oligorribonucleótido-fosforotioatos y sus análogos de 2'-O-alilo y 2'-O-metilribonucleótido metilfosfonatos que se pueden usar en un ácido nucleico de la invención.

[0016] Un "constructo de ácidos nucleicos" se entiende en este documento que significa 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, tanto de cadena única como doble, que ha sido modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos, que se combinan y superponen de una manera que de otra forma no existiría en la naturaleza.

Un constructo de ácidos nucleicos es normalmente un "vector", es decir, una molécula de ácido nucleico que se utiliza para entregar ADN creado exógenamente a una célula huésped.

[0017] Un tipo de constructo de ácidos nucleicos es un "casete 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 células huésped u organismos huésped, compatibles con tales secuencias.

Los casetes de expresión o vectores de expresión incluyen típicamente al menos secuencias reguladoras de transcripción adecuadas y opcionalmente, señales de terminación de transcripción 3'.

Pueden estar también presentes factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, tales como elementos potenciadores de expresión.

[0018] El término "homólogo" cuando se usa para indicar la relación entre un ácido nucleico (recombinante) o molécula de polipéptido dados y un organismo huésped o célula huésped dados, se entiende que significa que en la naturaleza el ácido nucleico o molécula de polipéptido son producidos por una célula huésped u organismos de las mismas especies.

El término "heterólogo" se puede utilizar para indicar que en la naturaleza el ácido nucleico o molécula de polipéptido son producidos por una célula huésped u organismos de una especie diferente.

[0019] Tal y como se utiliza en este documento, el término "operativamente enlazado" se refiere a un enlace de elementos de polinucleótidos (o polipéptidos) en una relación funcional.

Un ácido nucleico está "operativamente enlazado" cuando se sitúa 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 afecta a la transcripción de la secuencia codificante.

Operativamente enlazado significa que las secuencias de ADN que se enlazan son normalmente contiguas y, donde sea necesario unir dos regiones de codificación de proteínas, contiguas y dentro del marco de lectura.

[0020] "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 operativamente enlazada.

Una secuencia de control de expresión está "operativamente enlazada" 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), terminadores de transcripción, un codón de inicio delante de un gen de codificación de proteína, señales de empalme para intrones y codones de terminación.

El término "secuencia de control de expresión" tiene la intención de incluir, como mínimo, una secuencia cuya presencia está diseñada para influir en la expresión, y puede también incluir componentes beneficiosos adicionales. Por ejemplo, las secuencias líder y las secuencias compañeras de fusión son secuencias de control de expresión.

El término puede también incluir el diseño de la secuencia de ácidos nucleicos, de manera que los codones de inicio potenciales no deseados dentro y fuera del marco se retiren de la secuencia.

Puede también incluir el diseño de la secuencia de ácidos nucleicos de manera que los sitios de empalme potenciales no deseados sean retirados.

Incluye secuencias o secuencias de poliadenilación (pA) que dirigen la adición de una cola polyA, es decir, una cadena de residuos de adenina en el extremo-3' de un ARNm, que pueden ser referidas como secuencias polyA.

Se puede diseñar también para mejorar la estabilidad del ARNm.

Las secuencias de control de expresión que afectan a la estabilidad de la transcripción y la traducción, por ejemplo, promotores, así como secuencias que efectúan la traducción, por ejemplo, secuencias Kozak, adecuadas para usarse en las células de insecto son bien conocidas por los expertos en la técnica. Las secuencias de control de expresión pueden ser de tal naturaleza que modulen la secuencia de nucleótidos a la que están operativamente enlazadas, de manera que se consiguen niveles de expresión más bajos o niveles de expresión más altos.

[0021] Tal y como se utiliza en este documento, el término "promotor" o "secuencia reguladora de transcripción" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de una o varias secuencias codificantes, y que está localizado corriente arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de inicio de transcripción de la secuencia codificante, y es estructuralmente identificado por la presencia de un sitio de unión para ARN polimerasa dependiente del ADN, sitios de inicio de transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluyendo, pero no limitándose a sitios de unión de factor de transcripción, sitios de unión a proteínas represoras y activadoras, y cualquiera de las otras secuencias de nucleótidos conocidas por un experto en la técnica para actuar directa o indirectamente regulando la cantidad de transcripción del promotor, incluyendo, por ejemplo, atenuadores o potenciadores, pero también silenciadores.

Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de tejidos bajo la mayoría de condiciones fisiológicas y de desarrollo.

Un promotor "inducible" es un promotor que es regulado fisiológicamente o por desarrollo, por ejemplo, por la aplicación de un inductor químico.

Un promotor "específico de tejido" solo está activo en tipos específicos de tejidos o células.

[0022] Una "3' UTR" o "secuencia no traducida 3' " (también frecuentemente referida como región no codificante 3', o extremo 3') se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos encontrada corriente 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 transcrito de ARNm se puede dividir corriente abajo de la señal de poliadenilación y una cola polyA puede ser añadida, la cual está implicada en el transporte del ARNm al citoplasma (donde la traducción tiene lugar).

[0023] Los términos, "sustancialmente idéntico" "identidad sustancial" o "esencialmente similar" o "similitud esencial" significan que dos secuencias de péptidos o de nucleótidos, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando parámetros por defecto, comparten al menos cierto porcentaje de identidad de secuencia tal y como se define en otra parte en este documento.

GAP usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias a lo largo de toda su longitud, maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de espacios.

Generalmente, se usan los parámetros por defecto de GAP, con una penalización de creación de gap = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y penalización de extensión de gap = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas). Para nucleótidos la matriz de puntuación por defecto usada es nwsgapdna y para proteínas la matriz de puntuación por defecto es Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89,915-919). Es 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 ADN, 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 usando programas informáticos, tales como el Paquete GCG Wisconsin, versión 10.3, disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 EE.UU. o el software libre EMBOSS para Windows (versión actual 2.7.1-07).

Alternativamente el porcentaje de similitud o identidad se puede determinar buscando contra bases de datos tales como FASTA, BLAST, etc.

[0024] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usa en su sentido no limitante para significar que los elementos después de la palabra están incluidos, pero que los elementos no mencionados específicamente no están excluidos.

Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "uno" no excluye la posibilidad de que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos.

Así, el artículo indefinido "un" o "uno" normalmente significa "al menos uno".

#### Descripción detallada de la invención

[0025] La invención concierne a un virión de parvovirus que comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica porfobilinógeno deaminasa según la reivindicación 4 y a un uso de tal virión de parvovirus según la reivindicación 1. La secuencia de nucleótidos que codifica la porfobilinógeno deaminasa es preferiblemente una secuencia de nucleótidos sintética.

El término "secuencia de nucleótidos sintética" se entiende que significa en este documento que la secuencia de nucleótidos no ocurre como tal en la naturaleza, sino que fue diseñada, creada y/o construida por intervención humana.

De este modo, el término "sintético" no implica necesariamente que la secuencia sea exclusivamente y/o totalmente obtenida a través de síntesis química.

Más bien, aunque partes de la secuencia sintética pueden en alguna etapa haber sido obtenidas a través de síntesis química, las moléculas que comprenden una secuencia sintética de la invención usualmente serán obtenidas a partir de fuentes biológicas tales como células (cultivadas, por ejemplo, recombinantes).

[0026] La secuencia de nucleótidos de la invención puede codificar una porfobilinógeno deaminasa eritroide o no eritroide.

Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos codifica una porfobilinógeno deaminasa de origen humano.

La secuencia de nucleótidos puede así codificar cualquier secuencia de aminoácidos de origen natural de una forma alélica de una porfobilinógeno deaminasa humana.

[0027] En una realización preferida de la invención, la secuencia de nucleótidos que codifica una porfobilinógeno deaminasa tiene un sesgo mejorado en el uso de codones para la célula humana en comparación con la secuencia de nucleótidos de origen natural que codifica las deaminasas.

La adaptabilidad de una secuencia de nucleótidos que codifica una porfobilinógeno deaminasa para el uso de codones de células humanas se puede expresar como el índice de adaptación de codones (IAC). Un índice de adaptación de codones se define en este documento como una medida de la adaptabilidad relativa del uso de

codones de un gen con respecto al uso de codones de genes humanos altamente expresados.

La adaptabilidad relativa (w) de cada codón es la proporción del uso de cada codón, respecto al del codón más abundante para el mismo aminoácido.

El IAC se define como la media geométrica de estos valores relativos de adaptabilidad.

5 Los codones no sinónimos y los codones de terminación (dependientes del código genético) son excluidos.

Los valores del IAC varían de 0 a 1, indicando los valores más altos una proporción más alta de los codones más abundantes (ver Sharp y Li, 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 1281-1295; ver también: Kim et al., *Gene*. 1997,199:293-301; zur Megede et al., *Journal of Virology*, 2000,74: 2628-2635).

10 [0028] La secuencia de nucleótidos tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº: 1. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº: 2.

[0029] Los "codones" en las SEC ID nº: 1 y 3 se refieren a los codones en el marco que empieza con el nucleótido 1 de las SEC ID nº: 1 y 3, es decir, no el marco que empieza con el nucleótido 2 ó 3 de las SEC ID nº: 1 y 3. Lo que quiere decir que el primer codón de las SEC nº: 1 y 3 es indicado mediante los números de nucleótido 1 a 3.

15 [0030] Otra secuencia de nucleótidos preferida de la divulgación codifica un polipéptido con actividad de porfobilinógeno deaminasa, por el cual la secuencia de nucleótidos tiene al menos un 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia de nucleótidos en toda su longitud con la SEC ID nº: 1 ó 3, tal como se determina mediante un algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch.

Más preferiblemente la secuencia de nucleótidos codifica las secuencias de aminoácidos de la SEC ID nº: 2 ó 4.

[0031] En una realización particularmente preferida de la divulgación, la secuencia de nucleótidos tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº: 1 ó 3.

25 [0032] En otro aspecto, la divulgación pertenece a un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención según se define anteriormente en este documento.

En el constructo de ácidos nucleicos, la secuencia de nucleótidos que codifica la porfobilinógeno deaminasa preferiblemente está operativamente enlazada a una secuencia de control de expresión compatible con células mamíferas, por ejemplo, un promotor.

Muchos de estos promotores son conocidos en la técnica (ver Sambrook y Russell, 2001, supra).

Se describen los promotores constitutivos que son ampliamente expresados en muchos tipos de células, tales como el promotor CMV.

30 Se describen los promotores que son inducibles, específicos de tejido, específicos de tipo de célula o específicos de ciclo celular.

En una realización descrita, la secuencia de nucleótidos que codifica la porfobilinógeno deaminasa está operativamente enlazada a un promotor específico de hígado.

Los promotores específicos de hígado son particularmente preferidos para usarse en unión con la deaminasa no eritroide.

40 Preferiblemente, en un constructo de la divulgación, una secuencia de control de expresión para expresión específica de hígado es, por ejemplo, seleccionada del grupo que consiste en un promotor  $\alpha$ 1-antitripsina (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 potenciador del gen de albúmina de ratón (Ealb) y un promotor de apolipoproteína E.

Otros ejemplos incluyen el promotor E2F para expresión selectiva de tumor, y, en particular, selectiva de tumor de célula neurológica (Parr et al., 1997, *Nat.*

Med. 3:1145-9) o el promotor IL-2 para usar en células mononucleares sanguíneas (Hagenbaugh et al., 1997, *J Exp Med*; 185: 2101-10). En una realización particularmente preferida de la invención, donde el promotor tiene la

50 secuencia de la SEC ID nº: 5.

[0033] En otra realización preferida del constructo de ácidos nucleicos de la invención se puede localizar una 3'UTR (o secuencia no traducida 3') corriente abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica la porfobilinógeno deaminasa.

55 Secuencias 3'UTR adecuadas están disponibles para el experto en la materia.

Éstas se pueden obtener de cualquier gen mamífero y preferiblemente humano y normalmente comprenderán un sitio de terminación de transcripción y una señal de poliadenilación (tal como, por ejemplo, AAUAAA o variantes de la misma).

En una realización particularmente preferida el constructo de ácidos nucleicos comprende una 3'UTR derivada del gen PBGD humano tal como por ejemplo la SEC ID nº: 6.

[0034] En otra realización preferida del constructo de ácidos nucleicos de la invención, la secuencia de control de expresión que está operativamente enlazada a la secuencia de nucleótidos que codifica la porfobilinógeno deaminasa, es precedida corriente arriba por un aislante polyA para terminar la transcripción desde posibles unidades de transcripción corriente arriba.

Una 3'UTR como la descrita anteriormente y que comprende preferiblemente al menos una secuencia de

terminación de transcripción se puede utilizar para este propósito.

Un aislante polyA preferido es un aislante polyA sintético que tiene la secuencia de la SEC ID n°: 7.

[0035] En una realización preferida el constructo de ácidos nucleicos de la invención puede comprender una secuencia de consenso de Kozak alrededor del codón iniciador de la secuencia de nucleótidos que codifica la porfobilinógeno deaminasa.

La secuencia de consenso de Kozak se define en este documento como GCCRCC(AUG)A (SEC ID n°: 8), donde R es una purina (es decir, A, adenosina o G, guanosina) y donde (AUG) representa el codón de inicio de la secuencia codificante de porfobilinógeno deaminasa.

Aunque en la secuencia de consenso de Kozak habitual, el nucleótido que va directamente después del codón de inicio AUG es una G (guanina), en el contexto de la presente invención este nucleótido es preferiblemente una A (adenosina) tanto en la secuencia codificante de porfobilinógeno deaminasa eritroide como no eritroide.

En una realización preferida, la secuencia de consenso de Kozak puede estar precedida por otro triplete GCC.

[0036] En un aspecto adicional la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la porfobilinógeno deaminasa que está operativamente enlazada a una secuencia de control de expresión tal y como se define anteriormente en este documento, donde la construcción es un vector de expresión que es adecuado para terapia génica de mamíferos, preferiblemente terapia génica de seres humanos.

Un constructo de ácidos nucleicos según la invención es un vector vírico de terapia génica.

Un vector vírico de terapia génica preferido es un virus adeno-asociado (AAV).

[0037] Los vectores de terapia génica en el contexto de la presente invención son vectores de parvovirus.

Así, la invención se refiere al uso de parvovirus animales, en particular dependovirus tales como el virus infeccioso adeno-asociado (AAV) humano o simio, y componentes de los mismos (por ejemplo, un genoma de parvovirus animal) para usarse como vectores para introducir y/o expresar las secuencias de nucleótidos que codifican una porfobilinógeno deaminasa en células mamíferas.

[0038] Los virus de la familia Parvoviridae son virus animales de ADN pequeño.

La familia Parvoviridae se puede dividir entre dos subfamilias: la Parvovirinae, que infecta a vertebrados, y la Densovirinae, que infecta a insectos.

Los miembros de la subfamilia Parvovirinae son referidos en este documento como parvovirus e incluyen el género Dependovirus.

Como se puede deducir del nombre de su género, los miembros de Dependovirus son únicos en cuanto a que normalmente requieren coinfección con un virus auxiliar tal como adenovirus o virus del herpes para infección productiva en el cultivo celular.

El género Dependovirus incluye AAV, que infecta normalmente a seres humanos (por ejemplo, serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5 y 6) o primates (por ejemplo, serotipos 1 y 4), y virus relacionados que infectan a otros animales de sangre caliente (por ejemplo, virus adeno-asociado bovino, canino, equino y ovino).

Se describe información adicional sobre parvovirus y otros miembros de los Parvoviridae en Kennet 1. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Capítulo 69 en Fields Virology (3d Ed. 1996). Por conveniencia, la presente invención es ejemplificada y descrita adicionalmente en este documento mediante referencia a AAV. No obstante, se entiende que la invención no está limitada a AAV sino que puede igualmente aplicarse a otros parvovirus.

[0039] La organización genómica de todos los serotipos de AAV conocidos es muy similar.

El genoma de AAV es una molécula lineal monocatenaria de ADN que tiene menos de aproximadamente 5.000 nucleótidos (nt) de longitud.

Las secuencias repetidoras terminales invertidas (ITR) flanquean las secuencias codificantes únicas de nucleótidos para las proteínas de replicación no estructural (Rep) y las proteínas estructurales (VP).

Las proteínas VP (VP1, -2 y -3) forman la cápside.

Los 145 nt terminales son autocomplementarios y están organizados de modo que se pueda formar un dúplex intramolecular energéticamente estable formando una horquilla en forma de T.

Estas estructuras de horquilla funcionan como un origen para la replicación de ADN vírico, sirviendo como cebadores para el complejo ADN polimerasa celular.

Después de la infección en células mamíferas por AAV de tipo salvaje (wt), los genes Rep (es decir Rep78 y Rep52) son expresados desde el promotor P5 y el promotor P19, respectivamente y ambas proteínas Rep tienen una función en la replicación del genoma vírico.

Un evento de empalme en el ORF Rep produce la expresión de, en realidad, 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 es suficiente para la producción del vector AAV.

También en células de insecto las proteínas Rep78 y Rep52 bastan para la producción del vector AAV.

[0040] Un "vector recombinante de parvovirus o vector recombinante AAV" (o "vector rAAV") en este documento se refiere a un vector que comprende una o varias secuencias de polinucleótidos de interés, genes de interés o

"transgenes" que están flanqueados por al menos una secuencia repetidora terminal invertida (ITR) de parvovirus o de AAV. Tales vectores rAAV pueden ser replicados y empaquetados en partículas víricas infecciosas cuando están presentes en una célula huésped de insecto que expresa productos de los genes rep y cap de AAV (es decir, proteínas Rep y Cap de AAV).

5 Cuando un vector rAAV es incorporado a un constructo de ácidos nucleicos más grande (por ejemplo en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido o baculovirus usado para clonación o transfección), entonces el vector rAAV es típicamente referido como un "pro-vector" que puede ser "rescatado" por replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento del AAV y funciones auxiliares necesarias.

10 Así, en otro aspecto, la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una porfobilinógeno deaminasa como la definida anteriormente en este documento, donde el constructo de ácidos nucleicos es un vector recombinante de parvovirus o vector recombinante AAV y de este modo comprende al menos una ITR de parvovirus o de AAV. Preferiblemente, en el constructo de ácidos nucleicos la secuencia de nucleótidos que codifica la porfobilinógeno deaminasa está flanqueada por ITR de parvovirus o de AAV en cada lado.

15 Las ITR de AAV de serotipo 2 se usan en los constructos de la invención. Se dan ejemplos de ITRs de AAV2 para usar en constructos de ácidos nucleicos de la invención en la SEC ID n°: 9 (ITR izquierda o corriente arriba) y la SEC ID n°: 10 (ITR derecha o corriente abajo).

[0041] El AAV es capaz de infectar varias células mamíferas.

20 Ver, 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, la transducción de AAV de fibroblastos sinoviales humanos es significativamente más eficaz que en células murinas similares, Jennings et al., Arthritis Res, 3:1 (2001), y el tropismo celular del AAV difiere entre serotipos.

25 Ver, por ejemplo, Davidson et al. (2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:3428- 3432), que discute las diferencias entre AAV2, AAV4, y AAV5 respecto al tropismo de la célula CNS mamífera y la eficiencia de transducción, y ver Goncalves, 2005, Virol J. 2(1):43 que discute estrategias para la modificación del tropismo de AAV.

Para la transducción de células de hígado se prefieren viriones de rAAV con proteínas de la cápside de AAV1, AAV8 y AAV5 (Nathwani et al., 2007, Blood 109(4): 1414-1421; Kitajima et al., 2006, Atherosclerosis 186(1):65-73), de los cuales, los viriones de rAAV con proteínas de la cápside de AAV5 pueden ser los preferidos.

30 [0042] Las secuencias de AAV que se pueden utilizar en la presente divulgación para la producción de vectores rAAV en células de insecto se pueden obtener del genoma de cualquier serotipo de AAV.

Generalmente, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa a nivel de aminoácidos y ácidos nucleicos.

35 Esto proporciona un conjunto idéntico de funciones genéticas para producir viriones que esencialmente son física y funcionalmente equivalentes.

Para la secuencia genómica de los diferentes serotipos de AAV y una visión de conjunto de las similitudes genómicas ver, por ejemplo, GenBank número de acceso U89790; GenBank número de acceso J01901; GenBank número de acceso AF043303; GenBank número de acceso AF085716; Chlorini et al. (1997, J. Vir. 71: 6823-33); 40 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). Los serotipos 1, 2, 3,4 y 5 de rAAV son la fuente preferida de secuencias de nucleótidos de AAV para usar en el contexto de la presente divulgación.

Preferiblemente las secuencias ITR de AAV para usar en el contexto de la presente divulgación son obtenidas a partir de AAV1, AAV2 y/o AAV4.

45 Asimismo, las secuencias codificantes Rep (Rep78/68 y Rep52/40) son preferiblemente obtenidas a partir de AAV1, AAV2 y/o AAV4.

Las secuencias que codifican las proteínas virales (VP) proteínas de la cápside VP1, VP2, y VP3 para usar en el contexto del presente divulgación 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 partículas tipo AAV de 50 desarrollo reciente obtenidas mediante, por ejemplo, técnicas de barajado de cápsides y bibliotecas de cápsides de AAV.

[0043] Las secuencias Rep e ITR de AAV son particularmente conservadas entre la mayoría de serotipos.

Las proteínas Rep78 de varios serotipos de AAV son, por ejemplo, idénticas en más de un 89% y la identidad de la 55 secuencia total de nucleótidos a nivel de genoma entre AAV2; AAV3A, AAV3B, y AAV6 es alrededor del 82% (Bantel-Schaal et al., 1999, J. Virol., 73(2):939-947). Por otra parte, se sabe que las secuencias Rep e ITR de muchos serotipos de AAV complementan eficazmente de forma cruzada (es decir, sustituyen funcionalmente) las secuencias correspondientes de otros serotipos en la producción de partículas de AAV en células mamíferas.

60 US2003148506 informa de que las secuencias Rep e ITR de AAV también complementan eficazmente de forma cruzada otras secuencias Rep e ITR de AAV en células de insecto.

[0044] Se sabe que las proteínas VP de AAV determinan el tropismo celular del virión AAV.

Las secuencias codificantes de proteína VP están significativamente menos conservadas que las proteínas y genes Rep entre diferentes serotipos de AAV.

65 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 de la cápside



de un serotipo (por ejemplo, AAV5) y las secuencias Rep y/o ITR de otro serotipo de AAV (por ejemplo, AAV2). Tales partículas rAAV pseudotipadas son una parte de la presente invención.

En este documento, una partícula rAAV pseudotipada puede ser referida como del tipo "x/y", donde "x" indica la fuente de ITRs e "y" indica el serotipo de la cápside, por ejemplo una partícula 2/5 rAAV tiene ITRs de AAV2 y una cápside de AAV5.

Las secuencias "AAV" modificadas también se pueden usar en el contexto de la presente divulgación, por ejemplo, para la producción de vectores rAAV en células de insecto.

Tales secuencias modificadas, por ejemplo, incluyen secuencias que tienen al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o más de identidad de secuencia de nucleótidos y/o de aminoácidos (por ejemplo, una secuencia que tiene desde aproximadamente el 75% hasta aproximadamente el 99% de identidad de secuencia de nucleótidos) con una ITR, Rep o VP de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9, se pueden usar en lugar de secuencias ITR, Rep o VP de tipo salvaje de AAV.

[0045] Aunque similar a otros serotipos de AAV en muchos aspectos, AAV5 difiere de otros serotipos humanos y símicos de AAV más que otros serotipos humanos y símicos conocidos.

En vista de ello, la producción de rAAV5 puede diferir de la producción de otros serotipos en células de insecto.

Donde se emplean métodos de la invención para producir rAAV5, se prefiere que uno o varios constructos que comprenden, colectivamente en el caso de más de un constructo, una secuencia de nucleótidos que comprende una ITR de AAV5, una secuencia de nucleótidos comprende una secuencia codificante Rep de AAV5 (es decir una secuencia de nucleótidos comprende una Rep78 de AAV5).

Tales secuencias ITR y Rep se pueden modificar como se desee para obtener una producción eficaz de vectores rAAV5 o AAV5 pseudotipado en células de insecto.

Por ejemplo, el codón de inicio de las secuencias Rep puede ser modificado, los sitios VP de empalme pueden ser modificados o eliminados, y/o el codón de inicio de VP1 y los nucleótidos cercanos pueden ser modificados para mejorar la producción de vectores rAAV5 en la célula de insecto.

[0046] Los vectores adenovirales preferidos se modifican para reducir la respuesta huésped tal y como es reseñado por Russell (2000, J. Gen. Virol. 81: 2573-2604), o como se describe en US20080008690 y por Zaldumbide y Hoebe (Gene Therapy 2008:239- 246).

[0047] La invención también se refiere así a un virión de parvovirus que comprende un constructo de ácidos nucleicos tal y como se define anteriormente en este documento, y proteína de la cápside de parvovirus tal y como se define anteriormente en este documento.

[0048] En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un método para producir un virión (por ejemplo rAAV) recombinante de parvovirus (que comprende un vector recombinante de parvovirus (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 en este documento, bajo condiciones tales que un vector recombinante de parvovirus (por ejemplo rAAV) sea producido; y, (b) recuperar el vector recombinante de parvovirus (por ejemplo rAAV).

Se entiende aquí que el vector recombinante de parvovirus (rAAV) producido en el método es preferiblemente un virión infeccioso de parvovirus o virión infeccioso AAV que comprende los ácidos nucleicos del vector recombinante de parvovirus (rAAV).

Las condiciones de crecimiento y la producción de productos heterólogos en células de insecto en cultivos son bien conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en las referencias citadas anteriormente sobre ingeniería molecular de células de insectos.

Métodos y constructos preferidos para la producción de viriones rAAV de la invención son descritos en, por ejemplo, WO2007/046703 y WO2007/148971.

[0049] Preferiblemente el método para la producción de viriones recombinantes de parvovirus comprende además el paso de purificación por afinidad de (los viriones que comprenden) el vector recombinante de parvovirus (rAAV) que utiliza un anticuerpo anti-AAV, preferiblemente un anticuerpo inmovilizado.

El anticuerpo anti-AAV es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

Un anticuerpo especialmente adecuado es un anticuerpo de camélido de cadena única o un fragmento del mismo como, por ejemplo, el que se obtiene de camellos o llamas (ver, por ejemplo, Muyldermans, 2001, Biotechnol. 74: 277-302). El anticuerpo para purificación por afinidad de rAAV preferiblemente es un anticuerpo que específicamente enlaza a un epítipo con una proteína de la cápside de AAV, a través de la cual preferiblemente el epítipo es un epítipo que está presente en proteínas de la cápside de más de un serotipo de AAV.

Por ejemplo, el anticuerpo puede ser cultivado o seleccionado basándose en el enlace específico con la cápside de AAV2 pero al mismo tiempo puede también enlazarse específicamente con las cápsides de AAV1, AAV3 y AAV5.

[0050] También, la invención concierne a un virión de parvovirus como se define anteriormente en este documento, para usar como medicamento.

Es decir, la invención proporciona un virión de parvovirus de la invención para usar en el método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

[0051] La invención concierne además a un virión de parvovirus como se define anteriormente en este documento, para usar en el tratamiento de una afección provocada por una deficiencia en la porfobilinógeno deaminasa. Preferiblemente tal afección es porfiria aguda intermitente. Un ácido nucleico o un constructo de ácidos nucleicos de la invención también son adecuados para tal uso.

[0052] Por consiguiente, la invención se refiere a un ácido nucleico, un constructo de ácidos nucleicos o un virión de parvovirus de la invención para usar en la preparación de un medicamento que se use en un método de tratamiento de una afección provocada por una deficiencia de porfobilinógeno deaminasa. Preferiblemente tal afección es porfiria aguda intermitente.

Tal tratamiento puede aliviar, mejorar o reducir la gravedad de uno o varios síntomas de la PAI, por ejemplo, reduciendo la incidencia o gravedad de un ataque.

Por ejemplo, el tratamiento según la invención puede aliviar, mejorar, reducir la gravedad de la disfunción del sistema nervioso, dolor abdominal o trastornos neurovisceral y/o circulatorios.

[0053] Además, la invención concierne a una composición farmacéutica que comprende un virión de parvovirus tal y como se define anteriormente en este documento.

La composición farmacéutica además comprende preferiblemente un portador farmacéuticamente aceptable.

Cualquier portador o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado se puede usar en las presentes composiciones (ver por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, abril 1997). Las formas farmacéuticas preferidas estarían en combinación con una solución salina estéril de dextrosa, o solución tamponada, u otros fluidos estériles farmacéuticamente aceptables. Alternativamente, se puede utilizar un portador sólido, tal como, por ejemplo, perlas de microtransporte.

[0054] Las composiciones farmacéuticas son típicamente estériles y estables bajo las condiciones de producción y almacenamiento.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alojar una alta concentración farmacológica.

El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos.

La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes.

En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, o cloruro sódico.

La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede causar incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

El virión de parvovirus se puede administrar en una formulación de liberación prolongada o controlada, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta u otros portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, incluyendo implantes y sistemas de entrega microencapsulados.

Polímeros biodegradables biocompatibles tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros polilácticos poliglicólicos (PLG) pueden, por ejemplo, ser usados.

[0055] La divulgación también proporciona un método para la entrega en un mamífero de una secuencia de nucleótidos que codifica porfobilinógeno deaminasa, el cual comprende:

a. proporcionar un ácido nucleico, constructo de ácidos nucleicos, virión de parvovirus o composición farmacéutica tal y como se define en este documento; y

b. administrar dicho ácido nucleico, constructo de ácidos nucleicos, virión de parvovirus o composición farmacéutica a un mamífero bajo condiciones que resulten en la expresión de proteína a un nivel que proporcione un efecto terapéutico en dicho mamífero.

[0056] Además, la divulgación se refiere a un método para tratar una afección provocada por una deficiencia de porfobilinógeno deaminasa donde el método comprende el paso de administrar una cantidad eficaz de un ácido nucleico, constructo de ácidos nucleicos, virión de parvovirus o composición farmacéutica tal y como se define anteriormente en este documento a un sujeto con deficiencia de porfobilinógeno deaminasa. Preferiblemente el sujeto sufre de la afección de porfiria aguda intermitente.

[0057] En el tratamiento o terapia según la invención, una afección provocada por una deficiencia en la porfobilinógeno deaminasa es tratada administrando a un sujeto una cantidad eficaz de un ácido nucleico, constructo de ácidos nucleicos, virión de parvovirus o composición farmacéutica tal y como se define en este documento.

[0058] La afección de un paciente que sufre de tal se puede mejorar administrando un virión de parvovirus de la invención.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un virión de parvovirus de la invención se puede dar a un paciente que la necesite.

[0059] El virión de parvovirus estará típicamente incluido en una composición farmacéutica, opcionalmente en combinación con un portador, diluyente y/o adyuvante farmacéutico.

Tales composiciones incluyen el virión de parvovirus en una cantidad eficaz, suficiente para proporcionar un efecto profiláctico o terapéutico deseado, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Una "cantidad eficaz" incluye una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz.

[0060] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado, tal como la elevación de la actividad de PBGD.

10 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un virión de parvovirus o una composición farmacéutica puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del virión de parvovirus o composición farmacéutica para suscitar una respuesta deseada en el individuo.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

15 Una cantidad terapéuticamente eficaz es también típicamente aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del virión de parvovirus o composición farmacéutica es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

[0061] Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado, tal como prevenir o inhibir varias afecciones, incluyendo una afección asociada a una reducción en los niveles de PBGD.

20 Una dosis profiláctica se puede utilizar en sujetos antes, o en una fase temprana, de la enfermedad, y una cantidad profilácticamente eficaz puede ser mayor o menor que una cantidad terapéuticamente eficaz en algunos casos.

[0062] En realizaciones particulares, un rango para cantidades terapéuticamente o profilácticamente eficaces de un ácido nucleico, constructo de ácidos nucleicos, virión de parvovirus o composición farmacéutica puede ser de  $1 \times 10^{12}$  y  $1 \times 10^{13}$  copias de genoma (cg) /kg, por ejemplo de  $1 \times 10^{11}$  a  $1 \times 10^{12}$  cg/kg.

25 Se debe notar que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la enfermedad que se va a aliviar. Para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se pueden ajustar con el tiempo según la necesidad del individuo y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

30 Los rangos de dosificación expuestos aquí son sólo ilustrativos y no limitan los rangos de dosificación que pueden ser seleccionados por profesionales médicos.

[0063] Para vectores de terapia génica, tal como el virión de parvovirus de la presente invención, la dosificación a administrar puede depender en gran parte de la afección y el tamaño del sujeto tratado así como de la formulación terapéutica, la frecuencia del tratamiento y la forma de administración.

35 Los regímenes para terapia continuada, incluyendo dosis, formulación y frecuencia pueden ser guiados por la respuesta inicial y el dictamen clínico.

La vía parenteral de inyección en el espacio intersticial del tejido puede ser preferida, aunque otras vías parenterales, tales como inhalación de una formulación de aerosol, pueden ser requeridas para administración específica.

40 En algunos protocolos, una formulación que comprende el gen y el sistema de entrega del gen en un portador acuoso, se inyecta en el tejido en cantidades apropiadas.

[0064] El tejido diana puede ser específico, por ejemplo, el tejido de hígado, o puede ser una combinación de diferentes tejidos, por ejemplo, los tejidos de músculo e hígado.

45 Ejemplos de tejidos diana pueden incluir hígado, músculo esquelético, músculo de corazón, depósitos adiposos, riñón, pulmón, endotelio vascular, epitelial y/o células hematopoyéticas.

En una realización, el rango de dosis efectiva para animales pequeños (ratones), después de la inyección intramuscular, puede estar entre  $1 \times 10^{12}$  y  $1 \times 10^{13}$  copias de genoma (cg) /kg, y para animales más grandes (gatos) y sujetos humanos, entre  $1 \times 10^{11}$  y  $1 \times 10^{12}$  cg/kg.

50 [0065] La cantidad de ácido nucleico, constructo de ácidos nucleicos, virión de parvovirus o composición farmacéutica activa en las composiciones de la invención pueden variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, diferentes dosis divididas se pueden administrar a lo largo del tiempo o la dosis puede ser proporcionalmente reducida o aumentada según sea indicado por las exigencias de la situación terapéutica.

[0066] Puede ser beneficioso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. "Forma de Dosificación Unitaria" como se utiliza en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

65 La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención puede ser dictada por las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se quiere lograr, y por las limitaciones inherentes

en la técnica de elaborar tal compuesto activo para el tratamiento de una afección en individuos.

[0067] Tal y como se utiliza en este documento "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente" incluye todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

En una realización, el portador es adecuado para administración parenteral, la cual incluye administración intravenosa, intraperitoneal o intramuscular.

Alternativamente, el portador puede ser adecuado para administración oral o sublingual.

Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles.

El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención.

[0068] Compuestos activos suplementarios también pueden ser incorporados en las composiciones farmacéuticas de la invención.

Se puede encontrar orientación sobre la coadministración de tratamientos adicionales, por ejemplo, en el Compendium of Pharmaceutical and Specialties (CPS) de la Canadian Pharmacists Association.

#### Descripción de las figuras

[0069]

Figura 1. Efecto de la dosis de la inyección de AAV2/8-hPBGD en la excreción de precursor del hemo en ratones PAI macho.

Los ratones PAI tienen el 25-30% de la actividad normal de PBGD, que resulta de una interrupción en un alelo de PBGD y una interrupción parcial en el otro alelo.

LUC es el constructo indicador de luciferasa; PBGD es varias dosis del vector rAAV-PBGD.

Expresado como copias de genoma por kilogramo; Pb es fenobarbital.

Figura 2. Excreción urinaria de PBG y ALA en ratones PAI hembra después de ataques agudos inducidos por fenobarbital tras la administración de  $5 \times 10^{12}$  gv/kg del vector terapéutico ssAAV2/8-hPBGD o vector de control ssAAV2/8-Luc.

LUC es constructo indicador de luciferasa; PBGD es varias dosificaciones de constructos de rAAV-PBGD; Pb es fenobarbital.

Figura 3. Expresión del transgén PBGD en el hígado de ratones PAI macho según se ha medido mediante análisis de western blot.

Figura 4. Expresión del transgén PBGD en el hígado de ratones PAI hembra según se ha medido mediante análisis de western blot.

Figura 5. Actividad de PBGD hepática en ratones PAI macho transducidos con ssAAV2/8 en dosis diferentes, 3 meses post-inyección.

Figura 6. Actividad de PBGD hepática en ratones PAI hembra transducidos con el vector ssAAV2/8 portando la luciferasa o el gen PBGD, 3 meses post-inyección.

Figura 7. Comparación de la actividad enzimática *in vivo* de PBGD en ratones de tipo salvaje (ratones wt) y ratones PAI (ratones PAI) tras inyección hidrodinámica de constructos de ADN de plásmido que comprenden la secuencia codificante de PBGD de tipo salvaje (PBGD) y la secuencia codificante de PBGD sintética, es decir, optimizada por codón, de la SEC ID n°: 1 (coPBGD). Los niveles de ADN de vector presentes en el hígado fueron confirmados usando cebadores que se hibridan con el transgén.

Las proporciones basadas en Q-PCR entre las copias de ADN del gen de mantenimiento endógeno GAPDH y el transgén PBGD se indican sobre las actividades enzimáticas de PBGD y no muestran una diferencia significativa.

Figuras 8 y 9. El AAV2/5-PBGD protege ratones macho (figura 8) y hembra (figura 9) contra ataques porfíricos agudos inducidos por fenobarbital.

Los niveles basales de ALA y PBG en ratones PAI así como los niveles de ALA y PBG después del primer, segundo y tercer ataque porfírico agudo inducido por fenobarbital se muestran en ratones tratados con una dosis de  $5 \times 10^{12}$  cg/kg de vector de control (AAV2/5-EalbAAT-Luciferasa) y ratones tratados con  $5 \times 10^{12}$  cg/kg de los vectores AAV8- y AAV5-PBGD.

Figura 10. La actividad enzimática de PBGD en los homogenizados de hígado después de la administración de AAV8-PBGD y AAV5-LUC (n=4-6).

**Figura 11.** A. La actividad enzimática de PBGD en los homogenizados de hígado de ratones PAI macho 1, 2 ó 3 meses después de una única inyección de  $1,25 \times 10^{11}$  cg de vector ssAAV2/5 que porta el ADNc humano de PBGD (wtPBGD) o la PBGD optimizada por codón (coPBGD; SEC ID nº: 1). B. Análisis PCR semicuantitativo de niveles de copia de vector en 1, 2 y 3 meses post- inyección.

C. Análisis de inmunohistoquímico representativo de hígados de animales macho inyectados con un vector ssAAV2/5 que lleva el transgén wtPBGD o el coPBGD bajo el control del promotor específico de hígado.

D. Proporción de células teñidas con anticuerpo PBGD de cada cohorte de animales.

**Figura 12.** Evaluación neurológica de neuropatía periférica en ratones PAI.

El porcentaje de axones grandes ( $5\mu\text{m}$  de diámetro) y densidad de axones se realizó en ratones PAI de ambos géneros que recibieron tres dosis diferentes de rAAV2/8-PBGD. Los no tratados y los de tipo salvaje (WT) actúan como controles.

**Figura 13.** Análisis con rotarod de coordinación motriz y rendimiento muscular de ratón PAI.

La longitud de tiempo que ratones PAI macho y hembra podían permanecer en una barra rotatoria se midió al principio del estudio y tras la inducción de un ataque de porfiria 90 días después de la administración de AAV2/8-PBGD. El ataque porfírico fue inducido mediante inyección intraperitoneal de dosis crecientes de fenobarbital cada 24 horas durante cuatro días.

## Ejemplos

Ejemplo 1: la expresión específica de hígado mediada por AAV de porfobilinógeno deaminasa revierte alteraciones bioquímicas y protege contra la neuropatía motriz en un modelo de ratón de porfiria aguda intermitente

### 1.1 Materiales y métodos.

#### 1.1.1 Modelo Animal

[0070] Los ratones con porfiria aguda intermitente (PAI) fueron generados mediante manipulación génica dirigida como describen Lindberg et al. (Nature Genetics, 1996). Las cepas transgénicas T1 y T2 fueron amablemente proporcionadas por el Prof.

Urs Meier de la Universidad de Basilea y las instalaciones para animales de la Universidad de Navarra han establecido una colonia de estos animales.

En los animales transgénicos T1 un gen de neomicina ha sido insertado en el primer exón del gen PBGD y los animales homocigóticos tienen un 45% de pérdida de la actividad de PBGD en el hígado.

En ratones T2 el gen de neomicina ha sido insertado en el primer intrón del gen PBGD.

La condición homocigota es letal y los animales heterocigóticos muestran un 43% de pérdida de la actividad de PBGD en el hígado.

Ninguna de las cepas mostró signos de porfiria ni excreción urinaria incrementada de precursores del hemo después del tratamiento con fenobarbital (Pb) y/o estradiol (datos no mostrados).

Para reducir adicionalmente la actividad de PBGD, se realizó el cruce de las dos cepas.

Animales heterocigóticos compuestos, portando alelos noqueados tanto para T1 como para T2 se usan como modelo de enfermedad para PAI. Estos ratones exhiben las características bioquímicas típicas de porfiria humana, sobre todo, actividad de PBGD hepática disminuida y excreción urinaria masivamente incrementada de precursores del hemo después del tratamiento con fármacos tales como fenobarbital.

Las porfirinas, principalmente uroporfirina y coproporfirina, son también elevadas en la PAI pero la porfirina urinaria aumentada es una característica mucho menos específica que los incrementos en los niveles de PBG y ALA.

Pruebas de comportamiento tales como la prueba de rotarod revelan función motriz disminuida después de la administración de Pb, y los hallazgos histopatológicos incluyen neuropatía axonal y conducción del nervio disminuida con el envejecimiento.

#### 1.1.2 Vector AAV

##### Plásmidos y secuencias

[0071] Los plásmidos AAV usados en este estudio contienen un casete de expresión flanqueado por dos ITR de AAV2 y una secuencia de relleno apropiada para ajustar el tamaño del genoma de AAV a la capacidad de empaquetamiento óptima descrita para AAV. El casete de expresión transgénico tiene los siguientes elementos: la 5'ITR de AAV2, un promotor específico de hígado EalbAATp con secuencias reguladoras del potenciador de albúmina (Kramer et al., 2003, Mol Ther. 7(3):375-85), el ADNc de PBGD de mantenimiento (GenBank nº acc. X04808) o el gen indicador de luciferasa (GenBank nº acc. M15077).

La secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina [bGH poly(A)] (bases 2326-2533 GenBank nº acc. M57764), un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE) (bases 1021-1750 GenBank nº acc. J04514) se añadió para mejorar la transcripción (Donello et al., 1998 J Virol. 72(6):5085-92) y la 3'ITR de AAV2.

Estos dos plásmidos de AAV fueron denominados ssAAV-polyA-EalbAAT-PBGD-WPRE (expresando el gen

terapéutico) y ssAAV-polyA-EalbAAT- Luciferasa-WPRE (expresando el gen indicador GFP).

#### Preparación de vectores AAV

[0072] Se produjeron vectores AAV2/8 mediante cotransfección mediada por fosfato de calcio en 293 células de tres plásmidos diferentes pAdDeltaF6, p5E18-VD2/8 y el gen terapéutico (AAV-polyA-EalbAAT-PBGD-WPRE) o indicador (AAV- polyA-EalbAAT-Luciferasa-WPRE), (Hermens et al, 1999 Hum. Gene Ther. 10(11):1885-91; y Gao et al 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(18):11854-9). En resumen, 293 células fueron cotransfectadas con pAdDeltaF6, p5E18-VD2/8 y vector diana mediante fosfato cálcico y el virus fue cosechado por congelación-descongelación de las células, 48h después de la transfección.

El virus fue purificado por cromatografía en columna de intercambio iónico y centrifugado en gradiente de iodixanol seguido de filtración y concentración adicional contra la solución salina tamponada con fosfato (PBS)- sacarosa al 5%.

Los títulos de virus en términos de copias de genoma/ml fueron determinados mediante Q-PCR realizados por triplicado, análisis TaqMan (AppliedBiosystems) usando los cebadores pr300fw 5'CCCTGTTTGCTCCTCCGATAA3' pr301rv 5' GTCCGTATTTAAGCAGTGGATCCA 3' que amplifican un fragmento de 95 pares de bases de la región promotora hAAT.

La composición y pureza de las proteínas fue determinada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

#### 1.1.3 Montaje experimental

##### Prueba preliminar

[0073] Para probar la capacidad infecciosa y para evaluar la expresión PBGD del vector AAV2/8, dos animales PAI fueron inyectados con una dosis de  $9 \times 10^{12}$  gv de AAV2/8-PBGD y sacrificados el día 6°.

##### Ensayo demostrativo preliminar

[0074] Evaluamos la transducción de hígado mediada por el AAV2/8 comparando niveles de expresión PBGD en el hígado de ratones PAI después de la inyección de AAV2/8-hBGD. Se inyectó a ratones PAI heterocigóticos compuestos con trasfondo C57Bl/6 de 12 a 25 semanas de edad (10 ratones por grupo, 5 machos y 5 hembras) por vía intravenosa, a través de la vena caudal, con un total de 100-200  $\mu$ l que corresponde a  $5 \times 10^{12}$  gv/kg de AAV2/8-hPBGD o AAV2/8- vector de control de luciferasa.

Dos grupos adicionales de cinco ratones PAI macho (de la misma edad que los anteriores) fueron inyectados con  $5 \times 10^{11}$  gv/kg o  $5 \times 10^{10}$  gv/kg de AAV2/8-hPBGD. Un grupo extra de ratones de tipo salvaje y PAI será incluido. El esquema de dosis se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Dosis de vector (cg) usadas como se determina mediante Q-PCR

vector AAV2/8	cg/ml	cg/ratones	sexo	n
PBGD	1,73E12	1E11	♂	5
			♀	5
		1E10	♂	5
		1E9	♂	5
Luciferasa	1,79E12	1E11	♂	3
			♀	3

[0075] A los quince, veintiocho y noventa días después de la inyección del vector rAAV, el trastorno motor y la acumulación del precursor de porfirina fueron medidos en ratones antes y después del ataque agudo inducido mediante inyección de fenobarbital.

Para esto, se administró fenobarbital (Pb, diluido en una solución salina) intraperitonealmente una vez al día durante 4 días consecutivos con dosis crecientes (75, 80, 85, 90 mg/kg peso corporal).

##### Medición de la conducción nerviosa

[0076] Se efectuaron estudios electrofisiológicos para demostrar degeneración axonal y pérdida de mielina en el nervio ciático.

Dos ratones PAI macho de 6 meses de edad fueron inyectados con  $1 \times 10^{12}$  cg/kg.

Los animales fueron tratados bisemanalmente con dosis repetidas de Pb para acelerar la neuropatía motriz.

Las mediciones de la conducción nerviosa fueron realizadas en animales a los 11 y 14 meses de edad, antes y

después del ataque agudo inducido por Pb.

## 1.2. Resultados

### 1.2.1 Ensayo demostrativo preliminar

#### *Efectos del tratamiento en los niveles de precursores del hemo a lo largo de todo el estudio*

[0077] Quince, veintiocho y noventa días después inyección del virus, los ratones PAI fueron tratados con dosis crecientes de Pb durante 4 días y los niveles de precursores del hemo fueron medidos en la orina.

[0078] Como se esperaba, los ratones PAI macho del grupo de control (AAV-Luc, Figura 1) mostraron excreción aumentada de precursores después de la inyección de Pb, mientras que ninguna variación ocurrió en la excreción de precursores en ratones inyectados con dosis altas de AAV2/8-PBGD (Figura 1). La invalidación completa de la acumulación de ALA y PBG después de la inducción con fenobarbital empezó a 5e11gv/kg en ratones PAI macho (Figura 1). Se observó prevención parcial en machos PAI tratados con 5e10 gv de AAV- PBGD/kg. No hubo cambios en el perfil de excreción de ALA y PBG inducida por fenobarbital dos semanas después de la administración del AAV y al final del estudio (figura 1).

[0079] La administración del vector terapéutico (5e12 gv de AAV2/8-PBGD/kg) en animales hembra también evitó ataques agudos inducidos por Pb, como muestra la escasez de acumulación anormal de precursores de porfirina en la orina (figura 2). En el grupo de control (inyectado con AAV-Luc), los ratones PAI hembra (figura 2) exhibieron menos acumulación de precursor de porfirina que los animales PAI macho (figura 1) debido a una actividad hepática inferior de la enzima limitante de velocidad ALAS 1 en hembras cuando se compara con ratones PAI macho (datos no mostrados).

#### *Efectos de la administración de AAV en el trastorno motor a lo largo de todo el estudio: prueba de Rotarod*

[0080] Como se esperaba, los ratones PAI exhiben trastorno motor cuando son comparados con animales de tipo salvaje.

El trastorno motor en ratones PAI tratados con el vector de control (AAV-Luc) fue exacerbado después de la administración de fenobarbital tanto en machos como en hembras (datos no mostrados).

El trastorno motor inducido por Pb en ratones PAI macho fue casi completamente abolido en animales tratados con el vector terapéutico, tanto al principio (quince y veintiocho días después de la inyección de AAV, datos no mostrados) como al final del estudio.

Animales PAI macho y hembra tratados con ssAAV2/8-hPBGD mostraron protección completa contra el trastorno motor inducido por Pb durante el periodo completo del estudio (quince y veintiocho días después de la inyección de AAV), y al final del estudio (figura 13).

En machos, la extensión de tiempo media que un ratón que recibió el vector de luciferasa pudo permanecer en la barra fue aproximadamente de 200 segundos.

No obstante, tras el ataque porfirico, éste se redujo a ~100 segundos.

En los machos que recibieron las tres dosis diferentes del vector PBGD, los ratones podían permanecer en la barra durante casi tanto tiempo como cuando no experimentaron un ataque, aunque no hasta los niveles inalcanzables del tipo salvaje.

Se encontró lo mismo también en hembras.

#### *Efectos de la administración de ssAAV-hPBGD en el nivel de PBGD del hígado en el momento del sacrificio: análisis de western blot.*

[0081] Como se esperaba, la administración del vector de control (ssAAV-Luc) no aumentó la expresión de PBGD ni en ratones macho (figura 3) ni en hembra (figura 4). En machos, el aumento de la expresión de PBGD hepática dependiente de la dosis fue observado mediante análisis de western blot (figura 3). Diferentes patrones de migración entre PBGD endógena y humana permiten la identificación de la PBGD exógena (figura 3).

[0082] En hembras, se observó expresión alta de PBGD en el hígado de ratones tratados con 5e12 gv/kg de ssAAV-hPBGD (figura 4).

#### *Efectos de la administración de AAV-PBGD en la actividad de PBGD del hígado en el momento del sacrificio*

[0083] La medición de la actividad enzimática confirma que la proteína PBGD expresada por el vector terapéutico está funcionalmente activa (figuras 5 y 6). No se observaron diferencias significativas en la actividad de PBGD ( $p = 0,35$ ) entre machos (figura 5) y hembras (figura 6) inyectados con dosis más altas del vector terapéutico (AAV-PBGD). En machos, se observó un aumento dependiente de la dosis de la actividad de PBGD en el hígado (figura 5). Los ratones administrados con dosis bajas de vector terapéutico (5e10 gv de AAV-PBGD /kg) muestran la misma actividad de PBGD que los animales de tipo salvaje

*Análisis de inmunohistoquímica: distribución de la expresión de PBGD en el hígado*

[0084] La inmunohistoquímica se usó para determinar los niveles de proteína PBGD en células individuales y fue realizada en portaobjetos duplicados para cada grupo de tratamiento.

Para tinción inmunohistoquímica de PBGD se desarrolló un anticuerpo policlonal anti-PBGD en el CIMA. El anticuerpo anti-PBGD reconoce la proteína endógena y la proteína humana exógena mediada por el ssAAV2/8-hPBGD (datos no mostrados).

[0085] El hígado de animales PAI inyectados con el virus de control muestra baja expresión de PBGD en el citoplasma de hepatocitos completos tal y como se detecta mediante análisis de inmunohistoquímica (datos no mostrados).

Esta débil señal en el citoplasma corresponde a la PBGD endógena. Los núcleos celulares fueron contrateñidos mediante hematoxilina para dar un contraste de fondo azul con el color marrón de la reacción positiva (datos no mostrados).

[0086] En ratones PAI macho inyectados con vector terapéutico, se observó un aumento dependiente de la dosis de la expresión de PBGD.

Se observó alta expresión de PBGD en ratones masculinos inyectados con las dosis más altas de virus terapéutico.

El área de fuerte expresión de PBGD se redujo en los animales inyectados con dosis intermedias de virus terapéutico y se redujo a células aisladas en los animales inyectados con dosis bajas de virus.

Estos resultados se correlacionan bien con aquellos obtenidos previamente mediante actividad western y enzimática en los mismos animales.

[0087] No se observó ninguna diferencia significativa en la tinción inmunohistoquímica de PBGD entre machos y hembras inyectados con la misma dosis del vector terapéutico (5e12 gv de AAV-PBGD/kg).

Los machos y hembras que recibieron dosis más altas de vector terapéutico exhibieron una alta expresión de PBGD tanto en el parénquima como alrededor de los vasos (datos no mostrados).

[0088] Se alegó que la PBGD estaba localizada en el citoplasma de las células, no obstante se ha alegado previamente que la PBGD se importa al núcleo de varias líneas celulares y células principales (Grünberg-Etkovitz et al. 2006, Biochem Biophys Acta.1762(9):819-27). En nuestros ratones inyectados con el virus de control, la mayoría de los núcleos exhibían una mancha azul característica (debida a la hematoxilina) y unos pocos núcleos estaban inmunoteñidos de marrón (debido a la DAB; datos no mostrados).

No obstante, en nuestros ratones inyectados con AAV-PBGD se observó una proporción alta de marrón, reflejando una alta distribución nuclear de proteína PBGD.

La proporción de núcleos positivos de alta PBGD fue medida en diferentes grupos.

Nuevamente, se observó en machos un aumento que dependía de la dosis de los hepatocitos que expresan proteína PBGD altamente nuclear.

*Evaluación neurológica de la neuropatía periférica*

[0089] En otro aspecto, hemos realizado una evaluación neurológica de la neuropatía periférica en ratones PAI que incluía análisis histológico de nervios ciáticos (datos no mostrados) y estudios funcionales de potencial motor evocado por estimulación proximal del nervio ciático (datos no mostrados).

La densidad normal de axones observada en animales PAI transducidos con el vector rAAV2/8-PBGD ha sugerido que la sobreexpresión de hPBGD en el hígado facilitó la regeneración axonal del nervio ciático en ratones PAI (figura 12).

[0090] Se llevaron a cabo estudios electrofisiológicos para demostrar la degeneración axonal y la pérdida de mielina en el nervio ciático.

Esto muestra que la expresión a largo plazo del transgén PBGD protege contra el bloqueo funcional inducido mediante administración de fenobarbital.

El potencial motor evocado por estimulación proximal del nervio ciático en ratones de tipo salvaje, jóvenes PAI, viejos PAI y PAI, transducidos con rAAV2/8-PBGD antes y después de siete ataques agudos de porfiria inducidos mediante fenobarbital muestra restauración de la función en términos de estado latente, duración y amplitud (datos no mostrados).

Ejemplo 2: Actividad enzimática in vivo incrementada de ADNc de PBGD optimizado por codón

2.1 Construcción de los plásmidos usados para inyección hidrodinámica y entrega del gen AAV con wtPBGD y coPBGD

[0091] Los plásmidos usados en este estudio contienen casetes de expresión con los siguientes elementos en un orden 5' a 3': un promotor específico de hígado EalbAATp con secuencias reguladoras del potenciador de albúmina (Kramer et al., 2003, Mol Ther. 7(3):375-85), el ADNc de mantenimiento (es decir, no eritroide) de PBGD (GenBank nº acc. X04808).



La 3' UTR de PBGD (bases 1463-1487 GenBank nº acc. NM 000190) y la secuencia de poliadenilación de PBGD [poly(A) PBGD] (bases 9586- 9629 GenBank nº acc. M95623).

Los dos plásmidos que contienen estos casetes de expresión son denominados psl1180-pAAT- PBGD-PolyA PBGD y psl1180-pAAT-coPBGD-PolyA PBGD y difieren sólo en la secuencia codificante de PBGD como se explica más adelante.

[0092] Para generar una PBGD optimizado por codón, la secuencia de GenBank nº NM 000190 que corresponde con el ADNc no eritroide de PBGD humano fue adaptada en el uso de codones al sesgo del Homo sapiens (valor del índice de adaptación de codones 0,97).

Otras modificaciones en la secuencia codificante de coPBGD incluían: 1) se introdujo una secuencia de Kozak para aumentar la iniciación traduccional; 2) dos codones de parada fueron añadidos para asegurar una terminación eficaz; y 3) el contenido de CG fue aumentado del 55% al 65%.

El ADNc final de coPBGD, después de la optimización, tiene 195 cambios de pares de bases y un 82,1% de homología con la secuencia de ADNc original nº NM 000190.

Esta secuencia (SEC ID nº: 1) fue sintetizada y subclonada en el plásmido psl1180- pAAT-PBGD-PolyA PBGD reemplazando la secuencia del ADNc de wtPBGD. El nuevo plásmido generado fue denominado psl1180-pAAT-coPBGD-PolyA PBGD.

[0093] Toda la secuencia del casete de expresión de los plásmidos psl1180-pAAT-PBGD-PolyA PBGD y psl1180-pAAT-coPBGD-PolyA PBGD fue subclonada en el plásmido pVD155, un plásmido que contiene las dos ITR de AAV2.

Los plásmidos resultantes, denominados pVD153 y pVD191, fueron cada uno de ellos cotransfectados con un genoma de baculovirus parental en células SF9 para generar los baculovirus recombinantes Bac.VD153 y Bac.VD191.

Estos baculovirus se usaron para generar vectores AAV5 en células de insecto.

En resumen, se coinfectaron células SF9+ con 3 baculovirus recombinantes diferentes: Bac.VD92; Bac.VD88 y Bac.VD153 (baculovirus que contienen el EalbAAT-PBGD-polyA terapéutico).

Para la producción de un vector AAV5 que contiene el casete de expresión EalbAAT-coPBGD-polyA se usó el baculovirus Bac.VD191 en lugar de Bac.VD153.

[0094] El vector AAV5 fue cosechado mediante congelación-descongelación de las células, 72 h después la infección.

El vector fue purificado por cromatografía de afinidad en columna seguida de filtración y concentración adicional.

Los títulos de virus en términos de copias de genoma/ml fueron determinados mediante análisis Q-PCR de TaqMan, (AppliedBiosystems) usando el cebador hAAT taq inverso 5'CAGCGTCCTGTGTCCAAGGT3', el cebador hAAT taq directo 5'AGGCCAACTTGTCTACGTTTAGTATG3' (ambos de MWG- Biotech AG) y la sonda hAAT 5'CTGTAGATCTGTACCCGCCACCCCC3' (MWG- Biotech AG).

La composición proteínica y la pureza se determinaron mediante SDS-PAGE.

## 2.2 Ensayos enzimáticos de PBGD

[0095] La actividad PBGD en los homogenizados de tejidos fue determinada midiendo la conversión de PBG a uroporfirina según el método de Anderson y Desnick (Anderson PM, Desnick RJ., 1982, Enzyme, 28(2-3):146-57). En resumen, 1 g de tejido fue homogeneizado a 4°C en 4 volúmenes de una solución al 1,15% de KCl.

El homogeneizado fue centrifugado a 12.000 r.p.m. a 4°C durante 20 minutos y el sobrenadante limpio sin ningún resto celular fue usado el mismo día para la determinación de proteínas (Bradford utilizando un estándar de albúmina) y la actividad de PBGD.

[0096] Las muestras sobrenadantes fueron diluidas 1:3 con tampón fosfato (pH 7,6), DTT, Cl<sub>2</sub>Mg y Tritón X-100; y 100 µl de esta mezcla fueron preincubados con 1,8 ml de Tris-HCl 0,1M (pH 8,1) durante 3 min a 37°C. A continuación, la mezcla fue incubada a oscuras con 0,5 ml de 1 mM de sustrato PBG durante 60 minutos a 37°C. La reacción fue detenida con 350 µl de ATC frío al 40% y el uroporfirinógeno formado fue oxidado a uroporfirina después de la exposición a la luz.

Las uroporfirinas fueron medidas de forma cuantitativa utilizando un espectrofluorímetro con un pico de excitación ( $\lambda_{ext}$ ) a 405 nm y valores del pico de emisión de ventana ( $\lambda_{em}$ ) entre 550-660 nm. La actividad de PBGD fue expresada en términos pmol de uroporfirina/mg de proteína/hora usando estándares apropiados.

## 2.3 Inyección hidrodinámica de plásmidos de PBGD y coPBGD

[0097] 50 µg de cada plásmido psl1180-pAAT-PBGD-PolyA PBGD o psl1180-pAAT-coPBGD-PolyA PBGD disueltos en 2,5 ml de PBS fueron inyectados hidrodinámicamente en la vena caudal lateral de ratones PAI (n=4) para entregar el plásmido en el hígado.

Los ratones fueron sacrificados 1 semana después de la inyección y se determinó la actividad enzimática de PBGD en el hígado y los homogenizados de riñón.

[0098] La enzima coPBGD expresada por los hepatocitos después de la entrega hidrodinámica del plásmido

psl1180-pAAT-coPBGD-polyA PBGD resultó en un 30% más de PBGD activa en los homogenizados de hígado en comparación con ratones que recibieron el plásmido de tipo salvaje (wtPBGD) pul1180-pAAT-PBGD-PolyA PBGD. Los valores de la actividad de PBGD expresados como pmol de uroporfirina/mg de proteína/hora fueron  $5,54 \pm 1,64$  y  $7,30 \pm 0,913$  para wtPBGD y coPBGD respectivamente ( $p=0,0317$ , test de Mann Whitney de dos colas).

Los niveles de vector de ADN presentes en el hígado fueron confirmados mediante Q-PCR usando cebadores que se hibridan con el transgén.

Se calculó una proporción entre las copias de ADN del gen de mantenimiento endógeno GADPH y las copias de ADN del transgén PBGD en cada ratón.

Las proporciones de ADN ( $2,950 \pm 2,25$  y  $1,760 \pm 0,6804$  para PBGD y coPBGD respectivamente) no mostraron ninguna diferencia significativa y demostraron que aproximadamente el mismo número de copias del vector terapéutico había sido entregado en el hígado mediante inyección hidrodinámica.

Los datos se representan en la figura 7.

#### 2.4 Estudio demostrativo preliminar para terapia génica de PBGD con un vector PBGD-AAV2/5 en ratones PAI

[0099] Los ratones PAI descritos antes en la sección 1.1.1 fueron usados para comprobar el efecto terapéutico del AAV2/5-EalbAAT- PBGD-PolyA.

[0100] Una dosis de  $5 \times 10^{12}$  cg/kg de AAV2/5-EalbAAT-PBGD fue inyectada por vía intravenosa en ratones PAI (machos y hembras). Los animales de control recibieron el mismo vector pero portando el gen indicador de luciferasa.

Dos, cuatro y trece semanas después de la administración de AAV2/5-EalbAAT-PBGD, los animales fueron tratados con dosis crecientes de Pb durante 4 días para inducir el ataque porfírico.

Veinticuatro horas después de la última dosis de Pb, los niveles de precursores del hemo fueron medidos en muestras de orina de 24 horas y la coordinación motriz fue analizada utilizando la prueba Rotarod.

Los ratones fueron sacrificados tres meses después de la administración de AAV para cuantificar la cantidad de PBGD producida en el hígado.

[0101] Los niveles basales de ALA y PBG en ratones PAI fueron:  $88 \pm 24$  y  $16 \pm 5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de creatinina en machos y  $87 \pm 19$  y  $14 \pm 8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de creatinina en hembras.

Una dosis de  $5 \times 10^{12}$  cg/kg fue capaz de prevenir el efecto del Pb en los precursores de ALA y PBG tanto en machos ( $118 \pm 34$  y  $11 \pm 4$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de creatinina) como en hembras ( $52 \pm 5$  y  $51 \pm 24$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de creatinina) como se muestra en la figura 8 (machos) y figura 9 (hembras). Los animales tratados con la misma dosis de un AAV2/5-EalbAAT- luciferasa mostraron una excreción alta de precursores de ALA y PBG después de la inyección de Pb ( $1418 \pm 659$  y  $1184 \pm 585$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de creatinina en machos y  $295 \pm 91$  y  $298 \pm 181$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de creatinina en hembras).

[0102] El trastorno motor inducido mediante tratamiento de Pb en ratones PAI fue casi completamente abolido en animales tratados con el vector terapéutico, según se midió en la prueba de Rotarod (datos no mostrados).

[0103] Tres meses después de la administración de AAV, todos los animales fueron sacrificados y la actividad de PBGD enzimática fue medida en los hígados de todos los animales (figura 10).

Los machos inyectados con una dosis de  $5 \times 10^{12}$  gc/kg de AAV5-EalbAAT-PBGD expresaron  $26,1 \pm 7,3$  pmol uro/mg proteína/h de PBGD en el hígado.

Esta cantidad representa una sobreexpresión 10 veces mayor cuando se compara con ratones PAI que reciben el gen indicador Luc ( $2,4 \pm 0,4$  pmol uro/mg proteína/h) y 3 veces los niveles de ratones de tipo salvaje ( $7,9 \pm 1,6$  pmol uro/mg proteína/h).

Una dosis de  $5 \times 10^{12}$  cg/kg reveló diferencias en la actividad enzimática de PBGD del hígado en hembras ( $18,5 \pm 6,3$  pmol uro/mg proteína/h).

#### 2.5 Expresión específica de hígado mediada por AAV5 de PBGD y coPBGD en ratones PAI

[0104] Evaluamos la transducción del hígado mediada por AAV5 comparando los niveles de la expresión de PBGD en el hígado de ratones PAI después de la inyección de AAV2/5-PBGD o AAV2/5-coPBGD. Los ratones PAI macho con trasfondo C57Bl/6 de 12 a 25 semanas de edad fueron inyectados por vía intravenosa con un total de 200  $\mu\text{l}$  que corresponden a  $1,25 \times 10^{11}$  gv de AAV2/5-PBGD ( $n=22$ ) o AAV2/5- coPBGD ( $n=24$ ). 1, 2 y 3 meses después de la inyección del virus, los ratones fueron sacrificados y los hígados fueron recogidos para determinar la actividad enzimática de PBGD en los homogenizados de hígado.

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EEM de PBGD y se realizó la comparación entre las medias usando el test de Mann Whitney (figura 11 A). Según Lindberg et al., Nature Genetics 12: 195-199, 1996, los ratones PAI expresaron solo el 30% de la actividad enzimática de PBGD en el hígado en comparación con ratones wt ( $2,53 \pm 0,15$  vs  $7,94 \pm 0,94$  pmol uro/mg proteína/h, respectivamente).

Además, los niveles de expresión de la PBGD después de la transferencia de genes de AAV2/5-PBGD y AAV2/5-coPBGD fueron estadísticamente diferentes en todos los puntos después de la administración.  $64,00 \pm 5,99$  vs  $86,23 \pm 6,82$  para AAV2/5-PBGD y AAV2/5-coPBGD respectivamente después de 1 mes de infección ( $p=0,019$ ) y  $78,98 \pm 9,69$  vs  $111,50 \pm 10,20$  para AAV2/5-PBGD y AAV2/5-coPBGD respectivamente después de 2 meses de infección ( $p=0,038$ ). Los valores de actividad enzimática en los hígados murinos se muestran en la figura 11.A.

[0105] Se realizó el análisis de PCR semicuantitativo del genoma del vector AAV.

Los niveles a 1, 2 y 3 meses post-inyección fueron determinados y se muestran en la figura 11.B. y los datos de Q-PCR corroboran que la cantidad de plásmido vírico fue similar en ambas cohortes de animales. El análisis inmunohistoquímico del hígado con anticuerpos de PBGD específicos revelaron el 17% y 21 % de expresión de células de PBGD en ratones infectados con AAV2/5-PBGD y AAV2/5-coPBGD respectivamente (figura 11.C y D) representando esencialmente eficacias de transducción similares, que fueron mantenidas durante el periodo de estudio de 3 meses.

#### LISTA DE SECUENCIAS

[0106]

<110> Proyecto de Biomedicina CIMA S.L. Amsterdam Molecular Therapeutics (AMT) B.V.

<120> Terapia génica de porfobilinógeno deaminasa

<130> P6021400PCT

<150> EP 08165393.3

<151> 2008-09-29

<150> US 61/100,881

<151> 2008-09-29

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1089

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de codificación optimizada

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1083)

<400> 1

ES 2 507 540 T3

atg Met 1	agc Ser	ggc Gly	aac Asn	ggc Gly 5	aac Asn	gcc Ala	gca Ala	gcc Ala	acc Thr 10	gcc Ala	gag Glu	gaa Glu	aac Asn	agc Ser 15	ccc Pro	48
aag Lys	atg Met	cgg Arg	gtg Val 20	atc Ile	aga Arg	gtg Val	ggc Gly	acc Thr 25	cgg Arg	aag Lys	agc Ser	cag Gln	ctg Leu 30	gcc Ala	cgg Arg	96
atc Ile	cag Gln	acc Thr 35	gac Asp	agc Ser	gtg Val	gtg Val	gcc Ala 40	acc Thr	ctg Leu	aag Lys	gcc Ala	tcc Ser 45	tac Tyr	ccc Pro	ggc Gly	144
ctg Leu	cag Gln 50	ttc Phe	gag Glu	atc Ile	att Ile	gcc Ala 55	atg Met	agc Ser	acc Thr	acc Thr	ggc Gly 60	gac Asp	aag Lys	atc Ile	ctg Leu	192
gac Asp 65	acc Thr	gcc Ala	ctg Leu	agc Ser	aag Lys 70	atc Ile	ggc Gly	gag Glu	aag Lys	agc Ser 75	ctg Leu	ttc Phe	aca Thr	aaa Lys	gag Glu 80	240
ctg Leu	gaa Glu	cac His	gcc Ala	ctg Leu 85	gaa Glu	aag Lys	aac Asn	gag Glu	gtg Val 90	gac Asp	ctg Leu	gtg Val	gtg Val	cac His 95	agc Ser	288
ctg Leu	aag Lys	gac Asp	ctg Leu 100	ccc Pro	acc Thr	gtg Val	ctg Leu	ccc Pro 105	cct Pro	ggc Gly	ttc Phe	acc Thr	atc Ile 110	ggc Gly	gcc Ala	336
atc Ile	tgc Cys	aag Lys 115	aga Arg	gag Glu	aac Asn	ccc Pro	cac His 120	gac Asp	gcc Ala	gtg Val	gtg Val	ttc Phe 125	cac His	cct Pro	aag Lys	384
ttc Phe	gtg Val 130	ggc Gly	aag Lys	aca Thr	ctg Leu	gaa Glu 135	acc Thr	ctg Leu	ccc Pro	gag Glu	aag Lys 140	tcc Ser	gtg Val	gtg Val	ggc Gly	432

acc	agc	agc	ctg	cgg	aga	gcc	gcc	cag	ctg	cag	cgg	aag	ttc	ccc	cac	480
Thr	Ser	Ser	Leu	Arg	Arg	Ala	Ala	Gln	Leu	Gln	Arg	Lys	Phe	Pro	His	
145					150					155					160	
ctg	gaa	ttt	cgg	agc	atc	cgg	ggc	aac	ctg	aac	acc	cgg	ctg	cgg	aag	528
Leu	Glu	Phe	Arg	Ser	Ile	Arg	Gly	Asn	Leu	Asn	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	
				165					170					175		
ctg	gac	gag	cag	cag	gaa	ttt	tcc	gct	atc	atc	ctg	gcc	aca	gcc	gga	576
Leu	Asp	Glu	Gln	Gln	Glu	Phe	Ser	Ala	Ile	Ile	Leu	Ala	Thr	Ala	Gly	
			180					185					190			
ctg	cag	cgg	atg	ggc	tgg	cac	aac	aga	gtg	ggc	cag	atc	ctg	cac	ccc	624
Leu	Gln		Met	Gly	Trp	His	Asn	Arg	Val	Gly	Gln	Ile	Leu	His	Pro	
		195					200					205				
gag	gaa	tgc	atg	tac	gcc	gtg	ggc	cag	gga	gcc	ctg	ggc	gtg	gaa	gtg	672
Glu	Glu	Cys	Met	Tyr	Ala	Val	Gly	Gln	Gly	Ala	Leu	Gly	Val	Glu	Val	
	210					215					220					
cgg	gcc	aag	gac	cag	gac	atc	ctg	gat	ctg	gtg	ggc	gtg	ctg	cat	gac	720
Arg	Ala	Lys	Asp	Gln	Asp	Ile	Leu	Asp	Leu	Val	Gly	Val	Leu	His	Asp	
225					230					235					240	
ccc	gag	aca	ctg	ctg	cgg	tgt	atc	gcc	gag	cgg	gcc	ttc	ctg	cgg	cac	768
Pro	Glu	Thr	Leu	Leu	Arg	Cys	Ile	Ala	Glu	Arg	Ala	Phe	Leu	Arg	His	
				245					250					255		
ctg	gaa	ggc	ggc	tgc	agc	gtg	ccc	gtg	gcc	gtg	cac	acc	gcc	atg	aag	816
Leu	Glu	Gly	Gly	Cys	Ser	Val	Pro	Val	Ala	Val	His	Thr	Ala	Met	Lys	
			260					265					270			
gac	gga	cag	ctg	tac	ctg	aca	ggc	ggc	gtg	tgg	agc	ctg	gac	ggc	agc	864
Asp	Gly	Gln	Leu	Tyr	Leu	Thr	Gly	Gly	Val	Trp	Ser	Leu	Asp	Gly	Ser	
		275					280					285				
gac	agc	atc	cag	gag	acc	atg	cag	gcc	acc	atc	cac	gtg	ccc	gcc	cag	912
Asp	Ser	Ile	Gln	Glu	Thr	Met	Gln	Ala	Thr	Ile	His	Val	Pro	Ala	Gln	
	290					295					300					
cac	gag	gac	ggc	ccc	gag	gac	gac	cct	cag	ctg	gtc	ggc	atc	acc	gcc	960
His	Glu	Asp	Gly	Pro	Glu	Asp	Asp	Pro	Gln	Leu	Val	Gly	Ile	Thr	Ala	
305					310					315					320	
cgg	aac	atc	ccc	aga	ggc	ccc	cag	ctg	gcc	gcc	cag	aac	ctg	ggc	atc	1008
Arg	Asn	Ile	Pro	Arg	Gly	Pro	Gln	Leu	Ala	Ala	Gln	Asn	Leu	Gly	Ile	
				325					330					335		
agc	ctg	gcc	aac	ctg	ctg	ctg	tcc	aag	ggc	gcc	aag	aac	atc	ctg	gac	1056
Ser	Leu	Ala	Asn	Leu	Leu	Leu	Ser	Lys	Gly	Ala	Lys	Asn	Ile	Leu	Asp	
			340					345					350			
gtg	gcc	cgg	cag	ctg	aac	gac	gcc	cac	tgatga							1089
Val	Ala	Arg	Gln	Leu	Asn	Asp	Ala	His								
		355					360									

<210> 2  
 <211> 361  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Construcción Sintética

<400> 2

## ES 2 507 540 T3

Met Ser Gly Asn Gly Asn Ala Ala Ala Thr Ala Glu Glu Asn Ser Pro  
1 5 10 15

ES 2 507 540 T3

Lys Met Arg Val Ile Arg Val Gly Thr Arg Lys Ser Gln Leu Ala Arg  
 20 25 30  
 Ile Gln Thr Asp Ser Val Val Ala Thr Leu Lys Ala Ser Tyr Pro Gly  
 35 40 45  
 Leu Gln Phe Glu Ile Ile Ala Met Ser Thr Thr Gly Asp Lys Ile Leu  
 50 55 60  
 Asp Thr Ala Leu Ser Lys Ile Gly Glu Lys Ser Leu Phe Thr Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Glu His Ala Leu Glu Lys Asn Glu Val Asp Leu Val Val His Ser  
 85 90 95  
 Leu Lys Asp Leu Pro Thr Val Leu Pro Pro Gly Phe Thr Ile Gly Ala  
 100 105 110  
 Ile Cys Lys Arg Glu Asn Pro His Asp Ala Val Val Phe His Pro Lys  
 115 120 125  
 Phe Val Gly Lys Thr Leu Glu Thr Leu Pro Glu Lys Ser Val Val Gly  
 130 135 140  
 Thr Ser Ser Leu Arg Arg Ala Ala Gln Leu Gln Arg Lys Phe Pro His  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Phe Arg Ser Ile Arg Gly Asn Leu Asn Thr Arg Leu Arg Lys  
 165 170 175  
 Leu Asp Glu Gln Gln Glu Phe Ser Ala Ile Ile Leu Ala Thr Ala Gly  
 180 185 190  
 Leu Gln Arg Met Gly Trp His Asn Arg Val Gly Gln Ile Leu His Pro  
 195 200 205  
 Glu Glu Cys Met Tyr Ala Val Gly Gln Gly Ala Leu Gly Val Glu Val  
 210 215 220  
 Arg Ala Lys Asp Gln Asp Ile Leu Asp Leu Val Gly Val Leu His Asp  
 225 230 235 240  
 Pro Glu Thr Leu Leu Arg Cys Ile Ala Glu Arg Ala Phe Leu Arg His  
 245 250 255  
 Leu Glu Gly Gly Cys Ser Val Pro Val Ala Val His Thr Ala Met Lys  
 260 265 270  
 Asp Gly Gln Leu Tyr Leu Thr Gly Gly Val Trp Ser Leu Asp Gly Ser  
 275 280 285

Asp Ser Ile Gln Glu Thr Met Gln Ala Thr Ile His Val Pro Ala Gln  
290 295 300

His Glu Asp Gly Pro Glu Asp Asp Pro Gln Leu Val Gly Ile Thr Ala  
305 310 315 320

Arg Asn Ile Pro Arg Gly Pro Gln Leu Ala Ala Gln Asn Leu Gly Ile  
325 330 335

Ser Leu Ala Asn Leu Leu Leu Ser Lys Gly Ala Lys Asn Ile Leu Asp  
340 345 350

Val Ala Arg Gln Leu Asn Asp Ala His  
355 360

<210> 3  
<211> 1038  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> secuencia de codificación optimizada

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1032)

<400> 3



# ES 2 507 540 T3

atg Met 1	cgg Arg	gtg Val	atc Ile	aga Arg 5	gtg Val	ggc Gly	acc Thr	cgg Arg	aag Lys 10	agc Ser	cag Gln	ctg Leu	gcc Ala	cgg Arg 15	atc Ile	48
cag Gln	acc Thr	gac Asp	agc Ser 20	gtg Val	gtg Val	gcc Ala	acc Thr	ctg Leu 25	aag Lys	gcc Ala	tcc Ser	tac Tyr	ccc Pro 30	ggc Gly	ctg Leu	96
cag Gln	ttc Phe	gag Glu 35	atc Ile	att Ile	gcc Ala	atg Met	agc Ser 40	acc Thr	acc Thr	ggc Gly	gac Asp	aag Lys 45	atc Ile	ctg Leu	gac Asp	144
acc Thr	gcc Ala 50	ctg Leu	agc Ser	aag Lys	atc Ile	ggc Gly 55	gag Glu	aag Lys	agc Ser	ctg Leu	ttc Phe 60	aca Thr	aaa Lys	gag Glu	ctg Leu	192
gaa Glu 65	cac His	gcc Ala	ctg Leu	gaa Glu	aag Lys 70	aac Asn	gag Glu	gtg Val	gac Asp	ctg Leu 75	gtg Val	gtg Val	cac His	agc Ser	ctg Leu 80	240
aag Lys	gac Asp	ctg Leu	ccc Pro	acc Thr 85	gtg Val	ctg Leu	ccc Pro	cct Pro	ggc Gly 90	ttc Phe	acc Thr	atc Ile	ggc Gly	gcc Ala 95	atc Ile	288
tgc Cys	aag Lys	aga Arg	gag Glu 100	aac Asn	ccc Pro	cac His	gac Asp	gcc Ala 105	gtg Val	gtg Val	ttc Phe	cac His	cct Pro 110	aag Lys	ttc Phe	336
gtg Val	ggc Gly	aag Lys 115	aca Thr	ctg Leu	gaa Glu	acc Thr	ctg Leu 120	ccc Pro	gag Glu	aag Lys	tcc Ser	gtg Val 125	gtg Val	ggc Gly	acc Thr	384
agc Ser	agc Ser	ctg Leu	cgg Arg	aga Arg	gcc Ala	gcc Ala	cag Gln	ctg Leu	cag Gln	cgg Arg	aag Lys	ttc Phe	ccc Pro	cac His	ctg Leu	432

130	135	140	
gaa ttt cgg agc atc cgg ggc aac ctg aac acc cgg ctg cgg aag ctg Glu Phe Arg Ser Ile Arg Gly Asn Leu Asn Thr Arg Leu Arg Lys Leu 145 150 155 160			480
gac gag cag cag gaa ttt tcc gct atc atc ctg gcc aca gcc gga ctg Asp Glu Gln Gln Glu Phe Ser Ala Ile Ile Leu Ala Thr Ala Gly Leu 165 170 175			528
cag cgg atg ggc tgg cac aac aga gtg ggc cag atc ctg cac ccc gag Gln Arg Met Gly Trp His Asn Arg Val Gly Gln Ile Leu His Pro Glu 180 185 190			576
gaa tgc atg tac gcc gtg ggc cag gga gcc ctg ggc gtg gaa gtg cgg Glu Cys Met Tyr Ala Val Gly Gln Gly Ala Leu Gly Val Glu Val Arg 195 200 205			624
gcc aag gac cag gac atc ctg gat ctg gtg ggc gtg ctg cat gac ccc Ala Lys Asp Gln Asp Ile Leu Asp Leu Val Gly Val Leu His Asp Pro 210 215 220			672
gag aca ctg ctg cgg tgt atc gcc gag cgg gcc ttc ctg cgg cac ctg Glu Thr Leu Leu Arg Cys Ile Ala Glu Arg Ala Phe Leu Arg His Leu 225 230 235 240			720
gaa ggc ggc tgc agc gtg ccc gtg gcc gtg cac acc gcc atg aag gac Glu Gly Gly Cys Ser Val Pro Val Ala Val His Thr Ala Met Lys Asp 245 250 255			768
gga cag ctg tac ctg aca ggc ggc gtg tgg agc ctg gac ggc agc gac Gly Gln Leu Tyr Leu Thr Gly Gly Val Trp Ser Leu Asp Gly Ser Asp 260 265 270			816
agc atc cag gag acc atg cag gcc acc atc cac gtg ccc gcc cag cac Ser Ile Gln Glu Thr Met Gln Ala Thr Ile His Val Pro Ala Gln His 275 280 285			864
gag gac ggc ccc gag gac gac cct cag ctg gtc ggc atc acc gcc cgg Glu Asp Gly Pro Glu Asp Asp Pro Gln Leu Val Gly Ile Thr Ala Arg 290 295 300			912
aac atc ccc aga ggc ccc cag ctg gcc gcc cag aac ctg ggc atc agc Asn Ile Pro Arg Gly Pro Gln Leu Ala Ala Gln Asn Leu Gly Ile Ser 305 310 315 320			960
ctg gcc aac ctg ctg ctg tcc aag ggc gcc aag aac atc ctg gac gtg Leu Ala Asn Leu Leu Leu Ser Lys Gly Ala Lys Asn Ile Leu Asp Val 325 330 335			1008
gcc cgg cag ctg aac gac gcc cac tgatga Ala Arg Gln Leu Asn Asp Ala His 340			1038

<210> 4  
<211> 344  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Construcción Sintética

<400> 4

Met Arg Val Ile Arg Val Gly Thr Arg Lys Ser Gln Leu Ala Arg Ile  
1 5 10 15

# ES 2 507 540 T3

Gln Thr Asp Ser Val Val Ala Thr Leu Lys Ala Ser Tyr Pro Gly Leu  
 20 25 30  
 Gln Phe Glu Ile Ile Ala Met Ser Thr Thr Gly Asp Lys Ile Leu Asp  
 35 40 45  
 Thr Ala Leu Ser Lys Ile Gly Glu Lys Ser Leu Phe Thr Lys Glu Leu  
 50 55 60  
 Glu His Ala Leu Glu Lys Asn Glu Val Asp Leu Val Val His Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Asp Leu Pro Thr Val Leu Pro Pro Gly Phe Thr Ile Gly Ala Ile  
 85 90 95  
 Cys Lys Arg Glu Asn Pro His Asp Ala Val Val Phe His Pro Lys Phe  
 100 105 110  
 Val Gly Lys Thr Leu Glu Thr Leu Pro Glu Lys Ser Val Val Gly Thr  
 115 120 125  
 Ser Ser Leu Arg Arg Ala Ala Gln Leu Gln Arg Lys Phe Pro His Leu  
 130 135 140  
 Glu Phe Arg Ser Ile Arg Gly Asn Leu Asn Thr Arg Leu Arg Lys Leu  
 145 150 155 160  
 Asp Glu Gln Gln Glu Phe Ser Ala Ile Ile Leu Ala Thr Ala Gly Leu  
 165 170 175  
 Gln Arg Met Gly Trp His Asn Arg Val Gly Gln Ile Leu His Pro Glu  
 180 185 190  
 Glu Cys Met Tyr Ala Val Gly Gln Gly Ala Leu Gly Val Glu Val Arg  
 195 200 205  
 Ala Lys Asp Gln Asp Ile Leu Asp Leu Val Gly Val Leu His Asp Pro  
 210 215 220  
 Glu Thr Leu Leu Arg Cys Ile Ala Glu Arg Ala Phe Leu Arg His Leu  
 225 230 235 240  
 Glu Gly Gly Cys Ser Val Pro Val Ala Val His Thr Ala Met Lys Asp  
 245 250 255  
 Gly Gln Leu Tyr Leu Thr Gly Gly Val Trp Ser Leu Asp Gly Ser Asp  
 260 265 270  
 Ser Ile Gln Glu Thr Met Gln Ala Thr Ile His Val Pro Ala Gln His  
 275 280 285  
 Glu Asp Gly Pro Glu Asp Asp Pro Gln Leu Val Gly Ile Thr Ala Arg

290

295

300

Asn Ile Pro Arg Gly Pro Gln Leu Ala Ala Gln Asn Leu Gly Ile Ser  
305 310 315 320

Leu Ala Asn Leu Leu Leu Ser Lys Gly Ala Lys Asn Ile Leu Asp Val  
325 330 335

Ala Arg Gln Leu Asn Asp Ala His  
340

<210> 5

<211> 673

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Promotor AAT humano combinado con el elemento potenciador del gen de albúmina de ratón (Ealb)

10 <400> 5

tcgagggtcc tagattacac tacacattct gcaagcatag cacagagcaa tgttctactt 60  
taattacttt cattttcttg tatcctcaca gcctagaaaa taacctgcgt tacagcatcc 120  
actcagtatc ccttgagcat gaggtgacac tacttaacat agggacgaga tggacttttg 180  
tgtctcctgc tctgtcagca gggcacagta cttgctgata ccagggaatg tttgttctta 240  
aataccatca ttccggacgt gtttgccctg gccagttttc catgtacatg cagaaagaag 300  
tttggactga tcaatacagt cctctgcctt taaagcaata ggaaaaggcc aacttgtcta 360  
cgtttagtat gtggctgtag atctgtaccc gccaccccct ccaccttgga cacaggacgc 420  
tgtggtttct gagccaggta caatgactcc ttctcgtaag tgcagtggaa gctgtacact 480  
gcccaggcaa agcgtccggg cagcgtaggc gggcgactca gatcccagcc agtggactta 540  
gcccctgttt gctcctccga taactggggt gaccttggtt aatattcacc agcagcctcc 600  
cccgttgccc ctctggatcc actgcttaaa tacggacgag gacagggccc tgtctcctca 660  
gcttcaggca cca 673

<210> 6

15 <211> 69

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

20

gcctttgaat gtaaccaatc ctactaataa accagttctg aagggtgttg gtgtgcgcgt 60  
gtggagttg 69

<210> 7

25 <211> 66

<212> ADN

	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> aislante polyA sintético		
5	<400> 7		
	aattcaataa agagctctta ttttcattct cgaggtgtgg ttggttttct tgtgtggggg	60	
	cggatc	66	
10	<210> 8		
	<211> 10		
	<212> RNA		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> secuencia de consenso de Kozak		
	<400> 8		
	gccrccauga 10		
20	<210> 9		
	<211> 145		
	<212> ADN		
	<213> virus adeno-asociado 2		
25	<400> 9		
	ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggctcgcc	60	
	cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg	120	
	gccaactcca tcactagggg ttcct	145	
30	<210> 10		
	<211> 146		
	<212> ADN		
	<213> virus adeno-asociado 2		
35	<400> 10		
	ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgcccgggc aaagcccggg	60	
	cgtcgggcca cctttggtcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg	120	
	gccaactcca tcactagggg ttcccc	146	

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un virión de parvovirus que comprende:

5 a) un constructo de ácidos nucleicos que comprende:

- i) una secuencia de nucleótidos que codifica una porfobilinógeno deaminasa humana y que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº: 1; y,
- 10 ii) un promotor AAT combinado con el elemento potenciador del gen de albúmina de ratón (Ealb); y,
- iii) ITRs de AAV de serotipo 2; y,

b) proteínas de la cápside de AAV de serotipo 5;

15 para la producción de un medicamento para el tratamiento de una afección provocada por una deficiencia de porfobilinógeno deaminasa.

2. Uso según la reivindicación 1, donde el promotor tiene la secuencia de la SEC ID nº: 5.

3. Uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la condición es porfiria aguda intermitente.

20 4. Virión de parvovirus que comprende:

a) un constructo de ácidos nucleicos que comprende:

- 25 i) una secuencia de nucleótidos que codifica una porfobilinógeno deaminasa humana y que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº: 1; y,
- ii) un promotor AAT combinado con el elemento potenciador del gen de albúmina de ratón (Ealb); y,
- iii) ITRs de AAV de serotipo 2; y,

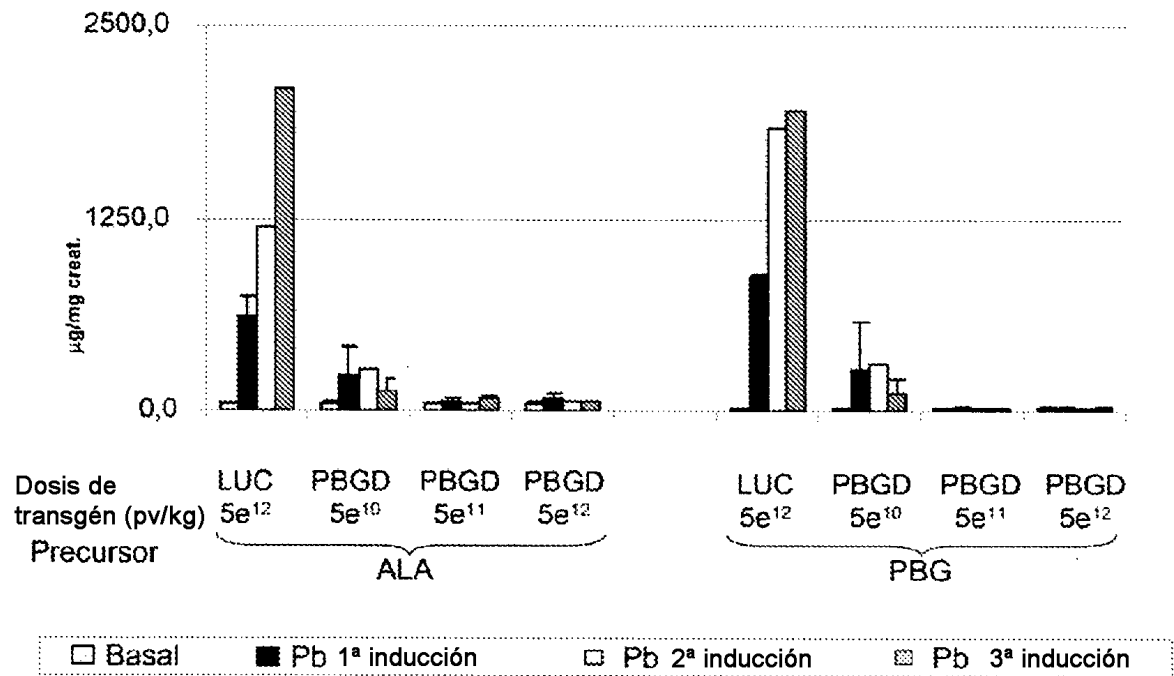
30 b) proteínas de la cápside de AAV de serotipo 5;

para usar en el tratamiento de una afección provocada por una deficiencia de porfobilinógeno deaminasa.

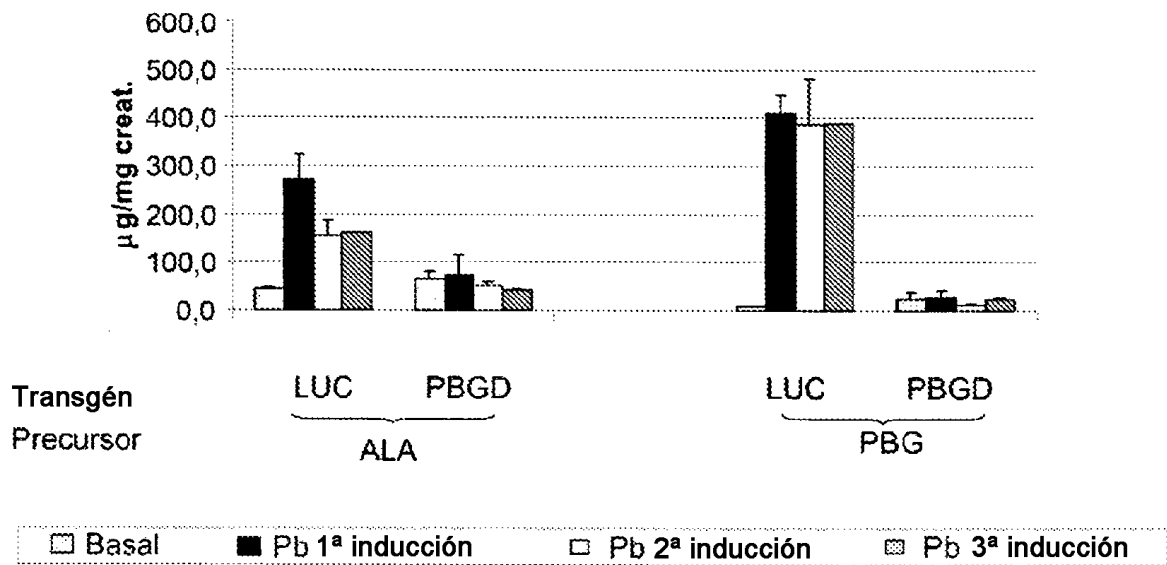
35 5. Un virión de parvovirus para usar según la reivindicación 4, donde el promotor tiene la secuencia de la SEC ID nº: 5.

6. Un virión de parvovirus para usar según la reivindicación 4 o reivindicación 5, donde la afección es porfiria aguda intermitente.

*Fig 1*

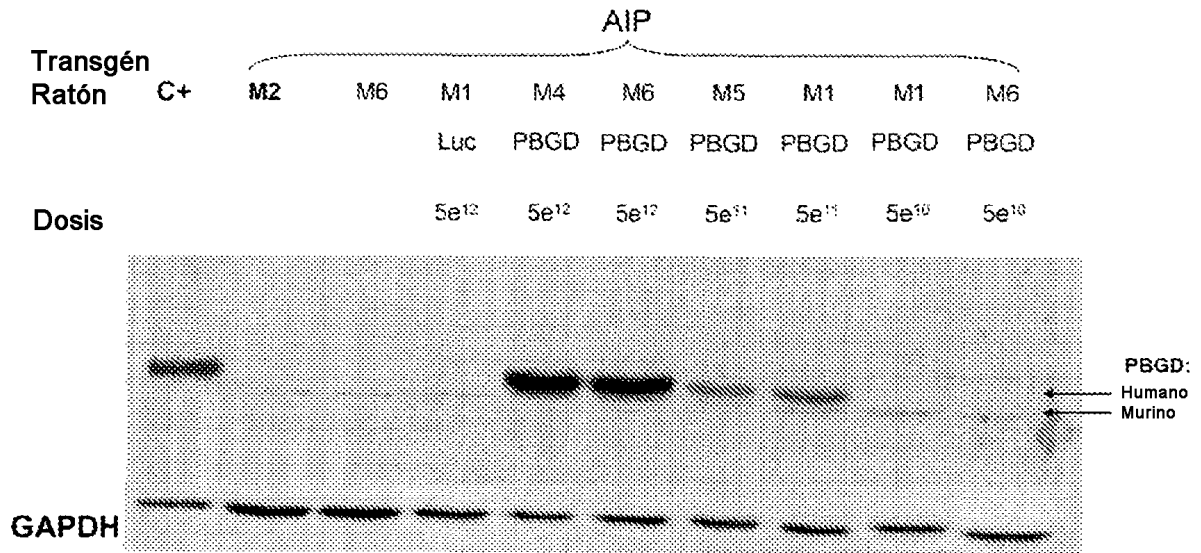


*Fig 2*

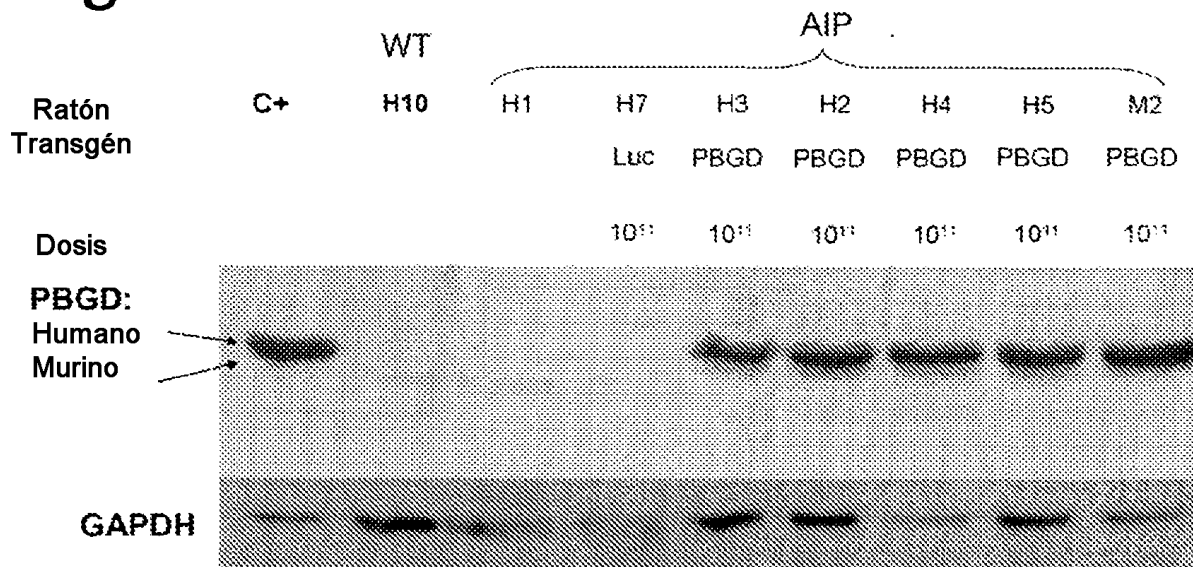




*Fig 3*



*Fig 4*



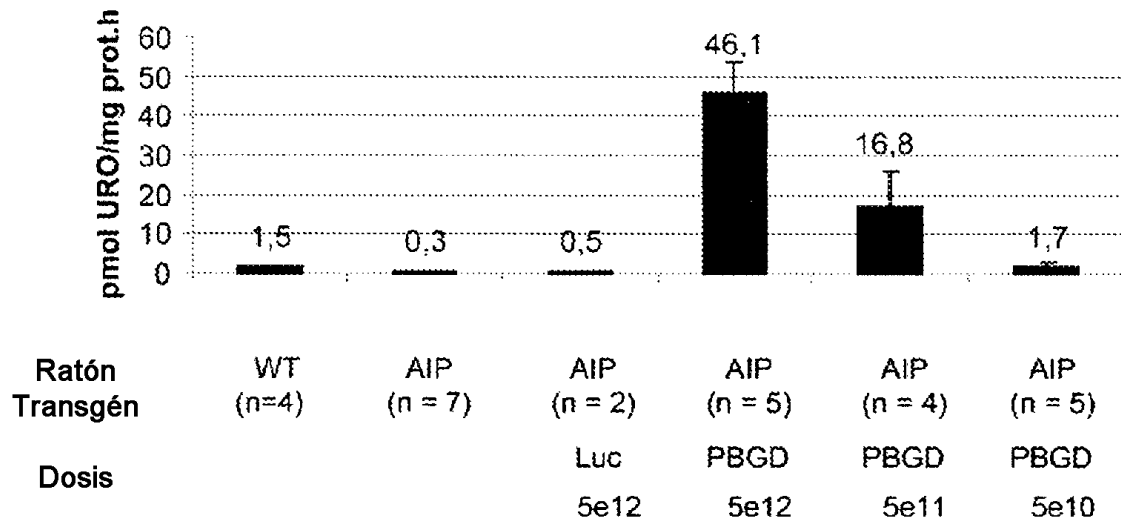
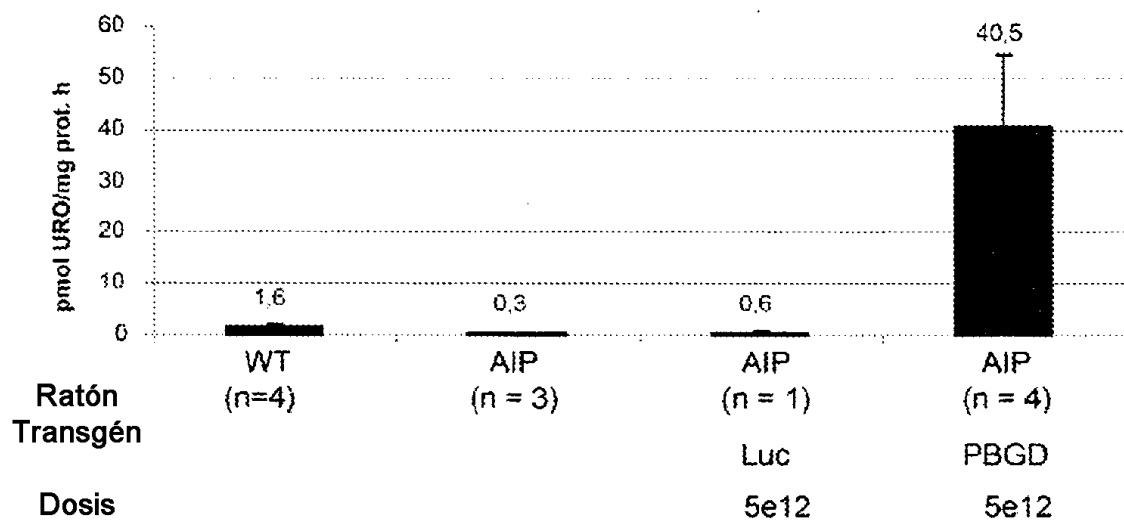
*Fig 5**Fig 6*

Fig 7

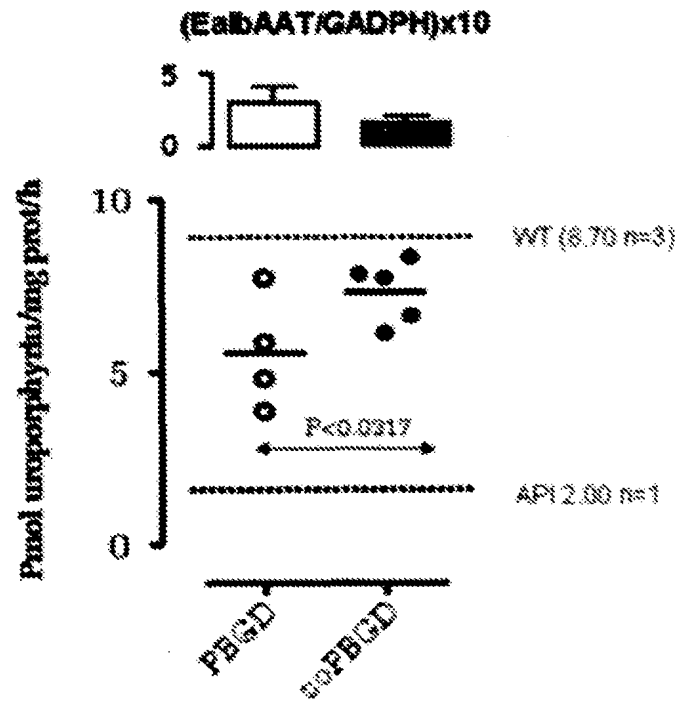
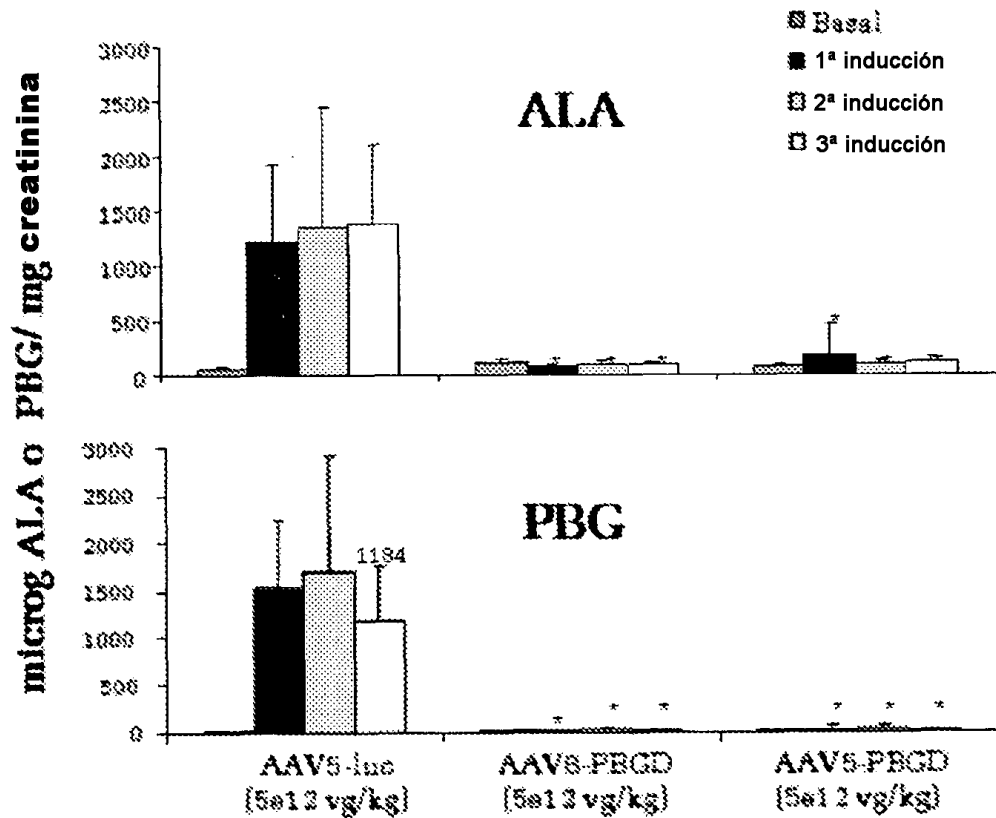
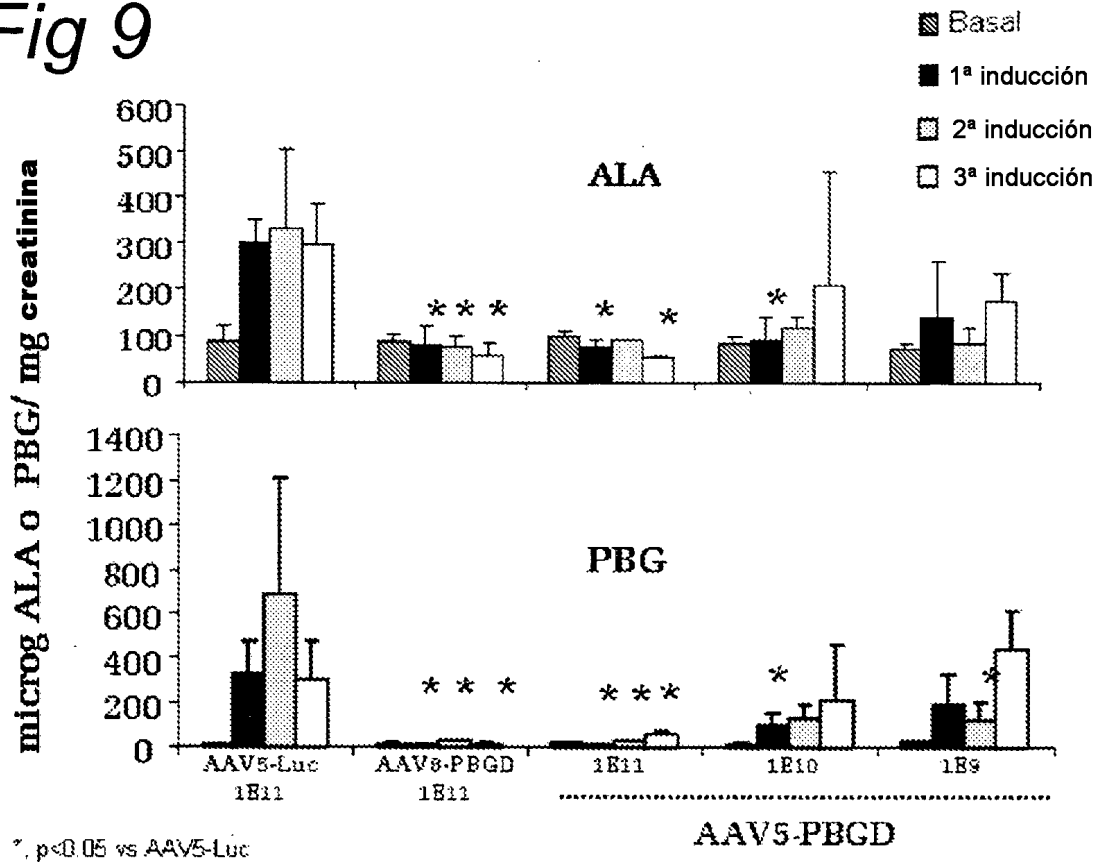


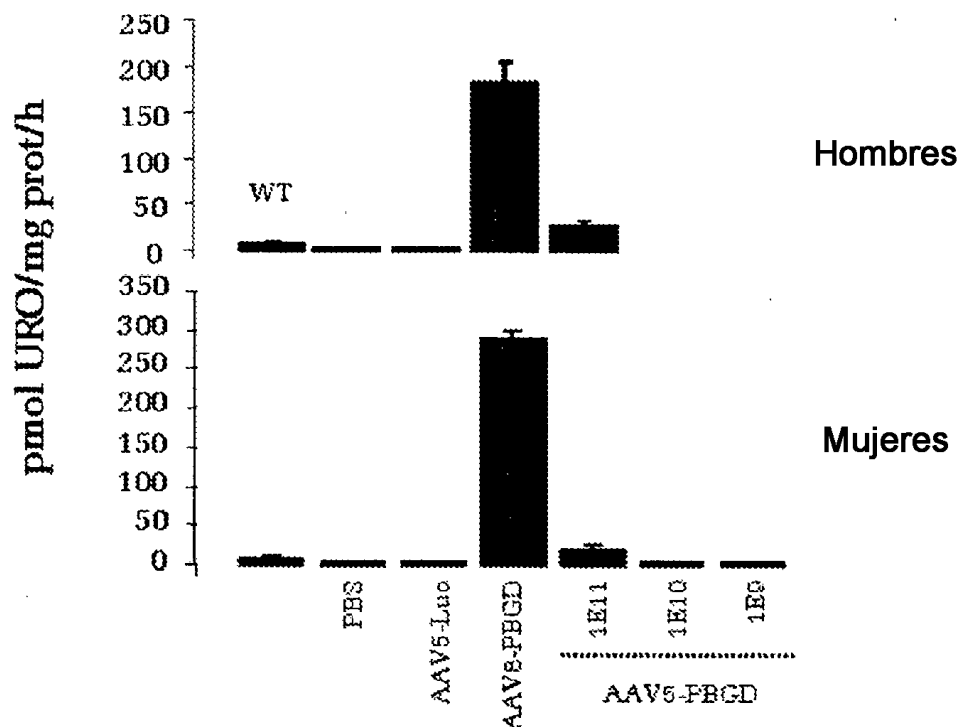
Fig 8

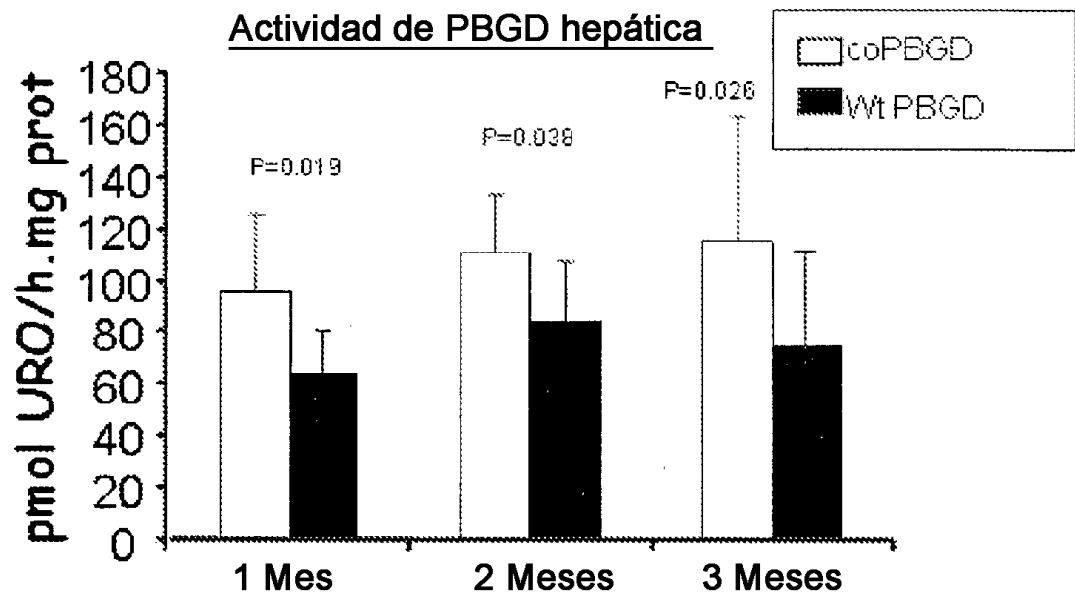
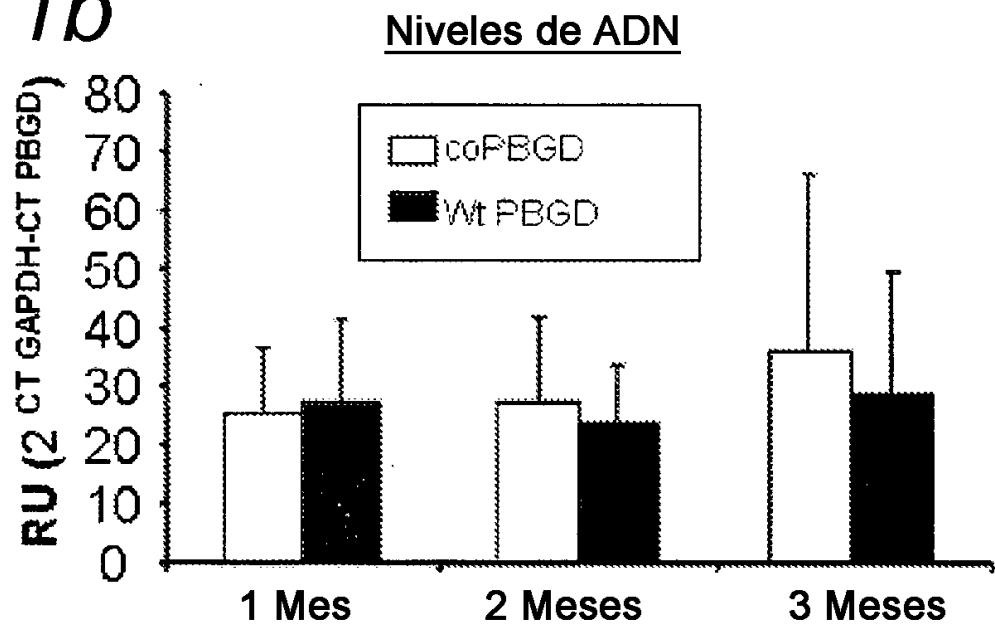


**Fig 9**

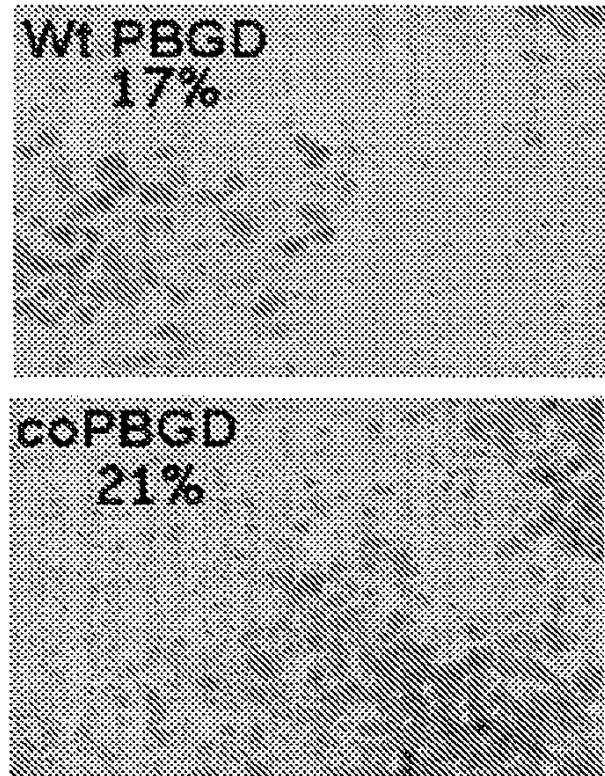


**Fig 10**

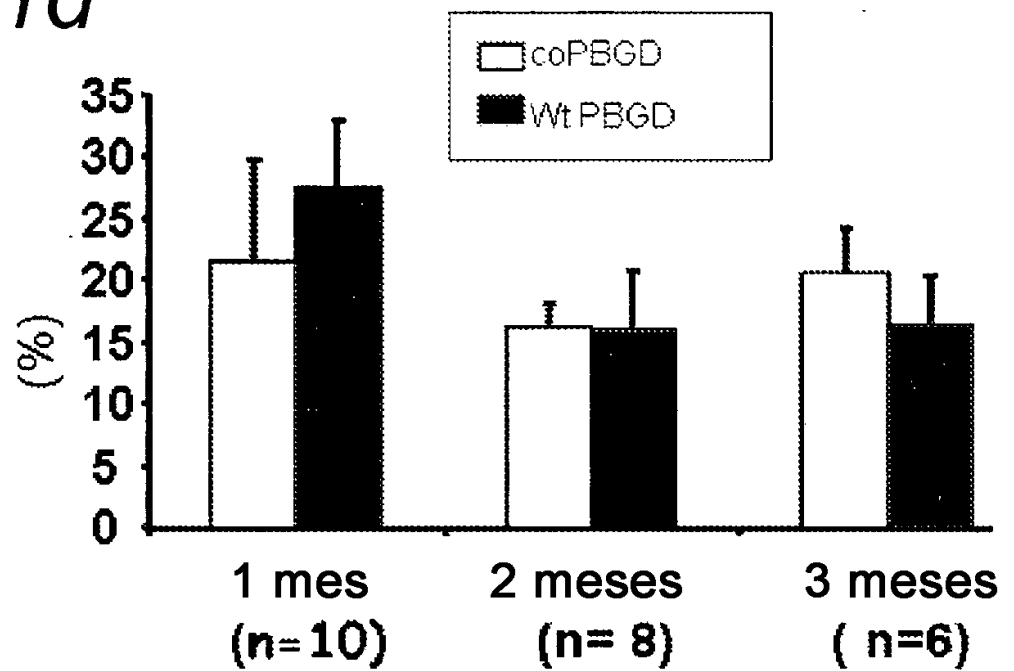


*Fig 11a**Fig 11b*

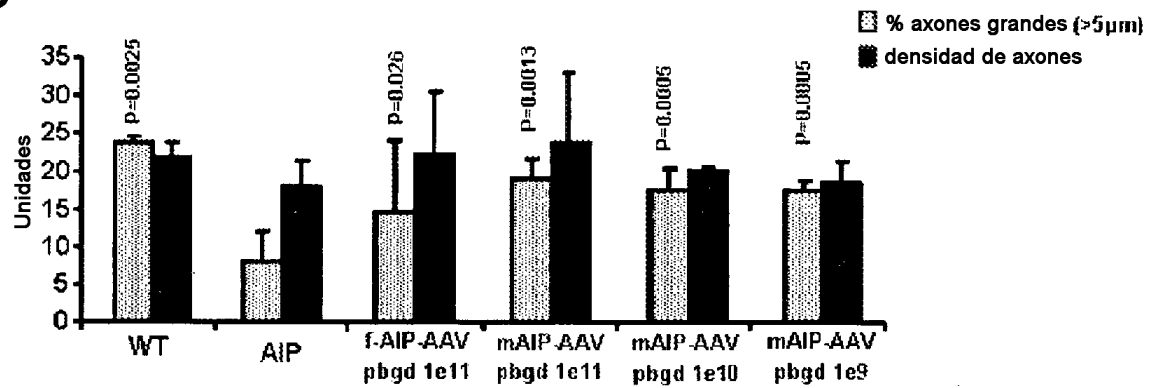
*Fig 11c*



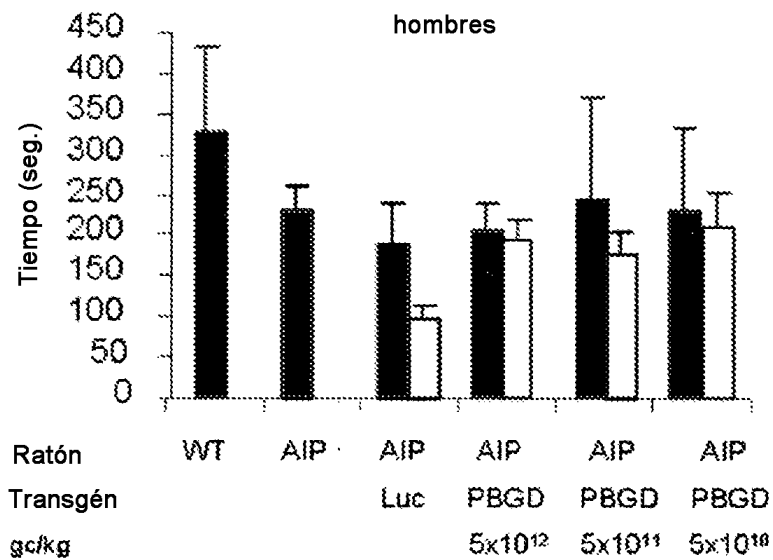
*Fig 11d*



*Fig 12*



*Fig 13a*



*Fig 13b*

