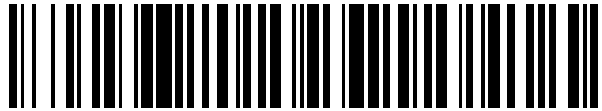


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 456**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 11788225 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2598525**

54 Título: **Mutantes de frataxina**

30 Prioridad:

28.07.2010 US 368576 P

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

30.11.2015

73 Titular/es:

TESTI, ROBERTO (100.0%)

**Via Cadlolo 82
00136 Roma, IT**

72 Inventor/es:

TESTI, ROBERTO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 552 456 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).

Mutantes de frataxina

5

Descripción

CAMPO

10 **[0001]** Este invento se relaciona generalmente con composiciones útiles para tratar la Ataxia de Friedreich (FRDA). De forma más específica, el invento está relacionado con la identificación de la proteína frataxina mutante y métodos para liberar esta proteína en las células.

ANTECEDENTES

15

20 **[0002] La enfermedad.** La FRDA es una enfermedad rara que afecta a >20.000 individuos de población caucásica. Aparece entre los 10 y 15 años y conduce a una pérdida de la locomoción y a una discapacidad total, con muerte prematura a causa de insuficiencia cardíaca. Los síntomas suelen aparecer a finales de la primera década o a principios de la segunda década de vida e incluyen inestabilidad motora y torpeza general. La ataxia motora tiene características tanto a nivel de cerebelo como sensoriales, incluyen tronco y miembros inferiores y es progresiva y generalmente sin tratamiento. El balanceo es común y, a medida que se vuelve más grave, requiere de un soporte constante y del uso de una silla de ruedas. La disartria o afasia se presenta en una frase temprana de la enfermedad y finalmente conduce a una discapacidad total para hablar. Además, la disfagia es una característica tardía que puede requerir alimentación artificial. El principal hallazgo patológico es la pérdida de neuronas periféricas en los ganglios de la espina dorsal. La hipertrofia ventricular caracteriza el cuadro cardíaco, y progresivamente puede conducir a un fallo cardíaco congestivo y a arritmias mortales. Una significativa minoría de pacientes también desarrollan diabetes mellitus por mecanismos que todavía no están claramente definidos.

25

30 **[0003]** La FRDA está causada por una hiperexpansión de tripletes homocigóticos GAA dentro del primer intrón de FXN, un gen de cinco exones localizado en el brazo largo del cromosoma 9 humano, que codifica la proteína frataxina. Las expansiones patológicas de GAA (desde ± 70 a >1.000 tripletes) da lugar a estructuras de ADN "pegajosas" y cambios epigenéticos que reducen gravemente la transcripción del gen FXN. Los pacientes con FRDA viven con un 10-30% de frataxina residual, y la gravedad de la enfermedad normalmente es proporcional al número de tripletes GAA y al grado de reducción de frataxina. Una minoría de pacientes con FRDA, los llamados componentes heterocigóticos, tienen expansiones patológicas de GAA en un alelo FXN y mutaciones de pérdida de funciones en el otro.

35

40 **[0004] Enfoques terapéuticos en la actualidad.** Actualmente no hay una terapia específica para impedir el avance de la enfermedad. La mayoría de enfoques terapéuticos están enfocados a reducir la disfunción mitocondrial y la sobrecarga de hierro y, por lo tanto, se basan en el uso de antioxidantes de los quelatos de hierro y de la idebenona, un análogo sintético de la ubiquinona con ensayos antioxidantes. Además de esto, como los niveles de frataxina residual son cruciales para determinar la gravedad de la enfermedad, se han hecho muchos esfuerzos para identificar las moléculas que aumentan la transcripción de frataxina (Gottesfeld 2007; Marmolino and Acquaviva 2009). Se ha observado que una nueva clase de inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) invierten la falta de FXN en las células con FRDA y actualmente está en fase de evaluación preclínica (Rai et al., 2008). También se ha observado recientemente que el agonista Azelaoil PAF (PPAR-gamma) del gamma receptor activado por un proliferador del peroxisoma, aumenta la transcripción de FXN y actualmente hay una serie de agonistas de PPAR-gamma en fase preclínica. Otro agonista PPAR-gamma, la pioglitazona antidiabética, extensamente utilizada, está entrando en la fase III del ensayo para el tratamiento de la FRDA. Finalmente, se ha observado que la eritropoyetina parece incrementar los niveles de frataxina por medio de mecanismos desconocidos (WO 2006/050819). La eritropoyetina recombinante como tratamiento de la FRDA está actualmente en fase II de los ensayos clínicos.

45

50

55 **[0005]** Mientras que se han explorado numerosos enfoques para tratar la FRDA, cada uno de ellos tiene significativas limitaciones. Así, existe una necesidad en este campo, para encontrar nuevos métodos más eficaces para tratar la FRDA.

55

RESUMEN

60 **[0006]** Esta divulgación está dirigida a las necesidades que desde hace tiempo en el campo de la medicina existen para obtener composiciones nuevas para tratar la Ataxia de Friedreich.

60

65 **[0007]** Dicho brevemente, esta divulgación proporciona composiciones para utilizar en el tratamiento de la Ataxia de Friedreich (FRDA). Esta divulgación hace referencia a los nuevos mutantes de la frataxina, nucleótidos que codifican dichos mutantes, la liberación de los mismos y el uso de dichos mutantes de la frataxina en el tratamiento de la FRDA.

65

[0008] En algunos aspectos, esta divulgación proporciona un polipéptido aislado que tiene al menos entre un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la misma secuencia que la secuencia del aminoácido de la **Figura 1** y que comprende un residuo R en una posición que corresponde a la posición 147 de la **Figura 1**.

5 **[0009]** En algunos aspectos, esta divulgación proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos entre un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la misma secuencia que la secuencia del aminoácido de la **Figura 1**.

10 **[0010]** En algunos aspectos, esta divulgación proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un nucleótido que tiene al menos entre un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de la misma secuencia que la secuencia de la misma longitud que la de la **Figura 2**.

15 **[0011]** En algunos aspectos, esta divulgación proporciona composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido aislado en esta divulgación, de forma optativa junto a uno o más excipientes, diluyentes, preservativos, solubilizantes, emulsificantes, coadyuvantes o portadores, farmacéuticamente aceptables.

[0012] En otros aspectos, esta divulgación proporciona composiciones farmacéuticas de la misma, para utilizar en el tratamiento de la Ataxia de Friedreich.

20 **[0013]** En ciertos aspectos, esta divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen un portador seleccionado entre un grupo consistente en un liposoma, un microportador polimérico, un exosoma, un portador bacteriano, y un equivalente funcional de los mismos, para usar en la liberación del polipéptido aislado dentro de una célula. En otros aspectos, el polipéptido aislado se ha fusionado con una proteína transdutora. Y, aún en otros aspectos, el polipéptido aislado se libera en la célula de la persona que sufre la Ataxia de Friedreich.

25 **[0014]** En algunos aspectos, esta divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un sistema portador seleccionado de un grupo consistente en un sistema vírico, un sistema de híbrido sintético-vírico, un sistema no vírico, y un equivalente funciona de ellos, para utilizarse en la liberación del polipéptido aislado, dentro de la célula.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0015]

35 La **Figura 1** muestra la secuencia de aminoácidos de la frataxina (SEQ ID NO:1). Los aminoácidos 1-210 representan al precursor de la frataxina, y la secuencia en cursiva (81-210) corresponde a la frataxina madura. Se ha subrayado la lisina en la posición 147.

40 La **Figura 2** muestra la secuencia de nucleótidos del gen FXN, que codifica la proteína humana frataxina.

45 La **Figura 3 A** muestra 293 células Flp-In que expresan de forma estable la frataxina¹⁻²¹⁰ (frataxina-293) o el mutante K147R de la frataxina (frataxina mutante K147R). Las células se trataron durante el tiempo indicado, con 100 mg/ml de ciclohexamida (CHX) para bloquear nuevas síntesis de proteína. Las proteínas quedaron reflejadas en la PAGE-SDS y se manifestaron con anticuerpos de antifrataxina o antitubulina como control de carga. Pre: precursor de la frataxina. Se muestra un experimento representativo de tres que se realizaron con similares resultados.

50 La **Figura 3 B** muestra un análisis densitométrico de niveles de precursor de la frataxina, como se observa en la Figura 3 A, normalizados a niveles de tubulina. La gráfica muestra el descenso, dependiente del tiempo, en el tratamiento de la CHX. WT: células de frataxina-293, K147R: células de frataxina-293 K147R.

55 La **Figura 4** muestra células HeLa que fueron inyectadas de forma transitoria con frataxina¹⁻²¹⁰ etiquetada con HA, o con el mutante de la frataxina K147R etiquetado con HA. Los extractos de proteínas, en los días indicados después de la inyección, se reflejaron en la PAGE-SES y se manifestaron con anticuerpos anti-HA o anti-tubulina como control de carga. Pre: precursor de la frataxina; int: intermedia; mat: madura; tub: tubulina. Se muestra un experimento representativo de tres que se realizaron con similares resultados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

60 **[0016]** Las explicaciones siguientes de términos y métodos sirven para describir mejor esta divulgación y servir de guía a los expertos en este campo, en la práctica de esta divulgación. Tal como se utiliza aquí, "comprende" significa "incluye" y las formas singulares "un, una, el, la" incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto claramente indique otra cosa. Por ejemplo, la referencia a "comprende una célula" incluye una o una pluralidad de tales células, y así con lo demás. El término "o" se refiere a un elemento singular de una serie de elementos alternativos que se hayan nombrado o a una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto

65

claramente indique otra cosa.

[0017] A menos que se indique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento, tienen los mismos significados que los que se entienden comúnmente por todos los expertos en el campo al que pertenece esta divulgación. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los que aquí se describen, puede usarse en la práctica o prueba de esta divulgación, a continuación se describen métodos y materiales más adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son puramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Otras características de esta divulgación son aparentes a partir de las descripciones y reivindicaciones detalladas a continuación.

[0018] Ciertos términos se discuten en este documento para servir de guía adicional al experto para describir las composiciones, dispositivos, métodos y demás aspectos del invento, y cómo hacer uso de los mismos. Aprenderíamos lo mismo si dijera en más de una manera. En consecuencia, puede usarse un lenguaje alternativo y sinónimos para uno o más términos discutidos aquí. No se tendrá en cuenta si un término se ha elaborado o discutido en este documento. Se proporcionan algunos sinónimos o métodos sustitutos, materiales y demás. Los considerandos de uno a varios sinónimos o equivalentes no excluyen el uso de otros sinónimos o equivalentes, a menos que se haya indicado explícitamente. El uso de ejemplos, incluido ejemplos de términos, es sólo con propósitos ilustrativos y no limita el ámbito y significado de los aspectos del invento.

[0019] El término "péptido" se utiliza aquí para referirse a un polipéptido corto, es decir, uno que tenga menos de unos 50 aminoácidos de longitud y, más comúnmente, cerca de unos 30. El término, tal como se usa aquí, abarca análogos e idénticos que tengan una función estructural y biológica idéntica.

[0020] El término "proteína aislada" o "polipéptido aislado" es una proteína o polipéptido que, en virtud de su origen o derivación (1), no está asociado con componentes asociados de forma natural, que lo acompañan en su estado de origen, (2) existe en un grado de pureza que no se encuentra en la naturaleza, en la que la pureza puede ser adjudicada con respecto a la presencia de otro material celular (por ejemplo, está libre de otras proteínas de la misma especie), (3) se expresa en forma de una célula de diferentes especies, o (4) no se da en la naturaleza (por ejemplo, un fragmento de un polipéptido encontrado en la naturaleza o que incluye aminoácidos análogos o derivados que no se encuentran en la naturaleza o uniones distintas a las uniones peptídicas estándar). Así, un polipéptido que se ha sintetizado químicamente o que se ha sintetizado en un sistema celular distinto de la célula de la que se origina de forma natural, se "aislará" de sus componentes naturalmente asociados. Un polipéptido o proteína también pueden pasar a ser sustancialmente libres de componentes naturalmente asociados por aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en este campo. Tal como se ha definido, "aisladas" no necesariamente requieren que la proteína, polipéptido, péptido u oligopéptido descrito hay sido retirado de su entorno nativo.

[0021] El término "fragmento de polipéptido" tal como se usa aquí, hace referencia a un polipéptido que tiene una supresión, por ejemplo, un terminal amino y/o carboxílico suprimido, en comparación con un polipéptido en toda su longitud. En una modalidad preferida, el fragmento de polipéptido es una secuencia contigua en la que la secuencia de aminoácidos del fragmento es idéntica a las posiciones del correspondiente en estado natural. Los fragmentos tienen, normalmente, al menos 5,6,7,8,9 o 10 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 12, 14, 16 o 18, y aún con más preferencia, al menos 20 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 25, 30, 40 o 45 aminoácidos, incluso más preferiblemente al menos 50 o 60 aminoácidos de longitud, e incluso más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de longitud.

[0022] Una proteína tiene "homología" o es "homóloga" con una segunda proteína si la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína tiene una secuencia similar a la secuencia de ácido nucleico que codifica la segunda proteína. De forma alternativa, una proteína tiene homología con una segunda proteína, si las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos "similares". (Así, el término "proteínas homólogas" se define para explicar que las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos similares). Tal como se usa aquí, la homología entre dos regiones de una secuencia de aminoácidos (especialmente respecto a similitudes estructurales predichas) se interpreta como que implica una similitud en funciones.

[0023] Cuando "homólogo" se utiliza en referencia a proteínas o péptidos, se reconoce que las posiciones residuales que no son idénticas, a menudo difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el residuo aminoácido es sustituido por otro residuo aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga hidrofóbica). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de la proteína. En casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieran de cada una de las sustituciones conservadoras el porcentaje de identidad secuencial o grado de homología no se ajustará para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Hay métodos para hacer estos ajustes, bien conocidos por los expertos en este campo. Véase, por ejemplo, Pearson, 1994, *Methods Mol. Biol.* 24:307-31 y 25:365-89.

[0024] Los siguientes seis grupos, contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras de otros:

ES 2 552 456 T3

1) serina (S), Treonina (T); 2) Acido aspártico (D), Acido glutámico (E) ; 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R) , Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Alanina (A), Valina (V) y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W). La Tabla 1 es una matriz de sustitución aminoácida BLOSUM62.

5 **Tabla 1**

Matriz de sustitución de aminoácida BLOSUM62

Referencia: Henikoff, S. and Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	X	Y	Z	
10	A	4	-2	0	-2	-1	-2	0	-2	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-1	-2	-1	
	B	-2	6	-3	6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-1	-3	2
15	C	0	-3	9	-3	-4	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-1	-2	-4	
	D	-2	6	-3	6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-1	-3	2
	E	-1	2	-4	2	5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-1	-2	5
20	F	-2	-3	-2	-3	-3	6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	-1	3	-3
	G	0	-1	-3	-1	-2	-3	6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-1	-3	-2
	H	-2	-1	-3	-1	0	-1	-2	8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	-1	2	0
	I	-1	-3	-1	-3	-3	0	-4	-3	4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	-1	-3
	K	-1	-1	-3	-1	1	-3	-2	-1	-3	5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-1	-2	1
25	L	-1	-4	-1	-4	-3	0	-4	-3	2	-2	4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	-1	-3
	M	-1	-3	-1	-3	-2	0	-3	-2	1	-1	2	5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-2
	N	-2	1	-3	1	0	-3	0	1	-3	0	-3	-2	6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-1	-2	0
30	P	-1	-1	-3	-1	-1	-4	-2	-2	-3	-1	-3	-2	-2	7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-1	-3	-1
	Q	-1	0	-3	0	2	-3	-2	0	-3	1	-2	0	0	-1	5	1	0	-1	-2	-2	-1	-1	2
35	R	-1	-2	-3	-2	0	-3	-2	0	-3	2	-2	-1	0	-2	1	5	-1	-1	-3	-3	-1	-2	0
	S	1	0	-1	0	0	-2	0	-1	-2	0	-2	-1	1	-1	0	-1	4	1	-2	-3	-1	-2	0
	T	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-2	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	1	5	0	-2	-1	-2	-1
	V	0	-3	-1	-3	-2	-1	-3	-3	3	-2	1	1	-3	-2	-2	-3	-2	0	4	-3	-1	-1	-2
	W	-3	-4	-2	-4	-3	1	-2	-2	-3	-3	-2	-1	-4	-4	-2	-3	-3	-2	-3	11	-1	2	-3
40	X	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
	Y	-2	-3	-2	-3	-2	3	-3	2	-1	-2	-1	-1	-2	-3	-1	-2	-2	-2	-1	2	-1	7	-2
	Z	-1	2	-4	2	5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-1	-2	5

45 **[0025]** La homologación de secuencias para polipéptidos, a las que se refiere como porcentaje de identidad de secuencias, es un software de análisis de secuencias utilizando medidas típicas. Véase por ejemplo Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group (GCG), niversity of Wisconsin Biotechnology Center, 910 University Avenue, Madison, Wis. 53705. El software de análisis de proteínas hace concordar las secuencias similares utilizando una medida de homología asignada a varias sustituciones, borrados y otras modificaciones, incluidas sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit", que pueden utilizarse con parámetros defectuosos para determinar la homología de secuencias o la identidad de secuencias entre polipéptidos íntimamente relacionados, tales como los polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos entre una proteína salvaje y una mutante de la misma. Véase por ejemplo, GCG Versión 6.1.

55 **[0026]** Un algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de polipéptidos en particular en una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de distintos organismos, es el programa informático BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)); Gish and States, Nature Genet. 3:266-272 (1993); Madden et al., Meth. Enzymol, 266 : 131-1412 (1996) ; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402 (1997) ; Zhang and Madden, Genome Res. 7 :649-656 (1997), especially blastp ortblastn (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402 (1997)).

60 **[0027]** Los parámetros preferidos por BLASTp son : Valor esperado : 10 (defecto) ; Filtro:seg (defecto); Coste para abrir un intervalo: 11 (defecto); Coste para extender un defecto: 1 (defecto); n° máximo de alineaciones: 100(defecto); tamaño de la letra: 11(defecto); N° de descripciones: 100 (defecto); Matriz de penalización: BLOSUM62.

[0028] Una persona experta en este campo también puede usar el programa ALIGN que incorpora un algoritmo no lineal de Myers and Miller (Comput. Appl. Biosci (1988) 4:11-17). Para la comparación de secuencias de aminoácidos con el programa ALIGN, un experto en este campo puede usar una tabla de peso residual PAM 120, una penalización por longitud de intervalo de 12, y una penalización de intervalo de 4.

[0029] La longitud de las secuencias de polipéptidos comparado con la homología, generalmente será de al menos 16 aminoácidos residuales, normalmente de al menos 20 residuos, más normal de al menos 24 residuos, típicamente de al menos 28 residuos y, preferiblemente más de 35 residuos. Al buscar una base de datos que contenga secuencias de un gran número de organismos distintos, es preferible comparar secuencias de aminoácidos. Las bases de datos que buscan secuencias de aminoácidos pueden medirse por algoritmos distintos al conocido en este campo, el blastp. Por ejemplo, pueden compararse secuencias de polipéptidos con FASTA, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA proporciona la identidad de secuencias de porcentajes y alineaciones de las regiones que mejor se solapan entre las secuencias de consulta y de búsqueda. Pearson, Methods Enzymol 183:63-98 (1990). Por ejemplo, la identidad de secuencia de porcentajes entre secuencias de aminoácidos puede determinarse usando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabras de 2 y la matriz de puntuación PAM250), tal como se proporciona en GCG Versión 6.1.

[0030] Molécula de Acido Nucleico; El término "molécula de ácido nucleico" o "polinucleótido" hace referencia a nucleótidos poliméricos de, al menos, una longitud de 10 bases. El término incluye moléculas de ADN (por ejemplo, moléculas de ARN y sintéticas o genómicas o ADNc (por ejemplo, ARNm o ARN sintético), así como análogos de ADN o ARN que contienen análogos de nucleótidos no naturales, con enlaces internucleósidos no nativos o ambos. El ácido nucleico puede estar en cualquier conformación tipológica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser de hélice simple doble, triple, cuádruple, parcial doble, recogida, circular o en una conformación en candado. Si es de hélice simple, la molécula de ácido nucleico puede ir en sentido de la hélice o en sentido contrario. "Molécula de ácido nucleico" incluye a moléculas de ácido nucleico que no se den de forma natural.

[0031] Aislada: Un ácido nucleico "aislado" o polinucleótido (1)(por ejemplo, un polímero mezclado o ADN o ARN) es uno que se ha separado sustancialmente de otros componentes celulares que de forma natural acompañan al polinucleótido nativo en su célula huésped, por ejemplo, ribosomas, polimerasas, y secuencias genómicas con las que están asociados de forma natural, (2) no está asociado con todo o con una parte de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentre en la naturaleza, (3) esté operativamente unido a un polinucleótido que no está unido en la naturaleza, o (4) no se da en la naturaleza. El término "aislado" o "sustancialmente puro" también puede utilizarse en referencia a ADN clonado o recombinante, análogos de polinucleótidos sintetizados químicamente, o análogos de polinucleótidos que se sintetizan biológicamente por sistemas heterólogos. No obstante, "aislado" no necesariamente requiere que el ácido nucleico o polinucleótido descrito, haya sido físicamente extraído de su entorno nativo. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico endógena en el genoma de un organismo, aquí se considera "aislada" si una secuencia heteróloga (es decir, una secuencia que no está naturalmente unida a su secuencia endógena de ácido nucleico) se coloca al lado de la secuencia endógena de ácido nucleico, de forma que la expresión de la secuencia endógena de este ácido nucleico está alterada. A modo de ejemplo, una secuencia promotora no nativa puede sustituirse (por ejemplo una recombinación homóloga) por el promotor nativo de un gen en el genoma de una célula humana, de forma que este gen tiene un patrón de expresión alterado. Este gen se convertiría en "aislado" porque se ha separado de al menos algunas de las secuencias que lo flanquean de forma natural. Un ácido nucleico también se considera "aislado" si contiene algunas modificaciones que no ocurren de forma natural en el correspondiente ácido nucleico de un genoma. Por ejemplo, una secuencia de codificación endógena se considera "aislada" si contiene una inserción, borrado o una mutación introducida artificialmente, por ejemplo, por intervención humana. Un "ácido nucleico aislado" también incluye a un ácido nucleico integrado en un cromosoma de una célula huésped en una colocación heteróloga, así como una creación de ácido nucleico presente en un episoma. Además, un "ácido nucleico aislado" puede estar sustancialmente libre de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetiza químicamente. El término también incluye moléculas de ácido nucleico y proteínas preparadas por recombinación en células huésped, así como moléculas de ácido nucleico sintetizadas y proteínas.

[0032] El término "identidad de porcentaje secuencial" o "idéntico" en el contexto de secuencias de ácido nucleico, hace referencia a los nucleótidos de dos secuencias que son los mismos cuando están alineados en su correspondencia máxima. La longitud de comparación de identidad de secuencias puede ser en un tramo de al menos 28 nucleótidos, más típico de al menos 32 nucleótidos, y preferiblemente al menos alrededor de 36 o más nucleótidos. Hay varios algoritmos distintos conocidos en este campo, que pueden usarse para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden compararse usando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas en Wisonsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wis. FASTA proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencias de regiones con el mejor solapamiento entre secuencias de consulta y búsqueda. Pearson, Methods Enzymol 183:63-98 (1990). Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico puede determinarse utilizando FASTA con sus parámetros por defecto (tamaño de letra de 6 y el factor NOPAM de la matriz de puntuación) o con el Gap, con sus parámetros por defecto, tal como se proporciona en GCG Versión 6.1. De forma alternativa, las secuencias

pueden compararse utilizando el programa informático BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Gish and States, Nature Genet. 3:266-272 (1993); Madden et al., Meth.Enzymol 266:131-141 (1996); Altschul et al. Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402 (1997) ; Zhang and Madden, Genome Res. 7 :649-656 (1997)), en especial blastp o tblastp (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402 (1997)).

[0033] Un ejemplo particular, no limitante, de un algoritmo utilizado en la comparación de secuencias de Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. (1990) USA 87:2264-68; Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:5873-77), como se utilizó en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul et al. (J. Mol. Biol. (1990) 215:403-10). Pueden efectuarse búsquedas de nucleótidos por BLAST, con el programa NBLAST, puntuación =100, longitud de palabra=12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico del invento. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul et al. (Nucleic Acids Research (1997) 25(17):3389-3402). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) (véase la página web de BLAST de National Center for Biotechnology Information).

[0034] Purificado: El término purificado no necesita una pureza absoluta; sino más bien como término relativo. Así, por ejemplo, la preparación de un producto purificado, es aquel en que el producto está más concentrado que el producto en su entorno dentro de la célula. Por ejemplo, una cera purificada es aquella que está sustancialmente separada de los componentes celulares (ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, y otros péptidos) que pueden acompañarla. En otro ejemplo, una preparación de cera purificada es aquella en la que la cera está sustancialmente libre de contaminantes, como aquellos que pueden estar presentes durante la siguiente presentación.

[0035] Recombinante: Una molécula de proteína o ácido nucleico recombinante es aquella que tiene una secuencia que no se da de forma natural, tiene una secuencia hecha artificialmente combinando dos segmentos de secuencia, que de otra forma estarían separados, o ambos. Esta combinación artificial se puede conseguir, por ejemplo, por una síntesis química o por la manipulación artificial de segmentos aislados de proteínas o moléculas de ácido nucleico, tales como técnicas de ingeniería genética. La recombinación también se utiliza para describir moléculas de ácido nucleico que se han manipulado artificialmente, pero que contienen las mismas secuencias regulatorias y regiones de codificación, que las que se encuentran en los organismos en los que el ácido nucleico ha sido aislado.

[0036] "Unión específica" hace referencia a la capacidad de dos moléculas para unirse una a la otra antes que unirse a las moléculas del entorno. Típicamente, las "uniones específicas" discriminan las uniones adventicias en una reacción de al menos dos pliegues, más bien al menos 10, a menudo al menos 100. Típicamente, la afinidad o rapidez de una reacción de unión específica, cuantificada por la constante de disociación, de 10^{-7} o más fuerte (por ejemplo, alrededor de 10^{-8} M, 10^{-9} M o incluso más fuerte).

[0037] En general, "la hibridación astringente" se realiza a unos 25°C por debajo del punto de fusión (T_m) para el híbrido específico de ADN bajo unas condiciones particulares. La T_m es la temperatura a la cual se hibridiza un 50% de la secuencia deseada para obtener una investigación que concuerde perfectamente. Véase Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) page 9.51. Para los propósitos aquí descritos, "condiciones astringentes" se definen para una hibridación en fase de solución como hibridación acuosa (por ejemplo, libre de formamida) en 6xSSC (donde 20xSSC contiene 3.0 M de cloruro sódico y 0,3 M de citrato sódico), 1% SDS a 65°C durante 8-12 horas, seguido de dos lavados en 0,2xSSC 0,1% SDS a 65°C durante 20 minutos. El experto agradecería que la hibridación a 65°C ocurra a diferentes grados según un número de factores, incluidos la longitud y porcentaje de identidad de las secuencias que estén hibridando.

[0038] Un ejemplo preferido, no limitante, de condiciones de hibridación astringente incluyen la hibridación en 4x clorato de sodio/citrato de sodio (SSC) a 65-70°C (o hibridación en 4xSSC más un 50% de formamida a 42-50°C) seguido de uno o más lavados en 1xSSC, a 65-70°C. Un ejemplo, no limitante, de condiciones de hibridación altamente astringente, incluyen una hibridación en 1xSSC, a 65-70°C (o hibridación en 1xSSC más un 50% de formamida a 50°C) seguido de uno o más lavados en 0,3xSSC, a 65-70°C. Un ejemplo, no limitante, de condiciones de hibridación reducidamente astringente, incluyen la hibridación en 4xSSC, a 50-60°C (o una hibridación alternativa 6xSSC más un 50% de formamida a 40-45°C) seguido de uno o más lavados a 50-60°C. Los rangos intermedios, por ejemplo a 65-70°C o a 42-50°C también entran en el propósito del invento. SSPE (1xSSPE es 0,15 M de cloruro de sodio, 10mM de NaH_2PO_4 , y 1,25 mM EDTA, pH 7.4) puede sustituirse por SSC (1xSSC es 0,15 M de cloruro sódico y 15 mM de citrato sódico) en la hibridación y tampones de lavado; los lavados se efectúan durante 15 minutos cada uno después de completar la hibridación. Las temperaturas de hibridación para híbridos se anticipa ser menos a 50 pares de bases de longitud deberían ser 5-10°C inferiores al punto de temperatura, T_m del híbrido, donde T_m se determina según las ecuaciones siguientes. Para híbridos menores a 18 pares de longitud, T_m (°C)=2(# de bases A+T)+4(# de bases G+G). Para híbridos entre 18 y 49 pares de bases de longitud, T_m (°C)=81,5+16-6(log₁₀Na⁺) + 0,41 (% G+G)-(600/N), donde N es el número de bases del híbrido, y (Na⁺) es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación (Na⁺) para 1xSSC=0,165M).

[0039] El experto reconoce que pueden añadirse agentes para hibridar y/o tampones de lavado. Por ejemplo, hacer

descender la hibridación no específicas de moléculas de ácidos nucleicos para, por ejemplo, agentes bloqueadores de la membrana de nilón o nitrocelulosa, incluidos pero no limitados a, BSA o ADN portador de esperma de arenque o salmón y/o detergentes, incluidos pero no limitados a, SDS, agentes quelantes EDTA, Ficoll, PVP y otros parecidos que también pueden utilizarse. Al usar membranas de nylon, en particular, se pone un ejemplo adicional, no limitante, de condiciones de hibridación astringente en 0,25-0,5M de fosfato sódico, 7% SDS a 65°C, seguido de uno o más lavados a 0,02M de fosfato sódico, 1% SDS a 65°C/Church and Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995) o, de forma alternativa, 0,2xSSC, 1% SDS.

[0040] El término “homología sustancial” o “similaridad sustancial” al referirse a fragmentos de ácido nucleico, indica que, cuando se alinean adecuadamente las inserciones o borrados adecuados de nucleótidos con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), hay una identidad de secuencia nucleotídica al menos 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, preferiblemente alrededor del 90%, y mejor aún 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de bases nucleotídicas, tal como se midió según un conocido algoritmo de identidad de secuencia, como FASTA, BLAST o Gap, tal como se ha discutido anteriormente.

[0041] De forma alternativa, existe homología sustancial o similar cuando un ácido nucleico un fragmento del mismo hibridiza con otro ácido nucleico, en una hebra de otro ácido nucleico, o de una hebra complementaria de ellos, en condiciones de hibridación astringente. “Condiciones de hibridación astringente” y “condiciones de lavado astringente” en el contexto de experimentos de hibridación astringente, depende de cierto número de parámetros físicos distintos. La hibridación de ácidos nucleicos se verá afectada por dichas condiciones, como la concentración de sal, temperatura, solventes, composición de la base de las especies a hibridar, longitud de las regiones complementarias y el número de desigualdades de la base nucleotídica entre los ácidos nucleicos que hibridan, tal como apreciarán los expertos en este campo. Un experto sabe cómo variar estos parámetros para conseguir una astringencia determinada de hibridación.

[0042] Tal como se utiliza aquí, una composición que sea un compuesto “sustancialmente puro” es que está sustancialmente libre de uno o más compuestos, por ejemplo, la composición contiene más de un 80% de volumen, 90%, 95%, 96%, 97%, 99,8% o 99,9% del compuesto; o menos de un 20% de volumen, 10%, 5%, 3%, 1%, 0,5%, 0,1% de uno o más compuestos, según el volumen total de la composición.

[0043] Vector: El término “vector” tal como se utiliza aquí, hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que es un bucle de ADN de doble hélice circular en el que pueden unirse otros segmentos de ADN. Otros vectores incluyen cósmidos, cromosomas bacterianos artificiales (BACs) y cromosomas de levadura artificial (YACs). Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden unirse otros segmentos de ADN artificial con el genoma vírico (discutido en más detalle a continuación). Ciertos vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores que tienen un origen de replicación que funciona en la célula huésped). Otros vectores pueden integrarse en el genoma de una célula huésped al introducirse en ella, y así replicarse junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores preferidos son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos de forma operativa. En este documento se les denomina “vectores de expresión recombinante” (o simplemente, “vectores de expresión”). Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores selectivos y otros elementos genéticos conocidos en este campo. Vectores adecuados para utilizar en cianobacterias incluyen plásmidos auto-replicantes (por ejemplo, copias múltiples y expresión de alto nivel) y plásmidos de integración cromosómica. La integración de vectores en el genoma o en vectores de replicación autónoma permite la expresión de los genes en la célula huésped. Cuando la expresión estable proviene de la integración, puede producirse de forma aleatoria la integración en el sitio de la unión, dentro del genoma huésped o puede estar dirigido con el uso de uniones que contengan regiones de homología con el genoma huésped, suficiente para recombinarse con la posición del huésped. Cuando las uniones se enfocan a una posición endógena, todas o algunas de las regiones de transcripción y traslación pueden haber sido proporcionadas por la posición endógena.

Mutantes de la frataxina

[0044] Como la gravedad de la FRDA se corresponde inversamente con los niveles de frataxina en la célula, la mayoría de investigadores se han centrado en la caracterización de moléculas que aumentasen la transcripción de FXN. Aquí, esta divulgación proporciona un método novedoso de mantener los niveles adecuados de frataxina celular, no aumentando la transcripción de FXN, sino desarrollando un precursor mutante de frataxina.

[0045] La frataxina humana se sintetiza como precursor del aminoácido 210 (SEQ ID NO:1), que rápidamente se dirige a la mitocondria. Al entrar en la mitocondria, el precursor de frataxina sufre un proceso proteolítico que genera frataxina madura, un polipéptido globular del aminoácido 130 que reside mayoritariamente dentro de la matriz de la mitocondria. La frataxina está involucrada en el adecuado funcionamiento de la maquinaria de unión azufre-hierro (ISC). Las células de frataxina defectuosa, de hecho han reducido la actividad de las enzimas que contienen ISC, un desequilibrio general en la distribución del hierro intracelular y el aumento de la sensibilidad al estrés oxidativo. La frataxina se conserva muchísimo entre las especies, desde las bacterias a los humanos, y no es excesivo, sino que es absolutamente necesario para la vida de los eucariotas superiores.

- 5 [0046] Se observó que el precursor de frataxina se modificaba directamente por la ubiquitina y, en consecuencia, iba dirigida al proteosoma para degradarlo. Lo más normal es que la ubiquitina se una a los residuos de lisina en los sustratos, y en el caso de la frataxina, se determinaba que la ubiquitina se unía al residuo K147 (Figura 1). Por mutagénesis específica de K 147, se genera una frataxina mutante que es menos fácil de unirse a la ubiquitina. En una modalidad, los mutantes de la frataxina tienen otros residuos que no son la lisina en el residuo 147 (relativo a SEQ ID NO:1).
- 10 [0047] En una modalidad, los mutantes de frataxina tienen arginina en el residuo 147. De forma alternativa, los mutantes de frataxina tienen histidina en el residuo 147. En otra alternativa, el residuo 147 es serina, treonina, asparginina o glutamina. En otra alternativa, el residuo 147 es glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina o triptófano. En otra alternativa, el residuo 147 es cisteína o prolina. En otra alternativa, el residuo 147 es ácido aspártico o ácido glutámico.
- 15 [0048] Por mutagénesis específica de la lisina crucial (K) en arginina (r), se generó la frataxina K147R, un mutante de la frataxina sin ubiquitona. Como dicha frataxina K147R no puede unirse a la ubiquitona, es relativamente resistente a la degradación por medio del proteosoma.
- 20 [0049] Los mutantes de la frataxina que tienen otro residuo que no es la lisina en la posición 147, incluida la frataxina K147R, son introducidos en las células de frataxina defectuosa mediante uno de varios procedimientos. La proteína puede ser liberada directamente o después de cargarse en los liposomas, microportadores poliméricos, exosomas o portadores bacterianos, con o sin haberse unido a un dominio transductor de proteína. Los mutantes de la frataxina también pueden ser liberados a las células mediante un sistema de unión vírico, híbrido sintético-vírico o no vírico con FXN mutante cADN y luego administrándolo al sujeto. Un sujeto que tenga una deficiencia de frataxina puede tratarse eficazmente recibiendo una cantidad terapéuticamente eficaz de composición farmacéutica de frataxina k147R, que de forma opcional incluye excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 25 [0050] En algunos aspectos, esta divulgación proporciona polipéptidos aislados que tienen al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad secuencial a SEQ ID NO:1 y comprenden un residuo distinto a la lisina en la posición correspondiente a la posición 147 de SEQ ID NO:1. En un aspecto, esta divulgación proporciona polipéptidos que tienen al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad secuencial a SEQ ID NO:1 y comprenden un residuo R en la posición correspondiente a la posición 147 de SEQ ID NO:1.
- 30 [0051] En algunos aspectos, esta divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico aislado que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un nucleótido que tiene al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de secuencia idéntica a SEQ ID NO:1.
- 35 [0052] En algunos aspectos, esta divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico aislado que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un nucleótido que tiene al menos un 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de secuencia idéntica a SEQ ID NO:2.
- 40 [0053] Una **frataxina** más estable como herramienta terapéutica. La mutación FXN del residuo K147 en un residuo distinto a la lisina confiere estabilidad al precursor de la frataxina y permite la generación de más cantidades de frataxina madura. La arginina sustituye a la K147. El aumento de estabilidad de la frataxina K147 comparada con la frataxina salvaje puede ser una clara ventaja para ambas aproximaciones terapéuticas de sustitución base-gen y base-proteína, al tratamiento de la Ataxia de Friedreich. De forma específica, la frataxina mutante K147T es útil en las siguientes áreas de intervención terapéutica:
- 45 [0054] Liberación de proteína. La frataxina K147R puede liberarse a las células de frataxina defectuosa después de cargarla en los liposomas convencionales, tanto en forma de vesículas unilaminares (ULV) o multilaminares (MLV), tal como estaba descrito en (Balasubramanian et al., 2010; Torchilin, 2005; Walde and Ichikawa, 2001) y demás referencias. Para aumentar la estabilidad liposomal, los liposomas pueden envolverse con polietilenglicol (PEG) o encapsulados en matrices poliméricas, como el quitosán (Werle and Takeuchi, 2009), alginatos (Dai et al., 2006) u otros. También pueden utilizarse liposomas encapsulados más estables (capsosomas), tal como se describe en (Stadler et al., 2009), y también pueden utilizarse otros liposomas (liposomas desencadenantes) que liberan su contenido después de un desencadenante externo encontrado en tejidos específicos o condiciones metabólicas, tal como se describe en (Chen et al., 2004).
- 50 [0055] De forma alternativa, la frataxina K147R puede liberarse después de quedar atrapada en microportadores poliméricos, como el ácido poli(lacti-co-glicólico), micropartículas de ácido, tal como se describen en (Kim et al., 2009), poli(e-caprolactona) de larga duración (Coccoli et al., 2008), microesferas de polianhídridos, tales como poli(1,3-bis-(p-carboxifenoxipropano)-co-anhídrido sebácico) (P(CPP-SA)) (Sun et al., 2009), o microcápsulas de cápsula acorazada (Haidar et al., 2008). La liberación de frataxina K147R puede conseguirse utilizando sistemas más eficaces como nanopartículas poliméricas (Singh and Lillard, 2009) (Hadarsri et al., 2009), micelos poliméricos (Miller et al., 2009) o polimersomas (Onaca et al., 2009) (Christian et al. 2009), utilizando poliestireno (Zauner et al.,
- 55
- 60
- 65

2001), ácido poli(lácti-co-glicólico) (Garnacho et al., 2008), PEG (Christian et al., 2009) (Dziubla et al., 2005) u otros polímeros.

5 **[0056]** La frataxina K147R también puede introducirse en las células de frataxina defectuosa utilizando bacterias como *Listeria monocytogenes* como vehículo de liberación (Dietrich et al., 1998; Ikonomidis et al., 1997) u otras formas atrapadas en exosomas, que se dan de forma natural en nanovesículas liberadas por las células (Simons and Raposo, 2009). Además, la frataxina K147R puede liberarse fusionándola con anticuerpos o péptidos, añadiendo glicosilación, quitando lugares involucrados en la activación, o con la proteína PEG, añadiendo de forma covalente polietilenglicol a la proteína (Goodson and Katre, 1990). Finalmente, la frataxina k147R puede administrarse directamente por métodos tradicionales de liberación de proteínas, como microinyección y electroporación.

15 **[0057]** La liberación de frataxina K147R en células de frataxina defectuosa, puede verse muy mejorada gracias al uso de dominios de transducción de proteínas (PTD), incluido TAT, Antp., VP22 y otros. Los 11 péptidos de la proteína TAT HIV-1 es la que se ha investigado de forma más extensa entre los PTDs (Rapoport and Lorberboum-Galski, 2009). Así pues, TAT u otros PTDs, puede ser utilizados para modificar liposomas, microportadores, nanopartículas, micelas o exosomas que contengan frataxina K147R, para facilitar la entrada en las células.

20 **[0058]** TAT u otros PTDs pueden fusionarse directamente en el marco con frataxina K147R, para una liberación directa de proteína a las células de frataxina defectuosa, tal como se describe para otras proteínas cuyo objetivo es la mitocondria (Rector et al., 2008) (Rapoport et al., 2008).

25 **[0059]** En un ejemplo que se parece mucho al de la liberación de frataxina en las mitocondrias de las células con FRDA, la proteína mitocondrial lipoamida deshidrogenasa (LAD), de hecho se fusionó con TAT en un intento terapéutico de curar la deficiencia de LAD (Rapoport et al., 2008). La deficiencia de LAD (enfermedad urinaria del jarabe de arce) es un trastorno neurológico recesivo autosómico raro causado por mutaciones en el gen lipoamida deshidrogenasa, y da lugar a una actividad defectuosa de LAD, un enzima mitocondrial involucrado en el metabolismo de los carbohidratos y aminoácidos. De forma similar a la frataxina, el precursor de LAD se introduce en la mitocondria y, después procesado proteolíticamente en una forma funcionalmente madura.

30 **[0060]** Así pues, la frataxina K147R puede clonarse descendiendo de TAT en un plásmido pTAT. El resultado puede utilizarse para transformar células competentes *E. coli*, y luego puede purificarse la fusión de proteína TAT-frataxina K147R recuperada de la bacteria flotante, mediante cromatografía líquida u otros métodos (Rapoport et al. 2008). Para probar la actividad del producto purificado, la proteína fusionada TAT-frataxina k147R puede liberarse directamente a los fibroblastos o linfoblastos afectados de FRDA, que están en cultivo, y después puede cuantificarse la cantidad de frataxina intracelular e intramitocondrial gracias a un análisis SDS-PAGE y "Western blot". Normalmente los ensayos se hacían para probar funcionalmente la frataxina en las células, como la actividad enzimática de la aconitasa, que puede utilizarse para confirmar la recuperación funcional de células afectadas de FRDA, después de haber estado expuestas a la fusión proteínica TAT-frataxina K147R. Después, la eficacia de esta fusión puede probarse en el modelo disponible de ratones afectados por FRDA, sea por infusión sistémica directa o por infusión sistémica tras encapsulación en cualquier micro o nanoportador de los previamente descritos. Los ratones tratados pueden marcarse bioquímicamente (cuantificación de niveles de frataxina en múltiples tejidos) y fenotípicamente (retraso en la progresión de la enfermedad, mejora de la ejecución sensoriomotora, etc.) para evaluar la eficacia.

45 **[0061]** En todos los anteriores ejemplos mencionados de liberación de proteína, la posibilidad de cargar los liposomas, microportadores o exosomas con una forma más estable de frataxina, por ejemplo, la frataxina k147R mutante, o la posibilidad de fusionar cualquier PTD con una forma más estable de frataxina, por ejemplo la frataxina k147R mutante, puede dar lugar a una biodisponibilidad más larga de la frataxina administrada, comparado con ensayos similares, en los que se usó frataxina salvaje con una posible reducción en el régimen de administración, dosificación, etc. que puede reducir costes y malestar y efectos secundarios en los pacientes.

50 **[0062]** En ciertos aspectos, esta divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un portador seleccionado de un grupo que puede consistir en un liposoma, un microportador polimérico, un exosoma, un portador bacteriano, y un equivalente funcional de ellos, para usarse en la liberación del polipéptido aislado, en la célula. En más aspectos, el polipéptido se ha fusionado en el marco con un dominio transductor proteínico. Y aún en otros aspectos, el polipéptido aislado se ha liberado en las células de un sujeto con Ataxia de Friedreich.

60 **[0063]** En algunos aspectos, esta divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un sistema portador seleccionado de un grupo consistente en un sistema vírico, un sistema híbrido vírico-sintético, un sistema no vírico y un equivalente funcional de los mismos, para usar en la liberación de un polipéptido aislado, en las células.

65 **[0064]** Terapia genética. La terapia genética para enfermedades neurodegenerativas, está enfocada a utilizar sistemas víricos y no víricos, tal como lo resume (Nanou and Azzouz 2009) y las referencias que allí se citan. Los

sistemas víricos incluyen adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, lentivirus, virus del herpes, virus de vacunas, poxivirus y otros (Cardone 2007) (Lim et al., 2010). Los sistemas no víricos puede hacer uso de ADN o liposomas desnudos como portadores. También pueden utilizarse sistemas híbridos vírico-sintéticos (Nanou and Azzouz 2009), así como sistemas bacterianos, como *Escherichia coli*, o *Shigella flexneri* (Sizemore et al., 1995; Courvalin et al., 1995). Por consiguiente, las propuestas de terapia genética para tratar FRDA mediante la codificación de ADN para la frataxina mutante K147R, puede conseguirse usando uno de estos sistemas.

[0065] Los vectores derivados de lentivirus en particular, se ha observado que permiten la expresión genética efectiva en la Atrofia Muscular Espinal (SMA), otra enfermedad monogénica hereditaria, caracterizada por pérdida neuronal periférica. La SMA es debida a mutaciones o supresiones del gen proteínico “supervivencia de las neuronas motoras” (SMN por sus siglas en inglés “survival motor neuron”) que conduce a una reducción de SMN, una proteína nuclear y citoplasmática necesaria para la supervivencia de las neuronas motoras. En un modelo animal con SMA, se ha demostrado que un virus de anemia infecciosa equina (EIAV) basada en un lentivector del pseudotipo de los virus de la rabia G, es eficaz en frenar el transporte axonal y se ha usado para transducir neuronas de la espina dorsal, tras inyecciones víricas en los músculos (Azzouz et al., 2004).

[0066] Por consiguiente, la frataxina mutante K147R puede clonarse en vectores de transferencia basados en EIAV de la rabia G, inactivos (Azzouz et al., 2002). El lentivector EIAV-frataxina K147R, puede probarse primero acerca de la habilidad para expresar y reconstituir la frataxina en células con frataxina defectuosa, mediante una exposición *in vitro* de fibroblastos afectados de FRDA, y la consiguiente cuantificación por análisis SDS-PAGE y western blot. Pueden usarse ensayos comúnmente utilizados para probar de forma funcional la frataxina en las células, como la actividad enzimática de la aconitasa, para confirmar la recuperación funciona de células con FRDA tras la exposición del lentivector. Luego, este lentivector EIAV-frataxina K147R se inyectará en múltiples lugares en los músculos periféricos de ratones con FRDA. Los ratones tratados se medirán bioquímicamente (cuantificación de niveles de frataxina en múltiples tejidos) y fenotípicamente (retraso en el progreso de la enfermedad, mejora de la función sensoriomotora, etc.) para evaluación de la eficacia.

[0067] En todos los ejemplos antes mencionados de terapia genética, la posibilidad de unir sistemas víricos, no víricos o híbridos con un gen que codifique una forma más estable de frataxina, por ejemplo, la frataxina mutante K147R, puede dar lugar a una biodisponibilidad más larga de la frataxina comparada con otras aproximaciones similares usando frataxina salvaje, con una posible reducción en el régimen de administración, dosificación, etc. que pueda reducir los costes así como las molestias y efectos secundarios en los pacientes.

[0068] En algunos aspectos, esta divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido aislado, en esta divulgación, opcionalmente junto a uno o más excipientes, diluyentes, preservativos, solubilizantes, emulsificantes, coadyuvantes o portadores farmacéuticamente aceptables.

[0069] Además, puede utilizarse una cantidad terapéuticamente eficaz de composición farmacéutica de frataxina mutante K147R para tratar la deficiencia de frataxina. Esta composición farmacéutica, además, puede comprender uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables para proporcionar una composición farmacéutica. Los excipientes que sirven de ejemplo incluyen, sin limitación alguna, carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobóticos, antioxidantes, tensioactivos, tampones, ácidos, bases y una combinación de ellos. Los excipientes adecuados para composiciones inyectables incluyen agua, alcoholes, polialcoholes, glicerina, aceites vegetales, fosfolípidos y tensioactivos. Pueden estar presentes derivados del azúcar, como el alditol, ácido aldónico, azúcar esterificado, y o un polímero de azúcar como excipientes. Los excipientes a base de carbohidratos específicos incluyen por ejemplo: monosacáridos, como la fructosa, maltosa, galactosa, glucosa-D-manosa, sorbosa, y parecidos; disacáridos, como lactosa, sacarosa, trebalosa, celobiosa y parecidos; y alditoles, como manitol, xilitol, lactitol, sorbitol (glucitol), piranosil sorbitol, mioinositol, y parecidos. El excipiente también puede incluir una sal orgánica o tampón, como ácido cítrico, cloruro sódico, cloruro potásico, sulfato sódico, nitrato potásico, fosfato sódico monobásico, fosfato sódico dibásico y una combinación de ellos.

[0070] Una composición del invento puede incluir también un agente antimicrobiano para prevenir o ralentizar el crecimiento bacteriano. Ejemplos no limitativos de agentes antimicrobianos adecuados para este invento incluyen, cloruro de benzalconio, cloruro de benzeltonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol fenilético, nitrato fenilmercúrico, timerosol y una combinación de ellos.

[0071] También puede estar presente un antioxidante en la composición. Los antioxidantes se utilizan para evitar la oxidación, previniendo así el deterioro de la frataxina mutante K147R u otros componentes de la preparación. Los antioxidantes adecuados para usar en este invento incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, propilgalato, bisulfito sódico, formaldehído sódico, sufloxilato sódico, metabisulfito, y una combinación de ellos.

[0072] Puede haber un tensioactivo como excipiente. Ejemplos de tensioactivos incluyen: polisorbatos, como “Tween 20” y “Tween 80”, y plurónicos, como F68 y F88 (BASF, Mount Olive, N.J.), ésteres de sorbitán, lípidos, como fosfolípidos del tipo lisina o otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas (aunque, preferiblemente no en forma liposomal), ácidos grasos y ésteres grasos, esteroides, como el colesterol, agentes quelantes, como EDTA; y zinc y

otros cationes adecuados.

[0073] Los ácidos y bases pueden estar presentes como excipientes en la composición. Ejemplos no limitativos de ácidos que pueden suarse, incluyen aquellos ácidos seleccionados de un grupo consistente en ácido hidrociorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, y una combinación de ellos. Ejemplos de bases adecuadas incluyen, sin ninguna limitación, bases seleccionadas del grupo consistente en hidróxido sódico, acetato sódico, hidróxido amónico, hidróxido potásico, acetato amónico, acetato potásico, fosfato sódico, fosfato potásico, citrato sódico, formato sódico, sulfato sódico, sulfato potásico, fumarato potásico, y una combinación de ellos.

[0074] La cantidad de frataxina mutante K147R (por ejemplo, cuando está contenida en un sistema de liberación de un fármaco) en la composición, dependerá de un cierto número de factores, pero de forma óptima, será una dosis terapéuticamente eficaz cuando la composición sea en forma de dosis unitaria o contenedor (por ejemplo, un vial). Puede determinarse la dosis terapéuticamente eficaz, de forma experimental, mediante la administración repetitiva de cantidades crecientes de la composición para determinar qué cantidad produce el efecto final clínicamente deseado.

[0075] La cantidad de un excipiente individual en la composición, variará según la naturaleza y función del excipiente y las necesidades específicas de la composición. De forma típica, la cantidad óptima de excipiente individual se determina por experimentación rutinaria, por ejemplo, preparando composiciones que contengan cantidades variables del excipiente (de menos a más), examinando la estabilidad y otros parámetros, y luego determinando el rango en el cual se consigue la funcionalidad óptima, sin efectos secundarios significativos.

[0076] Las composiciones abarcan todo tipo de formulaciones y, en especial, aquellas que son adecuadas para inyección, por ejemplo, polvos o liofilizados que pueden reconstituirse con un solvente antes de usarse, así como soluciones listas para inyectar o suspensiones, composiciones insolubles secas para combinar con un vehículo antes del uso, y emulsiones y concentrados líquidos para diluir antes de administrar. Ejemplos de diluyentes adecuados para reconstituir composiciones sólidas antes de inyectar incluyen agua bacteriostática para inyección, dextrosa 5% en agua, fosfato en solución salina tamponada, solución de Ringer, agua esteril, agua desionizada, y combinaciones de ellos. Con respecto a composiciones líquidas farmacéuticas, se prevén soluciones y suspensiones. Otras composiciones adicionales de preferencia aquí, incluyen aquellas para liberación oral, ocular, o localizada.

[0077] Las preparaciones farmacéuticas de aquí, también pueden estar metidas en una jeringa, un dispositivo de implantación, o similar, según el modo de liberación y el uso. Preferiblemente, las composiciones descritas aquí son en forma de dosis unitarias, lo que significa una cantidad de conjugado o composición del invento adecuada para una dosis unitaria, en forma preempaquetada o premedida.

[0078] Habiendo descrito ahora de forma de forma general varios aspectos y formas del invento, se entenderá más fácilmente mediante los ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración, y que no son limitantes, a menos que se especifique.

ASPECTOS EJEMPLARES

EJEMPLO 1

Uniones de ADN

[0079] La unión de pcADN3-frataxina-HA se generó subclonando la frataxina etiquetada-HA 3' a partir de frataxina HA-pBS en el vector ADNpc3. Las uniones de mutantes de lisina se generaron usando el kit de mutagénesis dirigido Quick-Change site (Stratagene) con cebadpres específicos usando ADN5pc-frataxina o ADN3pc-frataxina-HA como modelo. Todas las uniones generadas se verificaron secuenciando el ADN.

EJEMPLO 2

Inmunotransferencia

[0080] Anticuerpos. Se utilizaron los siguientes anticuerpos para el análisis western blot: mAb anti-frataxina (MAB-10876, Immunological Science). mAb anti-HA (clon HA-7, Sigma) mAb anti-tubulina (Sigma) anticuerpo secundario HRP-conjugado cabra anti-ratón (Pierce).

[0081] Inmunotransferencia. Los extractos de células se prepararon modificando el tampón RIPA (10 mM de fosfato sódico pH 7.2, 150 mM de cloruro sódico, 1% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 1% Np40, 2 mM EDTA) o un tampón IP (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de cloruro sódico, 1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA)

5 suplementado con un coctel inhibidor de proteasa completa y 2 mM N-Etil-maleimida (NEM). Para inmunotransferencia, se separaron 100 mg de extracto de proteína en 12% SDS-PAGE, manchados en la membrana de nitrocelulosa y detectados con anticuerpos específicos. Todas las inmunotransferencias se revelaron por ECL (Healthcare), se hizo un análisis densitométrico utilizando el software Image J.

5 EJEMPLO 3

Resistencia de la frataxina K147R a la degradación por medio de proteosoma

10 **[0082]** La frataxina mutante K147R fue expresada de forma estable en células Flp-In-203 para probar si la pérdida de colocación de la ubiquitina otorgaba a la frataxina mutante K147R una resistencia relativa a la degradación por proteosoma, aumentando así su estabilidad. Las células Flp-In-203 (Invitrogen) son variantes de riñón embrionario humano HEK293 que otorgan la integración estable e isogénica y la expresión de un gen infectado. Las células Flp-In-293 se mantuvieron en DMEM con un suplemento de un 10% de FBS y se infectaron con un método de precipitación calcio/fosfato. Brevemente, las células se pusieron en centros de 10cm y se infectaron con 10mg de ADN. Se utilizó ADN5pc-frataxina K147R para generar una línea de células estables Flp-In 293. Dichas células que expresaban de forma estable la frataxina K147R, se obtuvieron de cultivos de selección media que contenía 100 mg/ml de higromicina B (Invitrogen). Después de la exposición a la ciclohexamida para bloquear nuevas síntesis de proteínas, la estabilidad del precursor de la frataxina k147R se monitorizó un tiempo y se comparó con la estabilidad del precursor de frataxina¹⁻²¹⁰ salvaje, que se expresaba de forma estable en células Flp-In-293 y se trataron de forma similar. La **Figura 3 A-B** muestra que el precursor de la frataxina K147R es significativamente más estable (\pm 45% de la introducción tras 24 horas), que el precursor de frataxina¹⁻²¹⁰ (\pm 15% de la introducción tras 24 horas).

25 EJEMPLO 4

Estabilidad de la frataxina K147R

30 **[0083]** En un diferente juego de experimentos, el mutante Ha-frataxina K147R etiquetada, o el mutante Ha-frataxina¹⁻²¹⁰ wt etiquetada, se expresó de forma transitoria en células HeLa a usando ADN3pc-frataxina-HA K147R. Las células HeLa se mantuvieron en DMEM con un suplemento de un 10% de FBS y se infectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Esta aproximación fuerza la expresión ectópica y permite detectar todos los productos en proceso, incluyendo la frataxina madura. La persistencia de frataxina K147R fue seguida durante un periodo de 5 días después de infectarla y se comparó con la de la frataxina salvaje. La **Figura 4** muestra que la frataxina K147R está correctamente procesada y que su expresión permite acumular niveles más altos de precursor de frataxina, de frataxina intermedia y de frataxina madura. De forma importante, aún se podía observar una cantidad significativa de frataxina K147R madura después de 3 días de la infección, en un momento en que la frataxina de tipo maduro ya no se detectaba.

40 REFERENCIAS

[0084]

- 45 Azzouz, M., Le, T., Ralph, G.S., Walmsley, L., Monani, U.R., Lee, D.C., Wilkes, F., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., Burghes, A.H., et al. (2004). Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 114, 1726-1731.
- 50 Azzouz, M., Martin-Rendon, E., Barber, R.D., Mitrophanous, K.A., Carter, E.E., Rohll, J.B., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J., and Mazarakis, N.D. (2002). Multicistronic lentiviral vector-mediated striatal gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase, and GTP cyclohydrolase I induces sustained transgene expression, dopamine production, and functional improvement in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22, 10302-10312.
- 55 Balasubramanian, V., Onaca, O., Enea, R., Hughes, D.W., and Palivan, C.G. (2010). Protein delivery: from conventional drug delivery carriers to polymeric nanoreactors. *Expert Opin Drug Deliv* 7, 63-78.
- 60 Cardone, M. (2007). Prospects for gene therapy in inherited neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 20, 151-158.
- 65 Chen, T., McIntosh, D., He, Y., Kim, J., Tirrell, D.A., Scherrer, P., Fenske, D.B., Sandhu, A.P., and Cullis, P.R. (2004). Alkylated derivatives of poly(ethylacrylic acid) can be inserted into preformed liposomes and trigger pH-dependent intracellular delivery of liposomal contents. *Mol Membr Biol* 21, 385-393.
- Christian, D.A., Cai, S., Bowen, D.M., Kim, Y., Pajeroski, J.D., and Discher, D.E. (2009). Polymersome carriers:

- from self-assembly to siRNA and protein therapeutics. *Eur J Pharm Biopharm* 71, 463-474.
- Coccoli, V., Luciani, A., Orsi, S., Guarino, V., Causa, F., and Netti, P.A. (2008). Engineering of poly(epsilon-caprolactone) microcarriers to modulate protein encapsulation capability and release kinetic. *J Mater Sci Mater Med* 19, 1703-1711.
- Courvalin, P., Goussard, S., and Grillot-Courvalin, C. (1995). Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C R Acad Sci III* 318, 1207-1212.
- Dai, C., Wang, B., Zhao, H., Li, B., and Wang, J. (2006). Preparation and characterization of liposomes-in-alginate (LIA) for protein delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 47, 205-210.
- Deitrich, G., Bubert, A., Gentschev, I., Sokolovic, Z., Simm, A., Catic, A., Kaufmann, S.H., Hess, J., Szalay, A.A., and Goebel, W. (1998). Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol* 16, 181-185.
- Dziubla, T.D., Karim, A., and Muzykantov, V.R. (2005). Polymer nanocarriers protecting active enzyme cargo against proteolysis. *J Control Release* 102, 427-439.
- Garnacho, C., Dhami, R., Simone, E., Dziubla, T., Leferovich, J., Schuchman, E.H., Muzykantov, V., and Muro, S. (2008). Delivery of acid sphingomyelinase in normal and niemann-pick disease mice using intercellular adhesion molecule-1-targeted polymer nanocarriers. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 400-408.
- Goodson, R.J., and Katre, N.V. (1990). Site-directed pegylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site. *Biotechnology* 8, 343-346.
- Haidar, Z.S., Hamdy, R.C., and Tabrizian, M. (2008). Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. *Biomaterials* 29, 1207-1215.
- Hasadsri, L., Kreuter, J., Hattori, H., Iwasaki, T., and George, J.M. (2009). Functional protein delivery into neurons using polymeric nanoparticles. *J Biol Chem* 284, 6972-6981.
- Ikonomidis, G., Portnoy, D.A., Gerhard, W., and Paterson, Y. (1997). Influenza-specific immunity induced by recombinant *Listeria monocytogenes* vaccines. *Vaccine* 15, 433-440.
- Kim, B.S., Oh, J.M., Hyun, H., Kim, K.S., Lee, S.H., Kim, Y.H., Park, K., Lee, H.B., and Kim, M.S. (2009). Insulin-loaded microcapsules for in vivo delivery. *Mol Pharm* 6, 353-365.
- Lim, S.T., Airavaara, M., and Harvey, B.K. (2010). Viral vectors for neurotrophic factor delivery: a gene therapy approach for neurodegenerative diseases of the CNS. *Pharmacol Res* 61, 14-26.
- Miller, A.C., Bershteyn, A., Tan, W., Hammond, P.T., Cohen, R.E., and Irvine, D.J. (2009). Block copolymer micelles as nanocontainers for controlled release of proteins from biocompatible oil phases. *Biomacromolecules* 10, 732-741.
- Nanou, A., and Azzouz, M. (2009). Gene therapy for neurodegenerative diseases based on lentiviral vectors. *Prog Brain Res* 175, 187-200.
- Onaca, O., Enea, R., Hughes, D.W., and Meier, W. (2009). Stimuli-responsive polymersomes as nanocarriers for drug and gene delivery. *Macromol Biosci* 9, 129-139.
- Rapoport, M., and Lorberboum-Galski, H. (2009). TAT-based drug delivery system--new directions in protein delivery for new hopes? *Expert Opin Drug Deliv* 6, 453-463.
- Rapoport, M., Saada, A., Elpeleg, O., and Lorberboum-Galski, H. (2008). TAT-mediated delivery of LAD restores pyruvate dehydrogenase complex activity in the mitochondria of patients with LAD deficiency. *Mol Ther* 16, 691-697.
- Rector, R.S., Payne, R.M., and Ibdah, J.A. (2008). Mitochondrial trifunctional protein defects: clinical implications and therapeutic approaches. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1488-1496.
- Simons, M., and Raposo, G. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21, 575-581.
- Singh, R., and Lillard, J.W., Jr. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 86, 215-223.

Sizemore, D.R., Branstrom, A.A., and Sadoff, J.C. (1995). Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270, 299-302.

5 Stadler, B., Chandrawati, R., Price, A.D., Chong, S.F., Breheney, K., Postma, A., Connal, L.A., Zelikin, A.N., and Caruso, F. (2009). A microreactor with thousands of subcompartments: enzyme-loaded liposomes within polymer capsules. *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 4359-4362.

10 Sun, L., Zhou, S., Wang, W., Su, Q., Li, X., and Weng, J. (2009). Preparation and characterization of protein-loaded polyanhydride microspheres. *J Mater Sci Mater Med* 20, 2035-2042.

Torchilin, V.P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews* 4, 145-160.
Walde, P., and Ichikawa, S. (2001). Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol Eng* 18, 143-177.

15 Werle, M., and Takeuchi, H. (2009). Chitosan-aprotinin coated liposomes for oral peptide delivery: Development, characterisation and in vivo evaluation. *Int J Pharm* 370, 26-32.

20 Zauner, W., Farrow, N.A., and Haines, A.M. (2001). In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J Control Release* 71, 39-51.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5
1. Un polipéptido que tiene al menos un 90% de secuencia idéntica a SEQ ID NO:1 y que comprende un residuo R en la posición correspondiente a la posición 147 de SEQ ID NO:1
- 10
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido tiene al menos un 95 o al menos un 99% de secuencia idéntica a la secuencia del aminoácido SEQ ID NO:1.
- 15
3. Un polinucleótido aislado o recombinante que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 20
4. El polinucleótido de la reivindicación 3, en el que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que tienen al menos un 90% de secuencia idéntica a la longitud total de SEQ ID NO:2.
- 25
5. Un vector o célula huésped que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
- 30
6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido aislado de cualquiera de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, sea junto a uno o más excipientes, diluyentes, preservativos, solubilizantes, emulsificantes, coadyuvantes o portadores farmacéuticamente aceptables.
- 35
7. La composición de la reivindicación 6, para usar en un método para tratar la Ataxia de Friedreich.
- 40
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, o la composición farmacéutica para usar de la reivindicación 7, en la que la composición comprende:
- 45
- (i) Un portador seleccionado de un grupo consistente en un liposoma, un microportador polimérico, un exosoma, un portador bacteriano, y un equivalente funcional de ellos; o
- 50
- (ii) Un sistema portador seleccionado de un grupo consistente en un sistema vírico, un sistema híbrido vírico-sintético, un sistema no vírico, y un equivalente funcional de los mismos;
- 55
- En el que el portador o sistema portador es la liberación del polipéptido aislado en la célula.
- 60
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8(i), o la composición farmacéutica para usar de la reivindicación 8(i), en la que el polipéptido aislado se ha fundido en un marco con un dominio de transducción de proteína.
- 65
10. El polinucleótido de la reivindicación 3 o 4, para usar en un método de terapia genética para tratar la Ataxia de Friedreich.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, para el uso de esa reivindicación, o el polinucleótido de la reivindicación 10, para el uso de esa reivindicación, en la que se impide la degradación de la frataxina por medio del proteosoma o ubiquitona, en las células de un sujeto.
12. Un método *ex vivo* de liberar el polipéptido aislado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en una célula por medio de un portador (i) seleccionado de un grupo consistente en un liposoma, un microportador polimérico, un exosoma, un portador bacteriano y un equivalente funcional de los mismos o (ii) un sistema portador seleccionado de un grupo consistente en un sistema vírico, un sistema híbrido sintético-vírico, un sistema no vírico y un equivalente funcional de los mismos.
13. Un método *ex vivo* de evitar la degradación de la frataxina por medio de un proteosoma o ubiquitona, en una célula que comprende la expresión del polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la célula o introduciendo el polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la célula.

ES 2 552 456 T3

10 20 30 40 50 60
MWTLGRRAVA GLLASPSPAQ AQTLTRVPRP AELAPLCGRR GLRTDIDATC TPRRASSNQR
70 80 90 100 110 120
GLNQIWNVKK QSVYLMNLRK SGTLGHPGSL DETTYERLAE ETLDSLAEFF EDLADKPYTF
130 140 150 160 170 180
EDYDVSGSG VLTVKLGGDL GTYVINKQTP NKQIWLSSPS SGPKRYDWTG KNWVYSHDGV
190 200 210
SLHELLAAEL TKALKTKLDL SSLAYSGKDA

SEQ ID NO: 1

Figura 1

atg tgg act ctc ggg cgc cgc gca gta gcc ggc ctc ctg gcg tca
ccc agc ccg gcc cag gcc cag acc ctc acc cgg gtc ccg cgg ccg
gca gag ttg gcc cca ctc tgc ggc cgc cgt ggc ctg cgc acc gac
atc gat gcg acc tgc acg ccc cgc cgc gca agt tcg aac caa cgt
ggc ctc aac cag att tgg aat gtc aaa aag cag agt gtc tat ttg
atg aat ttg agg aaa tct gga act ttg ggc cac cca ggc tct cta
gat gag acc acc tat gaa aga cta gca gag gaa acg ctg gac tct
tta gca gag ttt ttt gaa gac ctt gca gac aag cca tac acg ttt
gag gac tat gat gtc tcc ttt ggg agt ggt gtc tta act gtc aaa
ctg ggt gga gat cta gga acc tat gtg atc aac aag cag acg cca
aac aag caa atc tgg cta tct tct cca tcc agt gga cct aag cgt
tat gac tgg act ggg aaa aac tgg gtg tac tcc cac gac ggc gtg
tcc ctc cat gag ctg ctg gcc gca gag ctc act aaa gcc tta aaa
acc aaa ctg gac ttg tct tcg ttg gcc tat tcc gga aaa gat gct

SEQ ID NO: 2

Figura 2

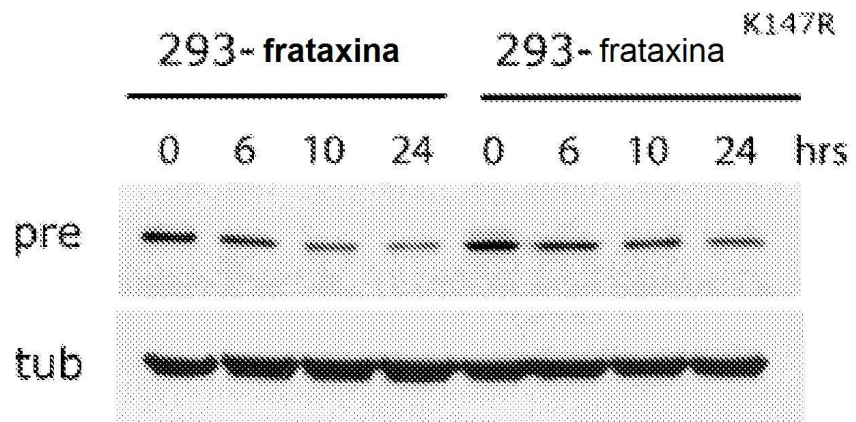


Figura 3A

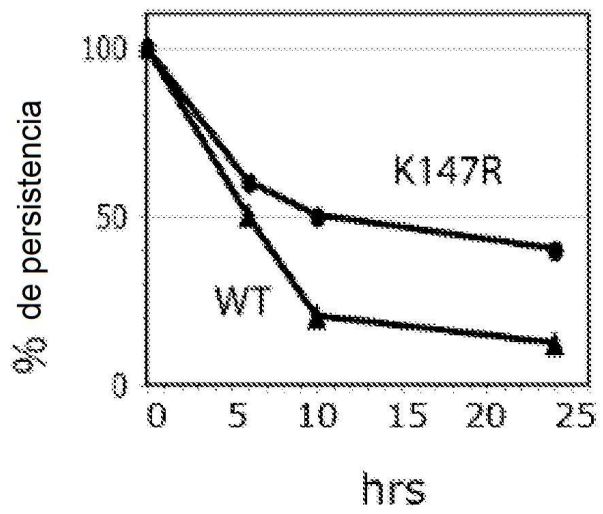


Figura 3B

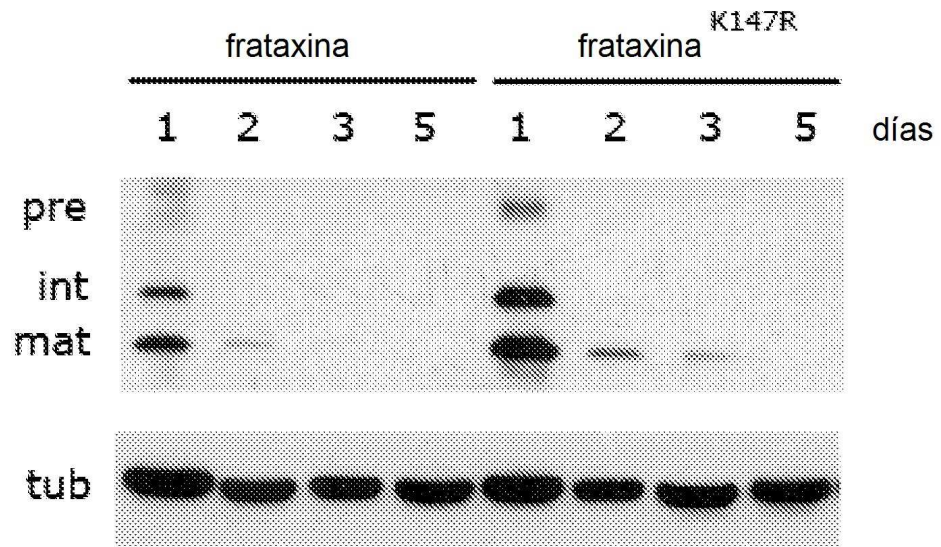


Figura 4