

(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:

UNIQURE 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 ASEGUNOLAZA, 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 neuroviscerales 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.

30 Puede ocurrir también muerte súbita como resultado de una arritmia cardiaca.

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.

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

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.

55 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 1 α del receptor y activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α), 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-1 α .

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 morbidez 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.
- 20 [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.
- 30 Resumen de la invención
- [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 nº: 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.
- 35 [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 glicolico (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.
- 65 Además, se pueden utilizar nucleótidos de fosforotioato.
- Otros análogos de desoxinucleótidos incluyen metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforoditioatos, N3'P5'-fosforamidatos y oligorribonucleotido-fosforotioatos y sus análogos de 2'-O-alilo y 2'-O-metilribonucleotido 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.
- 5 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.
- 10 [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.
- 15 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.
- 20 [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.
- 25 [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.
- 30 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.
- 35 [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.
- 40 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 retiran de la secuencia.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 [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.
- 60 Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de tejidos bajo la mayoría de condiciones fisiológicas y de desarrollo.
- 65

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.

5 [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).

10 Después de la terminación de la transcripción, el transcripto 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).

15 [0023] Los términos, "sustancialmente idéntico" "identidad sustancial" o "esencialmente similar" o "similitud esencial" significan que dos secuencias de péptidos o de nucleótidos, cuando están ópticamente 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.

20 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.

25 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).

30 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.

35 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".

40 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).

55 [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.

60 [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.

65 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.
- 20 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.
- 30 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.
- 35 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 α1-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.
- 45 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 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 nº: 7.

- 5 [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 nº: 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.
- 10 Aunque en la secuencia de consenso de Kozak habitual, el nucleótido que va directamente después del codón de inicio AUG es una G (guanosina), 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.
- 15 [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.
- 20 20 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 símico, 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.
- 30 [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.
- 35 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).
- 40 40 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.
- 45 [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.
- 50 50 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).
- 55 60 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.
- 65 [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 nº: 9 (ITR izquierda o corriente arriba) y la SEC ID nº: 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.
- 30 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.
- [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.
- 35 Generalmente, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa a nivel de aminoácidos y ácidos nucleicos.
- 40 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); 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.
- 45 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.
- 50 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 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.
- 55 Las proteínas Rep78 de varios serotipos de AAV son, por ejemplo, idénticas en más de un 89% y la identidad de la 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 Hoeben (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 epítopo con una proteína de la cápside de AAV, a través de la cual preferiblemente el epítopo es un epítopo 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.
- 5 [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.
- 10 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 neuroviscerales y/o circulatorios.
- 15 [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) 20 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.
- 25 [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.
- 30 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.
- 35 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, polianhidridos, ácido poliglicólico, 40 colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros polilácticos poliglicólicos (PLG) pueden, por ejemplo, ser usados.
- 45 [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.
- 50 [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.
- 55 [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.
- 60 [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 períodos 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 períodos 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 1×10^{12} y 1×10^{13} copias de genoma (cg) /kg, por ejemplo de 1×10^{11} a 1×10^{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.
- Ejemplos de tejidos diana pueden incluir hígado, músculo esquelético, músculo de corazón, depósitos adiposos, riñón, pulmón, endotelio vascular, epitelial y/o células hematopoyéticas.
- 45 En una realización, el rango de dosis efectiva para animales pequeños (ratones), después de la inyección intramuscular, puede estar entre 1×10^{12} y 1×10^{13} copias de genoma (cg) /kg, y para animales más grandes (gatos) y sujetos humanos, entre 1×10^{11} y 1×10^{12} cg/kg.
- [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.
- 50 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.
- 55 [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.
- 60 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.

5 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.

10 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.

15 [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.

20 Descripción de las figuras

[0069]

25 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.

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

35 LUC es constructo indicador de luciferasa; PBGD es varias dosis 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.

40 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.

45 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.

50 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 nº: 1 (coPBGD). Los niveles de ADN de vector presentes en el hígado fueron confirmados usando cebadores que se hibridan con el transgén.

55 Las proporciones basadas en Q-PCR entre las copias de ADN del gen de mantenimiento endógeno GADPH 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.

60 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 $5e12$ cg/kg de vector de control (AAV2/5-EalbAAT-Luciferasa) y ratones tratados con $5e12$ 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.

- 5 C. Análisis de inmunohistoquímico representativo de hígados de animales macho inyectados con un vector ssAAV2/5 que lleva el transgénico 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.

- 10 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.

- 15 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.

20 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

25 1.1 Materiales y métodos.

1.1.1 Modelo Animal

30 [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.

35 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.

40 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.

45 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

55 [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).

60 La secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina [bGH poly(A)] (bases 2326-2533 GenBank nº acc. M57764), un elemento regulador potranscripcional 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.

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

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

Preparación de vectores AAV

- 5 [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-PB GD-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.
- 10 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%.
- 15 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'CCCTGTTGCTCCTCCGATAA3' pr301rv 5' GTCCGTATTAGCAGTGGATCCA 3' que amplifican un fragmento de 95 pares de bases de la región promotora hAAT.
- 20 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

- 25 [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 9×10^{12} gv de AAV2/8-PB GD y sacrificados el día 6º.

Ensayo demostrativo preliminar

- 30 [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-hB GD. 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 μ l que corresponde a 5×10^12 gv/kg de AAV2/8-hPB GD o AAV2/8- vector de control de luciferasa.
- 35 Dos grupos adicionales de cinco ratones PAI macho (de la misma edad que los anteriores) fueron inyectados con 5×10^11 gv/kg o 5×10^10 gv/kg de AAV2/8-hPB GD. 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
PB GD	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.

- 45 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

- 50 [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 1×10^{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

5 1.2.1 Ensayo demostrativo preliminar

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

10 [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.

15 [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-PB GD (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).

20 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).

25 [0079] La administración del vector terapéutico (5e12 gv de AAV2/8-PB GD/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

30 [0080] Como se esperaba, los ratones PAI exhiben trastorno motor cuando son comparados con animales de tipo salvaje.

35 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).

40 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-hPB GD 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).

45 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 porfírico, éste se redujo a ~100 segundos.

En los machos que recibieron las tres dosis diferentes del vector PB GD, 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.

50 Se encontró lo mismo también en hembras.

Efectos de la administración de ssAAV-hPB GD en el nivel de PB GD del hígado en el momento del sacrificio: análisis de western blot.

55 [0081] Como se esperaba, la administración del vector de control (ssAAV-Luc) no aumentó la expresión de PB GD ni en ratones macho (figura 3) ni en hembra (figura 4). En machos, el aumento de la expresión de PB GD hepática dependiente de la dosis fue observado mediante análisis de western blot (figura 3). Diferentes patrones de migración entre PB GD endógena y humana permiten la identificación de la PB GD exógena (figura 3).

60 [0082] En hembras, se observó expresión alta de PB GD en el hígado de ratones tratados con 5e12 gv/kg de ssAAV-hPB GD (figura 4).

Efectos de la administración de AAV-PB GD en la actividad de PB GD del hígado en el momento del sacrificio

65 [0083] La medición de la actividad enzimática confirma que la proteína PB GD expresada por el vector terapéutico está funcionalmente activa (figuras 5 y 6). No se observaron diferencias significativas en la actividad de PB GD ($p = 0,35$) entre machos (figura 5) y hembras (figura 6) inyectados con dosis más altas del vector terapéutico (AAV-PB GD). En machos, se observó un aumento dependiente de la dosis de la actividad de PB GD en el hígado (figura 5). Los ratones administrados con dosis bajas de vector terapéutico (5e10 gv de AAV-PB GD /kg) muestran la misma actividad de PB GD 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.
- 5 Para tinción inmunohistoquímica de PBGD se desarrolló un anticuerpo polyclonal 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).
- 10 [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).
- 15 [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.
- 20 [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-PB GD/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).
- 25 [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-PB GD 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.
- 30 [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).
- 35 [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-PB GD 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).
- 40 **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).
- 45 La densidad normal de axones observada en animales PAI transducidos con el vector rAAV2/8-PB GD ha sugerido que la sobreexpresión de hPBGD en el hígado facilitó la regeneración axonal del nervio ciático en ratones PAI (figura 12).
- 50 [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-PB GD 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

- 60 **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 cassetes 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 cassetes 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, (AppliedBiosistems) usando el cebador hAAT taq inverso 5'CAGCGCCTGTGTCAGGT3', el cebador hAAT taq directo 5'AGGCCAACTTGTCTACGTTAGTATG3' (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, Cl₂Mg 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 (λ_{exc}) a 405 nm y valores del pico de emisión de ventana (λ_{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) psl1180-pAAT-PBGG-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).

5 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.

10 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

15 [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.

20 [0100] Una dosis de $5e12$ cg/kg de AAV2/5-EalbAAT-PBGG 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-PBGG, los animales fueron tratados con dosis crecientes de Pb durante 4 días para inducir el ataque porfírico.

25 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.

30 [0101] Los niveles basales de ALA y PBG en ratones PAI fueron: 88 ± 24 y 16 ± 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina en machos y 87 ± 19 y 14 ± 8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina en hembras.

Una dosis de $5e12$ cg/kg fue capaz de prevenir el efecto del Pb en los precursores de ALA y PBG tanto en machos (118 ± 34 y 11 ± 4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina) como en hembras (52 ± 5 y 51 ± 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 ± 659 y 1184 ± 585 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina en machos y 295 ± 91 y 298 ± 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).

40 [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 $5e12$ gc/kg de AAV5-EalbAAT-PBGG expresaron $26,1 \pm 7,3$ pmol uro/mg proteína/h de PBGD en el hígado.

45 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 $5e12$ cg/kg reveló diferencias en la actividad enzimática de PBGD del hígado en hembras ($18,5 \pm 6,3$ pmol uro/mg proteína/h).

50 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-PBGG 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 $1,25e11$ gv de AAV2/5-PBGG ($n=22$) 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.

60 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).

65 Además, los niveles de expresión de la PBGD después de la transferencia de genes de AAV2/5-PBGG 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-PBGG 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-PBGG 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 11A.

[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

10

[0106]

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

15

<120> Terapia génica de porfobilinógeno deaminasa

<130> P6021400PCT

<150> EP 08165393.3

20

<151> 2008-09-29

<150> US 61/100,881

<151> 2008-09-29

25

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

30

<210> 1

<211> 1089

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> secuencia de codificación optimizada

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1083)

40

<400> 1

ES 2 507 540 T3

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

ES 2 507 540 T3

acc agc agc ctg cg ^g aga gcc g ^c c cag ctg c ^a g c ^g g a ^a g t ^t c c ^{cc} c ^c ac	480
Thr Ser Ser Leu Arg Arg Ala Ala Gln Leu Gln Arg Lys Phe Pro His	
145 150 155 160	
ctg gaa ttt cg ^g agc atc cg ^g g ^{gc} a ^a c ctg a ^a c acc c ^g g ctg c ^g g a ^a g	528
Leu Glu Phe Arg Ser Ile Arg Gly Asn Leu Asn Thr Arg Leu Arg Lys	
165 170 175	
ctg gac gag c ^a g c ^a g gaa ttt tcc g ^c t atc atc ctg g ^c c a ^{ca} g ^{cc} g ^{ga}	576
Leu Asp Glu Gln Gln Glu Phe Ser Ala Ile Ile Leu Ala Thr Ala Gly	
180 185 190	
ctg cag cg ^g atg g ^{gc} tgg cac a ^a c aga gt ^g g ^{gc} c ^a g atc ctg c ^a c c ^{cc} c	624
Leu Gln Arg Met Gly Trp His Asn Arg Val Gly Gln Ile Leu His Pro	
195 200 205	
gag gaa tgc atg tac g ^c c g ^t g g ^{gc} c ^a g g ^{ga} g ^c c ctg g ^{gc} g ^t g gaa g ^t g	672
Glu Glu Cys Met Tyr Ala Val Gly Gln Gly Ala Leu Gly Val Glu Val	
210 215 220	
cg ^g g ^c c a ^a g g ^a c c ^a g g ^a c atc ctg gat ctg gt ^g g ^{gc} g ^t g ctg cat g ^a c	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 cg ^g tgt atc g ^c c g ^a g c ^g g g ^c c t ^t c ctg c ^g g c ^a c	768
Pro Glu Thr Leu Leu Arg Cys Ile Ala Glu Arg Ala Phe Leu Arg His	
245 250 255	
ctg gaa g ^g c g ^g c tgc agc gt ^g ccc gt ^g g ^c c gt ^g c ^a c acc g ^c c atg a ^a g	816
Leu Glu Gly Gly Cys Ser Val Pro Val Ala Val His Thr Ala Met Lys	
260 265 270	
gac g ^g a c ^a g ctg tac ctg aca g ^g c g ^g c gt ^g tgg agc ctg g ^a c g ^g c a ^a g	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 g ^c c acc atc cac gt ^g ccc g ^c c c ^a g	912
Asp Ser Ile Gln Glu Thr Met Gln Ala Thr Ile His Val Pro Ala Gln	
290 295 300	
cac gag gac g ^g c ccc gag g ^a c g ^a c c ^c t cag ctg g ^t c g ^g c atc acc g ^c c	960
His Glu Asp Gly Pro Glu Asp Asp Pro Gln Leu Val Gly Ile Thr Ala	
305 310 315 320	
cg ^g aac atc ccc aga g ^g c ccc cag ctg g ^c c g ^c c c ^a g a ^a c ctg g ^g c atc	1008
Arg Asn Ile Pro Arg Gly Pro Gln Leu Ala Ala Gln Asn Leu Gly Ile	
325 330 335	
agc ctg g ^c c a ^a c ctg ctg tcc a ^a g g ^g c g ^c c a ^a g a ^a c atc ctg g ^a c	1056
Ser Leu Ala Asn Leu Leu Ser Lys Gly Ala Lys Asn Ile Leu Asp	
340 345 350	
gt ^g g ^c c cg ^g c ^a g ctg a ^a c g ^a c g ^c c c ^a c tgatga	1089
Val Ala Arg Gln Leu Asn Asp Ala His	
355 360	

<210> 2
<211> 361

5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción Sintética

10 <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

ES 2 507 540 T3

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

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de codificación optimizada

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1032)

15 <400> 3

ES 2 507 540 T3

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

ES 2 507 540 T3

	130	135	140	
	gaa ttt cgg agc atc cg ^g ggc aac ctg aac acc cg ^g ctg cg ^g aag ctg Glu Phe Arg Ser Ile Arg Gly Asn Leu Asn Thr Arg Leu Arg Lys Leu	145 150	155	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	528
	cag cg ^g atg gg ^c tgg cac aac aga gtg gg ^c cag atc ctg cac ccc gag Gln Arg Met Gly Trp His Asn Arg Val Gly Gln Ile Leu His Pro Glu	180	185	576
	gaa tgc atg tac gcc gtg gg ^c cag gga gcc ctg gg ^c gtg gaa gtg cg ^g Glu Cys Met Tyr Ala Val Gly Gln Gly Ala Leu Gly Val Glu Val Arg	195	200	624
	gcc aag gac cag gac atc ctg gat ctg gtg gg ^c gtg ctg cat gac ccc Ala Lys Asp Gln Asp Ile Leu Asp Leu Val Gly Val Leu His Asp Pro	210	215	672
	gag aca ctg ctg cg ^g tgt atc gcc gag cg ^g gcc ttc ctg cg ^g cac ctg Glu Thr Leu Leu Arg Cys Ile Ala Glu Arg Ala Phe Leu Arg His Leu	225	230	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	768
	gga cag ctg tac ctg aca gg ^c gg ^c gtg tgg agc ctg gac gg ^c agc gac Gly Gln Leu Tyr Leu Thr Gly Gly Val Trp Ser Leu Asp Gly Ser Asp	260	265	816
	agc atc cag gag acc atg cag gg ^c 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	864
	gag gac ggc ccc gag gac gac cct cag ctg gtc gg ^c atc acc gcc cg ^g Glu Asp Gly Pro Glu Asp Asp Pro Gln Leu Val Gly Ile Thr Ala Arg	290	295	912
	aac atc ccc aga gg ^c ccc cag ctg gcc gg ^c cag aac ctg gg ^c atc agc Asn Ile Pro Arg Gly Pro Gln Leu Ala Ala Gln Asn Leu Gly Ile Ser	305	310	960
	ctg gcc aac ctg ctg tcc aag gg ^c gg ^c aag aac atc ctg gac gtg Leu Ala Asn Leu Leu Ser Lys Gly Ala Lys Asn Ile Leu Asp Val	325	330	1008
	gcc cg ^g cag ctg aac gac gg ^c cac tgatga Ala Arg Gln Leu Asn Asp Ala His	340		1038

<210> 4

<211> 344

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

10 <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

ES 2 507 540 T3

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

tcgaggttcc	tagattacac	tacacattct	gcaagcatag	cacagagcaa	tgttctactt	60
taattacttt	cattttcttg	tatcctcaca	gcctagaaaa	taacctgcgt	tacagcatcc	120
actcagtatc	ccttgagcat	gaggtgacac	tacttaacat	agggacgaga	tggtaactttg	180
tgtctcctgc	tctgtcagca	gggcacagta	cttgctgata	ccagggaaatg	tttgttctta	240
aataccatca	ttccggacgt	gtttgccttg	gccagtttc	catgtacatg	cagaaagaag	300
tttggactga	tcaatacagt	cctctgcctt	taaagcaata	ggaaaaggcc	aacttgtcta	360
cgttttagtat	gtggctgttag	atctgtaccc	gccacccct	ccaccttgga	cacaggacgc	420
tgtggtttct	gagccaggt	caatgactcc	tttcggtaag	tgcagtggaa	gctgtacact	480
gcccaggcaa	agcgtccggg	cagcgtaggc	gggcgactca	gatcccagcc	agtggactta	540
gcccctgttt	gctcctccga	taactgggt	gacctgggt	aatattcacc	agcagcctcc	600
cccgttgccc	ctctggatcc	actgcttaaa	tacggacgag	gacagggccc	tgtcctca	660
gcttcaggca	cca					673

15 <210> 6

<211> 69

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 6

gcctttgaat	gtaaccaatc	ctactaataa	accagttctg	aaggtgttgt	gtgtgcgcgt	60
gtggagttg						69

25 <210> 7

<211> 66

<212> ADN

ES 2 507 540 T3

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> aislante polyA sintético	
5	<400> 7	
	aattcaataa agagctctta ttttcatctt cgaggtgtgg ttggtttct tgtgtggggg	60
	cggatc	66
10	<210> 8	
	<211> 10	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> secuencia de consenso de Kozak	
	<400> 8	
20	gccrccauga 10	
	<210> 9	
	<211> 145	
	<212> ADN	
	<213> virus adeno-asociado 2	
25	<400> 9	
	ttggccactc cctctctgctcg cgctcgctcg ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc	60
	cgacgcccgg gctttgccccg ggccggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg	120
	gccaactcca tcacttagggg ttccct	145
30	<210> 10	
	<211> 146	
	<212> ADN	
	<213> virus adeno-asociado 2	
35	<400> 10	
	ttggccactc cctctctgctcg cgctcgctcg ctcaactgagg ccgcccggc aaagccccgg	60
	cgtcggcga cctttggctcg cccggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg	120
	gccaactcca tcacttagggg 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,
- 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,

10 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.

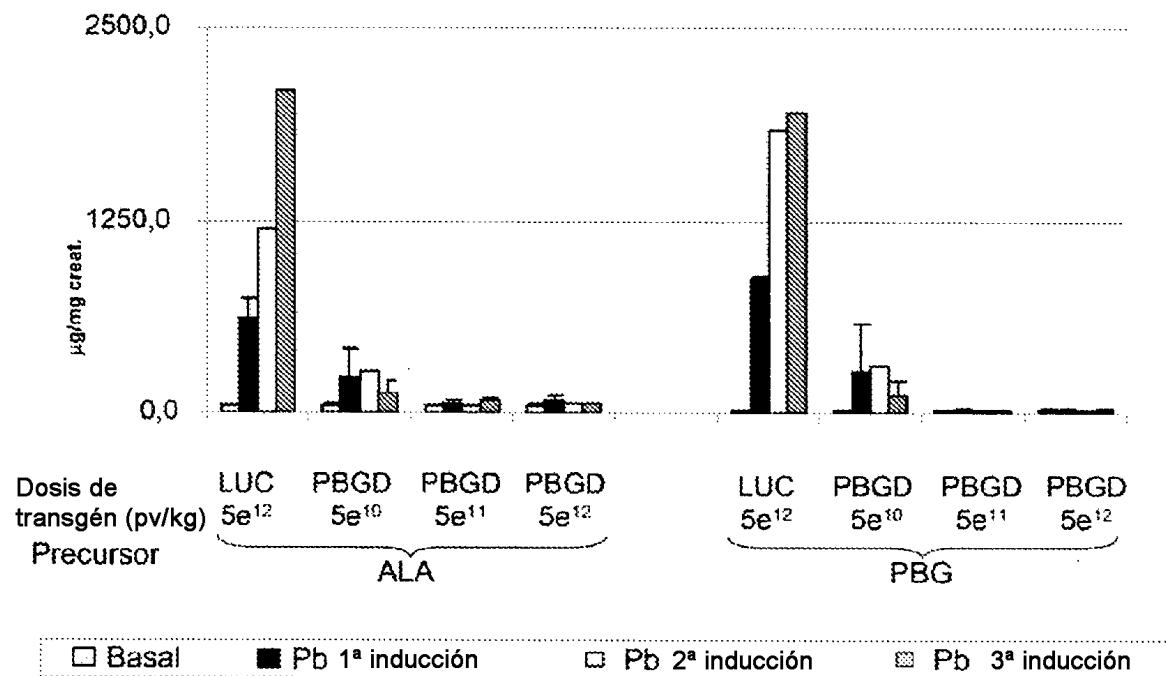
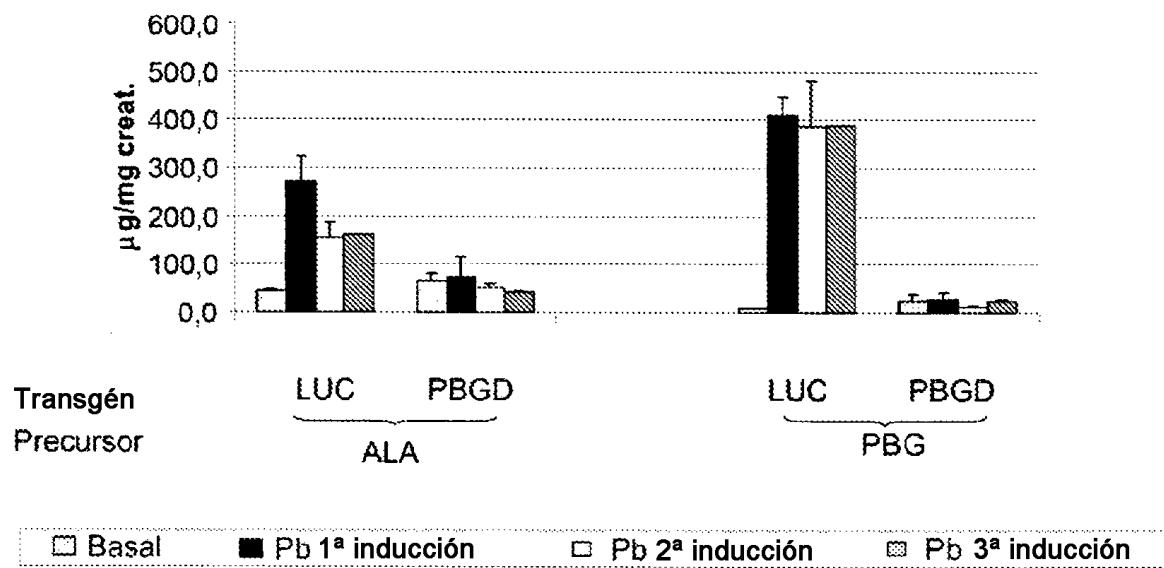
Fig 1*Fig 2*

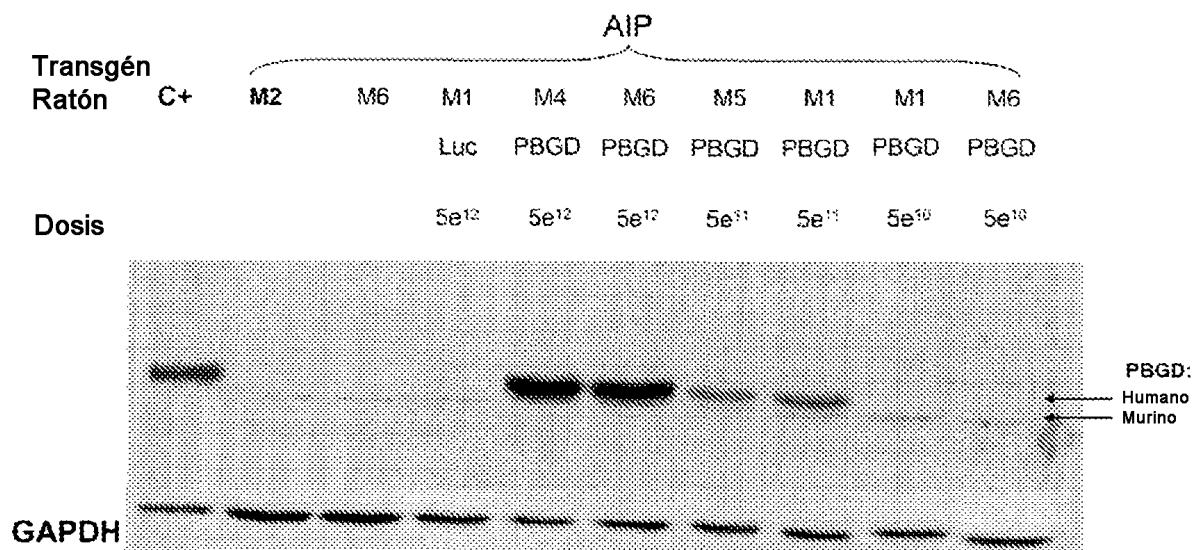
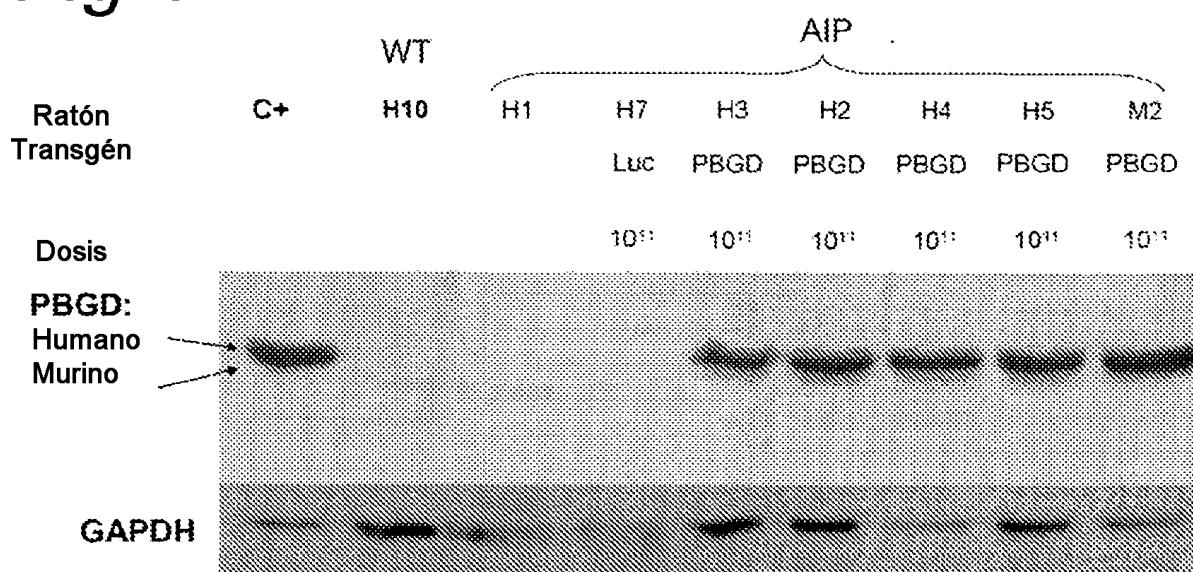
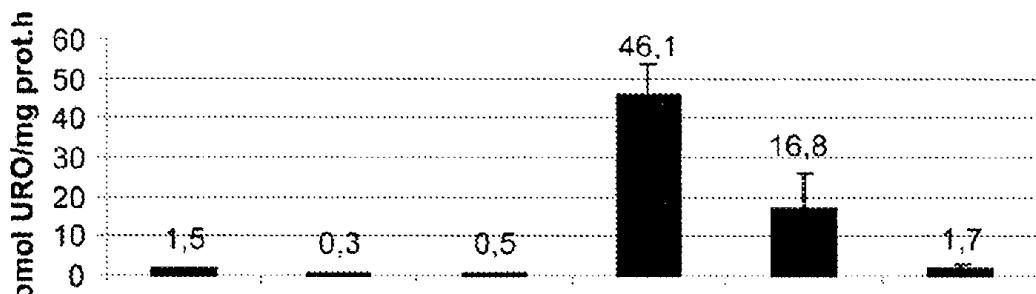
Fig 3*Fig 4*

Fig 5

Ratón Transgén	WT (n=4)	AIP (n = 7)	AIP (n = 2)	AIP (n = 5)	AIP (n = 4)	AIP (n = 5)
Dosis			Luc	PBGD	PBGD	PBGD

5e12 5e12 5e11 5e10

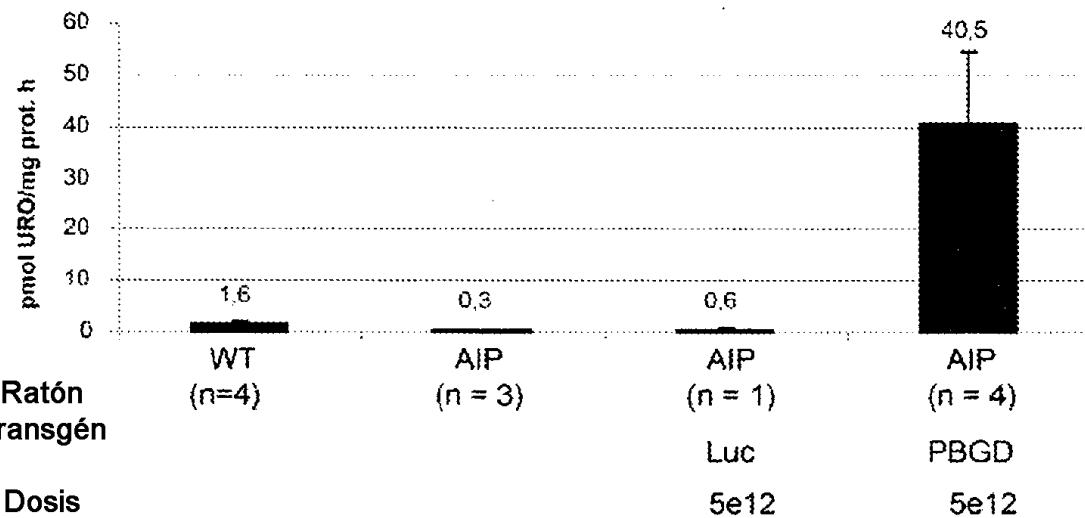
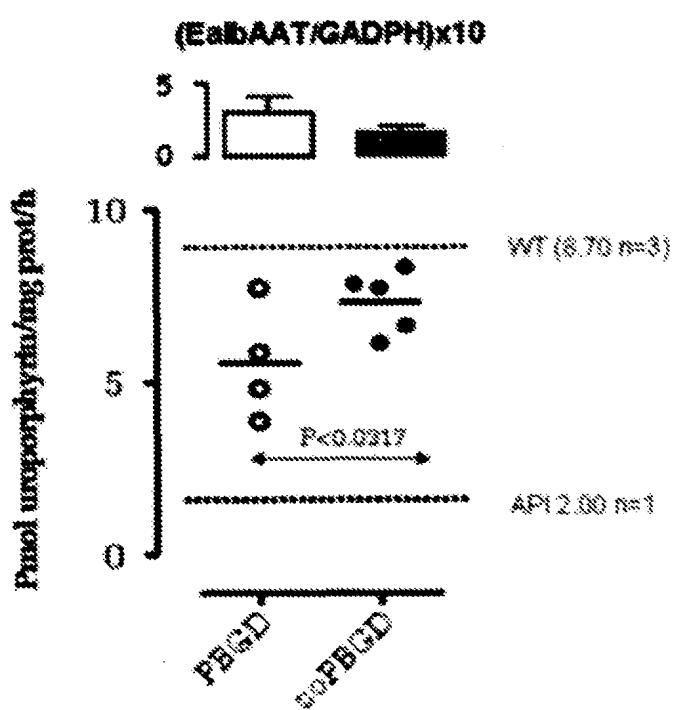
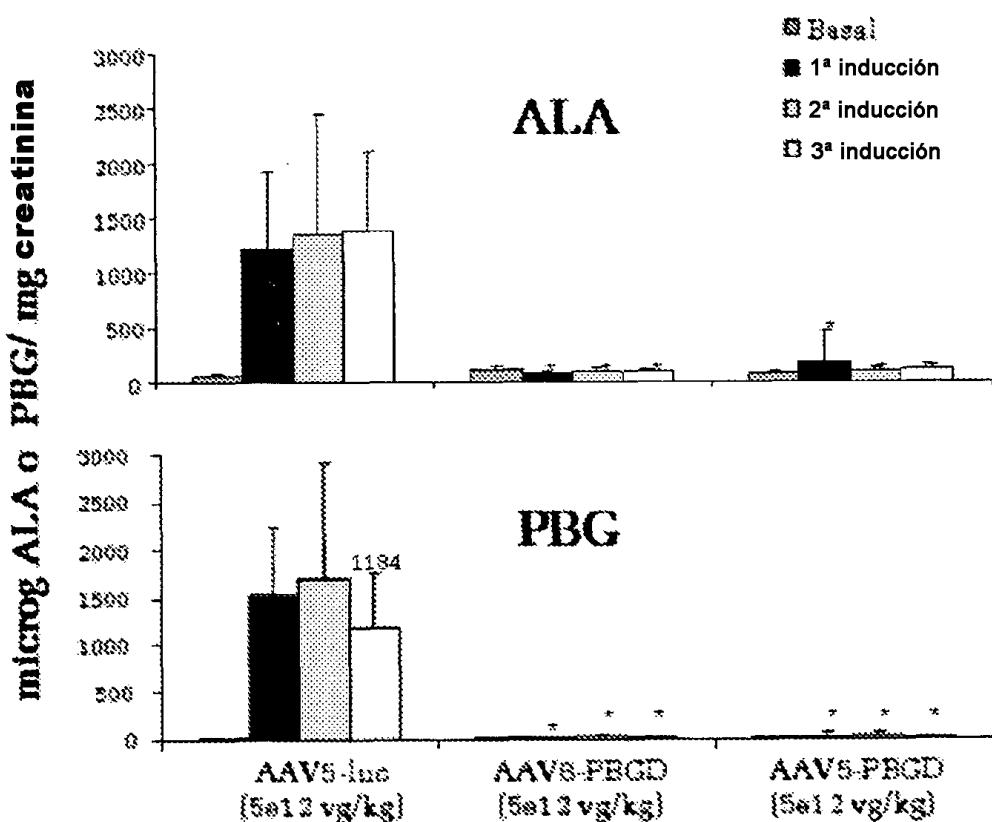
Fig 6

Fig 7*Fig 8*

*, p<0.05 vs AAVS-Luc

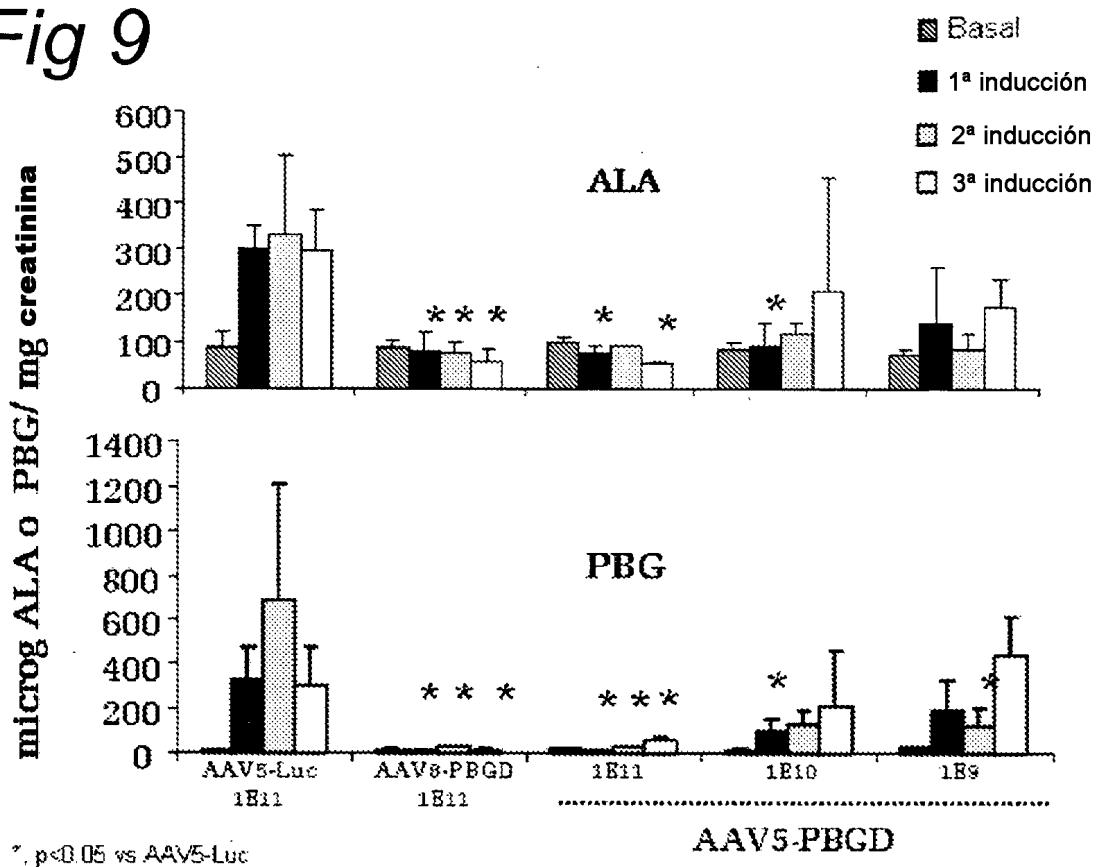
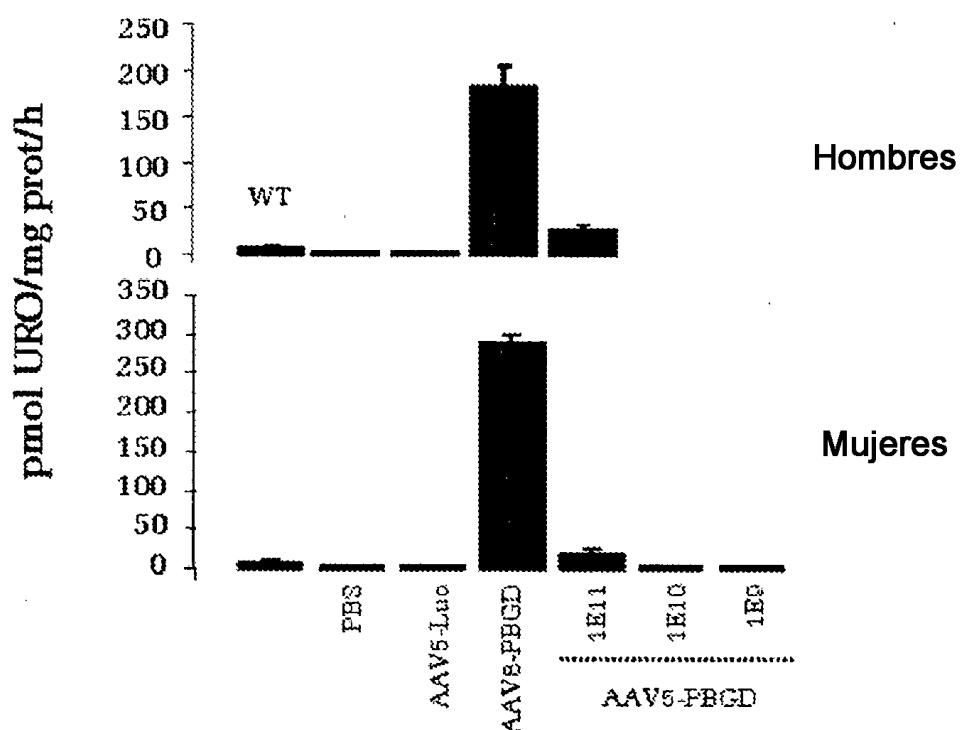
Fig 9*Fig 10*

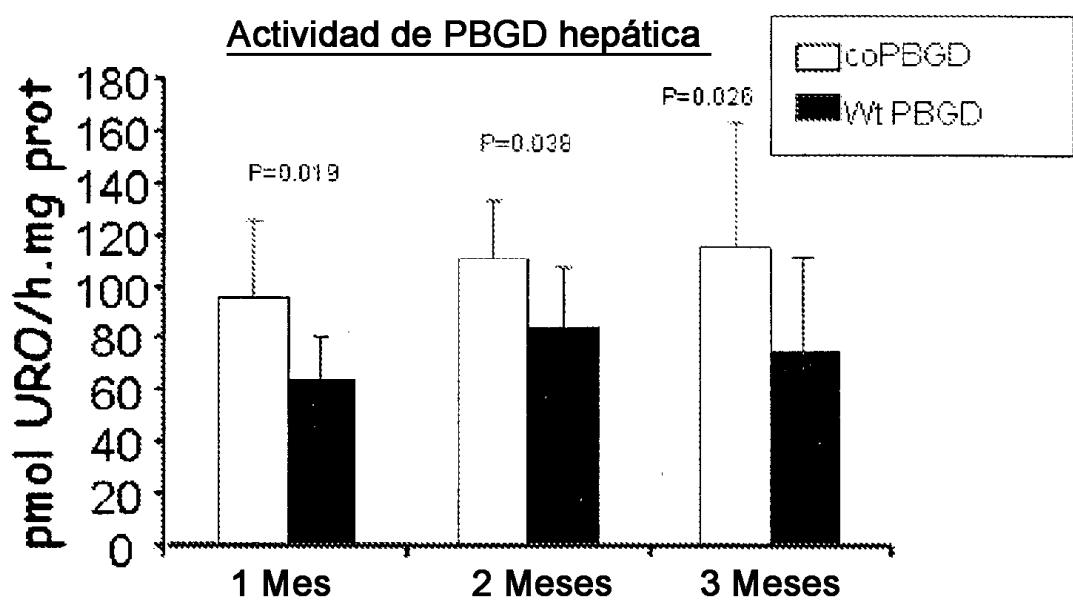
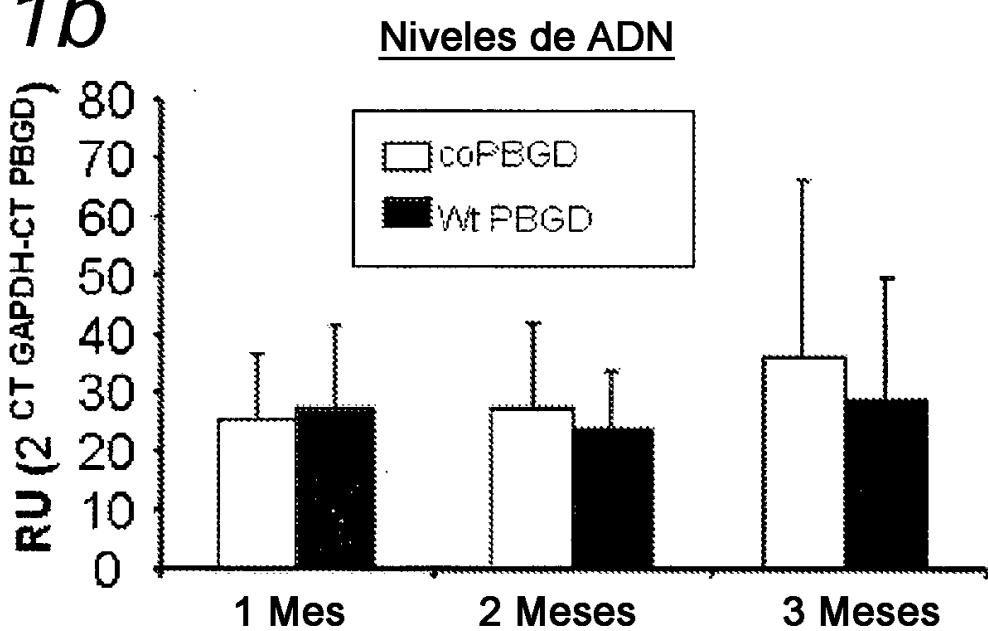
Fig 11a*Fig 11b*

Fig 11c

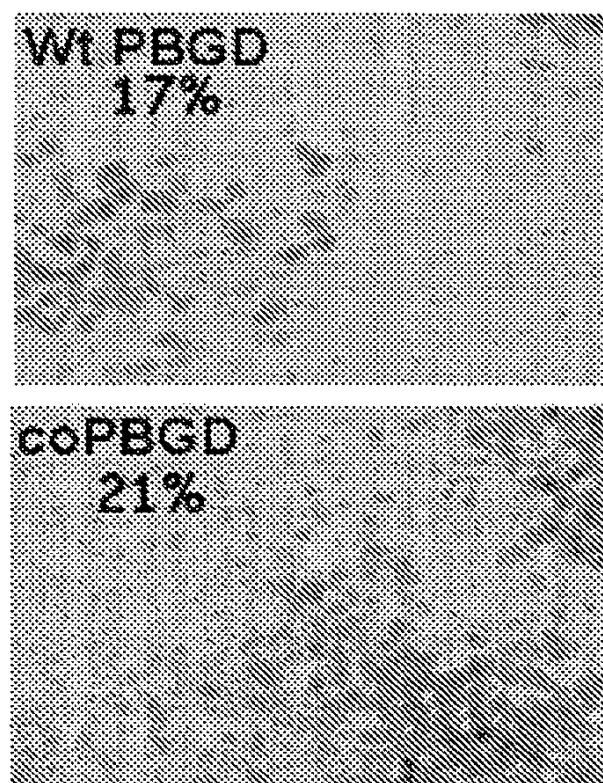


Fig 11d

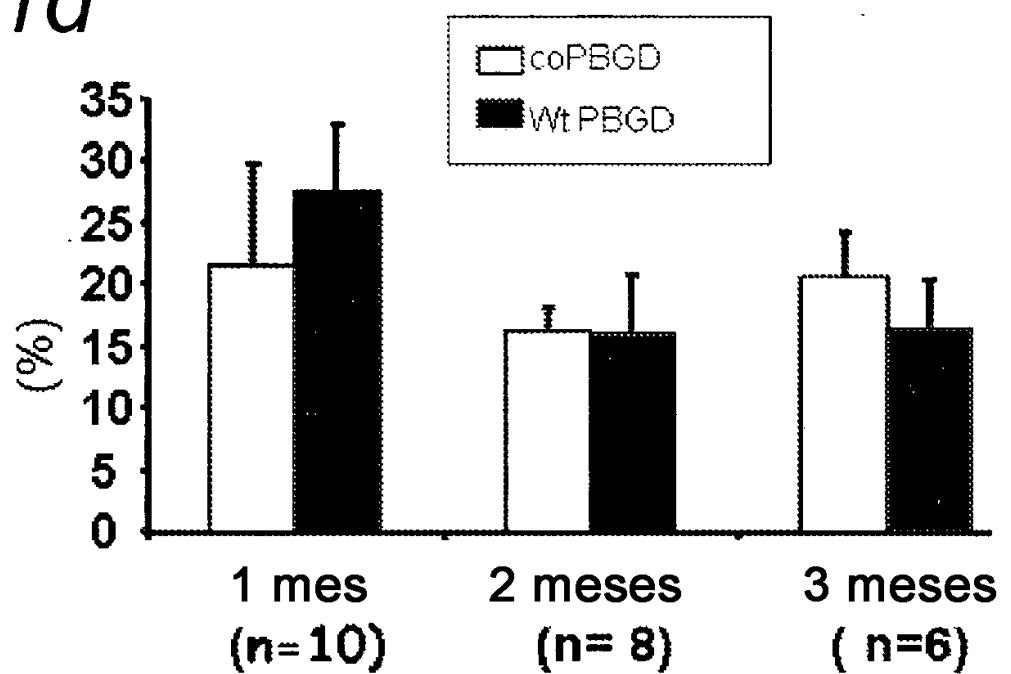
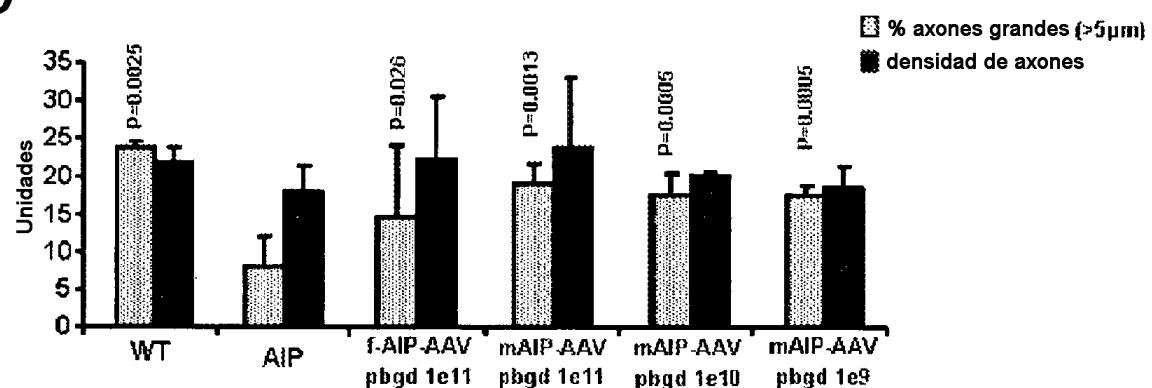
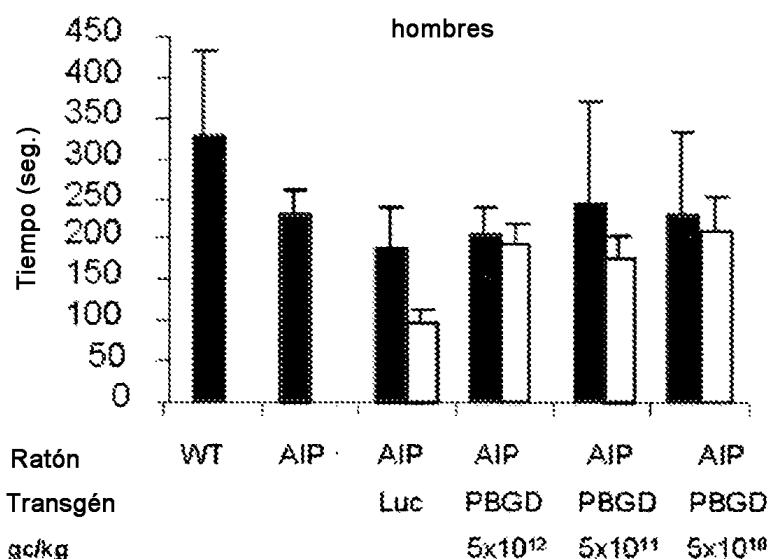


Fig 12*Fig 13a**Fig 13b*