

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 643**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2014 PCT/US2014/067415**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15081101**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2014 E 14812375 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3074510**

54 Título: **Vectores virales adeno-asociados para el tratamiento de enfermedad de almacenamiento de glucógeno**

30 Prioridad:

26.11.2013 US 201361908861 P

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

21.11.2018

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (50.0%)**

**National Institutes of Health Office of Technology
Transfer 6011 Executive Boulevard Suite 325
MSC 7660
Bethesda, MD 20852-7660, US y
UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH
FOUNDATION, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHOU, JANICE, J. y
BYRNE, BARRY, J.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 690 643 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

Vectores virales adeno-asociados para el tratamiento de enfermedad de almacenamiento de glucógeno

5 CAMPO

La presente descripción se refiere a vectores de terapia génica para el tratamiento de la enfermedad de almacenamiento de glucógeno, en particular enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo Ia.

10 ANTECEDENTES

La enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo Ia (GSD-Ia o enfermedad de Von Gierke, MIM232200) es causada por una deficiencia de la glucosa-6-fosfatasa- α (G6Pasa- α), una enzima que se expresa principalmente en el hígado, riñón e intestino (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). La G6Pasa- α , codificada por el gen
 15 *G6PC*, es una proteína hidrófoba anclada en el retículo endoplasmático (RE) por nueve hélices transmembrana (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). Esta enzima cataliza la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato (G6P) en la glucosa y el fosfato en la etapa terminal de la glucogenólisis y gluconeogénesis. Los pacientes afectados por GSD-Ia no pueden mantener la homeostasis de la glucosa y pueden presentar hipoglucemia en ayunas, retraso del crecimiento, hepatomegalia, nefromegalia, hiperlipidemia, hiperuricemia y acidemia láctica (Chou et al., Nat Rev
 20 Endocrinol 6:676-688, 2010).

Actualmente no existe cura para la GSD-Ia. La hipoglucemia se puede controlar con el uso de terapias dietéticas (Greene et al., N Engl J Med 294:423-425, 1976; Chen et al., N Engl J Med 310:171-175, 1984) que permiten a los pacientes alcanzar un crecimiento casi normal y desarrollo puberal. Sin embargo, las complicaciones clínicas a largo
 25 plazo, y sus procesos patológicos subyacentes, permanecen sin corregir. Uno de los riesgos crónicos más significativos es el adenoma hepatocelular (HCA), que se desarrolla en el 70-80% de los pacientes de más de 25 años de edad con GSD-I (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010; Labrune et al., J Pediatr Gastroenterol Nutr 24:276-279, 1997; Rake et al., Eur JPediatr 161(Suppl 1):S20-S34, 2002). Los HCA en pacientes con GSD-Ia son pequeños, múltiples y no encapsulados, incluyendo las complicaciones compresión local y hemorragia
 30 intratumoral. En el 10% de pacientes con GSD-Ia, los HCA se someten a transformación maligna en carcinoma hepatocelular (HCC) (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010; Rake et al., Eur J Pediatr 161(Suppl 1):S20-S34, 2002; Franco et al., J Inherit Metab Dis 28:153-162, 2005).

Se han realizado estudios de terapia génica que utilizan virus adeno-asociados (AAV) recombinantes que llevan
 35 G6Pasa- α en modelos de animales de GSD-Ia, estos estudios han demostrado eficacia en la ausencia de toxicidad (revisado en Chou y Mansfield, Expert Opin Biol Ther 11:1011-1024, 2011). Estudios anteriores usando el modelo murino de GSD-Ia han demostrado que el AAV recombinante que expresa G6Pasa- α dirigida por el promotor de CBA/potenciador de CMV (Ghosh et al., Gene Ther 13:321-329, 2006), el promotor de *G6PC* canina (Koeberl et al., Gene Ther 13:1281-1289, 2006), o el promotor de *G6PC* humana en los nucleótidos -298 a +128 de la región
 40 flanqueante de *G6PC* 5' (Koeberl et al., Mol Ther 16:665-672, 2008) administran el transgén de G6Pasa- α al hígado y logran una corrección prolongada de este trastorno. Sin embargo, y a pesar de que estos estudios han mostrado resultados prometedores, ninguno de estos estudios ha sido capaz de corregir completamente la deficiencia hepática de G6Pasa- α .

45 <Wai Han Yiu et al., Molecular Therapy, v. 18, n.º 6, pág. 1076-84, 2010, y Lee Young Mok et al., Molecular Genetics And Metabolism, v110, n.º 3, pág. 275-80, describen un promotor de AAV-8 que comprende la secuencia codificante de *G6PC* bajo el control del promotor/potenciador de *G6PC*.>

RESUMEN

50

La invención se define en las reivindicaciones.

En el presente documento se proporcionan moléculas recombinantes de ácido nucleico, vectores virales adeno-asociados (AAV) y AAV recombinante que pueden utilizarse en aplicaciones de terapia génica para el tratamiento de
 55 la enfermedad de almacenamiento de glucógeno, en especial GSD-Ia.

En algunas realizaciones, las moléculas recombinantes de ácido nucleico incluyen un promotor/potenciador de *G6PC*, un intrón sintético, y la región codificante de *G6PC*, siendo esta última opcionalmente optimizada por codones para la expresión en células humanas. Las moléculas recombinantes de ácido nucleico incluyen además

una secuencia de ácido nucleico de relleno situada entre el promotor/potenciador de G6PC y el intrón, así como entre el intrón y la secuencia codificante de G6PC. En la invención, las moléculas de ácido nucleico recombinantes comprenden los nucleótidos 182-4441 de SEQ ID NO: 1 o nucleótidos 182-4441 de SEQ ID NO: 3.

5 En algunas realizaciones, las moléculas recombinantes de ácido nucleico incluyen además secuencias de repetición terminal invertida (ITR) 3' y 5'. En algunos ejemplos, las moléculas recombinantes de ácido nucleico comprenden los nucleótidos 17-4819 de SEQ ID NO: 1 o nucleótidos 17-4819 de SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones, las moléculas recombinantes de ácido nucleico comprenden las secuencias completas de ácido nucleico de vector de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

10

También se proporcionan vectores que comprenden las moléculas recombinantes de ácido nucleico descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, los vectores son vectores de AAV, tales como vectores de AAV8. Se proporcionan además células huésped aisladas que comprenden las moléculas recombinantes de ácido nucleico o los vectores descritos en el presente documento. Por ejemplo, las células huésped aisladas pueden ser células

15

En el presente documento se proporciona también AAV recombinante (rAAV) que comprende las moléculas recombinantes de ácido nucleico descritas en el presente documento. Las composiciones que comprenden el rAAV también se proporcionan en la presente descripción.

20

Además, se proporciona un método para tratar un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, que comprende seleccionar un sujeto con enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo Ia (GSD-Ia) y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del rAAV o composiciones que comprenden el rAAV, descritas en el presente documento.

25

Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que transcurre con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30

Las **Figuras 1A-1B** son gráficas que muestran los resultados del análisis de fenotipo de ratones $G6pc^{-/-}$ con infusión de AAV-GPE. (Figura 1A) Se muestran pesos corporales de ratones $G6pc^{-/-}$ hembra con infusión de $1,2 \times 10^{11}$ vg/ratón de AAV-GPE y sus compañeros de camada $G6pc^{+/+}/G6pc^{+/+}$ hembra. La edad al momento de la infusión (2 días, 2 semanas o 4 semanas) se muestra encima arriba de la gráfica. (○), ratones $G6pc^{+/+}/G6pc^{+/+}$; (●), ratones $G6pc^{-/-}$ con infusión de AAV-GPE. (Figura 1B) Se muestran niveles de glucosa en sangre, colesterol, triglicéridos, ácido úrico y ácido láctico de ratones con infusión de AAV-GPE. Debido a las similitudes de los metabolitos respectivos de cada grupo, los datos que se muestran son datos agrupados de 6-24 semanas de edad. (+/+ y +/-), ratones $G6pc^{+/+}/G6pc^{+/+}$, (-/-), $G6pc^{-/-}$, o (-/- GPE), $G6pc^{-/-}$ con infusión de AAV-GPE a la edad de 2 días (n = 36), 2 semanas (n = 24), o 4 semanas (n = 9). Los datos se presentan como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

35

Las **Figuras 2A-2B** son gráficas que muestran la actividad de G6Pasa- α hepática y expresión de ARNm en ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE y de tipo salvaje después de un ayuno de 24 horas. Siete ratones $G6pc^{-/-}$ de 2 semanas, 11 de cuatro semanas, uno de 15 semanas (*) y uno de 30 semanas (**) se infundieron con dosis variables de AAV-GPE; la actividad de G6Pasa- α y la expresión de ARNm se evaluaron cuando los ratones tenían 70-90 semanas de edad. (Figura 2A) Se muestra la actividad de G6Pasa- α hepática a las edades indicadas en semanas (S). Los ratones se agrupan basándose en su actividad de G6Pasa- α relativa a la actividad de tipo salvaje, tal como bajo (AAV-L), medio (AAV-M) y alto (AAV-H). (Figura 2B) G6Pasa- α hepática y la expresión de ARNm y su relación con la actividad de G6Pasa- α en ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE. Los datos se presentan como media \pm SEM. En la Figura 2B, * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$.

40

Las **Figuras 3A-3C** son gráficas que muestran los resultados de análisis de fenotipo de ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE a la edad de 70 a 90 semanas. (Figura 3A) Niveles de glucosa en sangre, colesterol, triglicéridos, ácido úrico y ácido láctico. (Figura 3B) Peso corporal, longitud corporal e IMC. H, hembras; M, machos. (Figura 3C) Peso del hígado. Los tratamientos se indican como: (+/+), ratones de tipo salvaje; (-/- AAV), ratones $G6pc^{-/-}$ con infusión de diversas dosificaciones de AAV-GPE. AAV-L (n = 6), AAV-M (n = 9), y AAV-H (n = 5) son ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE que expresan el 3-9% (bajo, L), 22-63% (medio, M), y 81-128% (alto, H) de actividad de G6Pasa- α hepática normal, respectivamente. Los datos se presentan como media \pm SEM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$.

45

50

Las **Figuras 4A-4C** son gráficas que muestran perfiles de glucosa en sangre en ayunas y de tolerancia a la

55

glucosa. (Figura 4A) Perfiles de glucosa en sangre en ayunas en ratones de tipo salvaje y *G6pc*^{-/-} tratados con AAV-GPE a la edad de 70 a 90 semanas. (Figura 4B) Perfiles de glucosa en sangre en ayunas en ratones *G6pc*^{-/-} sin tratar a la edad de 6-8 semanas. (Figura 4A) Perfiles de tolerancia a la glucosa en ratones de tipo salvaje y *G6pc*^{-/-} tratados con AAV-GPE a la edad de 70 a 90 semanas. Ratones *G6pc*^{-/-} de tipo salvaje o con infusión de AAV-GPE se dejaron en ayunas durante 6 horas, se les inyectaron por vía intraperitoneal 2 mg/g de dextrosa, y después se les tomó muestras de sangre cada 30 minutos a través de la vena de la cola. Los datos se presentan como media ± SEM. (+/+), ratones de tipo salvaje; (-/-), ratones *G6pc*^{-/-} sin tratar. AAV-L (n = 6), AAV-M (n = 9), y AAV-H (n = 5) son ratones *G6pc*^{-/-} tratados con AAV-GPE con expresión al 3-9%, 22-63%, y al 81-129% de actividad de G6Pasa-α hepática normal, respectivamente.

Las Figuras 5A-5C son gráficas que muestran los niveles de insulina en sangre y de ARNm hepático para SREBP-1c y glucocinasa en ratones de 70 a 90 semanas de edad de tipo salvaje y *G6pc*^{-/-} tratados con AAV-GPE después de 24 horas de ayuno. (Figura 5A) Niveles de insulina en sangre en ayunas y su relación con respecto al el peso corporal de los animales. (Figura 5B) Cuantificación de ARNm de SREBP-1c por RT-PCR en tiempo real. (Figura 5C) Cuantificación de ARNm de glucocinasa y la relación de la insulina en sangre en ayunas con respecto a los niveles hepáticos de ARNm de glucocinasa. (+/+, ○), ratones de tipo salvaje (n = 20); (-/- AAV, ●) ratones *G6pc*^{-/-} tratados con AAV-GPE (n = 20). Los datos se presentan como media ± SEM. **P < 0,005.

Las Figuras 6A-6D son gráficas que muestran los resultados de los análisis bioquímicos en ratones de 12 semanas de edad de tipo salvaje, tratados con rAAV-GPE y rAAV-miGPE *G6pc*^{-/-}. rAAV-GPE y rAAV-miGPE son vectores de rAAV que expresan G6Pasa humana dirigida por 2864 pb del promotor/potenciador de *G6PC* (GPE) humano y los 382 pb de promotor/potenciador de *G6PC* mínimo (miGPE) humano, respectivamente. (Figura 6A) Actividad hepática de G6Pasa-α microsomal y su relación con respecto al número de copias del genoma del vector. (Figura 6B) Curva de crecimiento. (Figura 6C) Valores del IMC. (Figura 6D) Niveles de glucosa en sangre. Ratones *G6pc*^{-/-} GPE-alto, tratados con rAAV-GPE en dosis alta (○); miGPE-alto, tratados con rAAV-miGPE en dosis alta (●); GPE-bajo, tratados con rAAV-GPE en dosis baja (□); miGPE-bajo, tratados con rAAV-miGPE en dosis baja (■); (+/+), ratones de tipo salvaje (▼). Los datos son media ± SEM. *P < 0,05.

Las Figuras 7A-7C son gráficas que muestran los resultados de análisis fenotípicos en ratones *G6pc*^{-/-} de 12 semanas de tipo salvaje, tratados con rAAV-GPE y rAAV-miGPE. (Figura 7A) Peso del hígado. (Figura 7B) Contenido de glucógeno hepático. (Figura 7C) Contenido de triglicéridos hepáticos. Ratones *G6pc*^{-/-} GPE-alto (n = 6), tratados con rAAV-GPE en dosis alta; miGPE-alto (n = 6), tratados con rAAV-miGPE en dosis alta; GPE-bajo (n = 6), tratados con rAAV-GPE en dosis baja; miGPE-bajo (n = 6), tratados con rAAV-miGPE en dosis baja; (+/+), ratones de tipo salvaje. Los datos son media ± SEM. *P < 0,05.

Las Figuras 8A-8C son gráficas que muestran los perfiles de glucosa en sangre en ayunas y de tolerancia a la glucosa en ratones *G6pc*^{-/-} de 12 semanas de edad de tipo salvaje, tratados con rAAV-GPE y rAAV-miGPE. (Figura 8A) Perfiles de glucosa en sangre en ayunas. (Figura 8B) Niveles de glucosa en sangre después de un ayuno de 24 horas. (Figura 8C) Perfiles de tolerancia a la glucosa. Ratones *G6pc*^{-/-} GPE-alto (n = 6), tratados con rAAV-GPE en dosis alta (○); miGPE-alto (n = 6), tratados con rAAV-miGPE en dosis alta (●); GPE-bajo (n = 6), tratados con rAAV-GPE en dosis baja (□); miGPE-bajo (n = 6), tratados con rAAV-miGPE en dosis baja (■); (+/+), ratones de tipo salvaje (n = 24) (▼). Los datos son media ± SEM. *P < 0,05, **P < 0,005.

La Figura 9 es un alineamiento de las secuencia de proteína G6Pasa-α canina (SEQ ID NO: 10) y humana (SEQ ID NO: 4).

La Figura 10 es una tabla que muestra las diferencias de aminoácidos entre G6Pasa-α humana, de ratón, de rata y canina.

La Figura 11 es una gráfica que muestra una actividad de G6Pasa hepática en ratones con GSD-Ia transducidos con rAAV. Ratones con GSD-Ia se transdujeron con un vector de rAAV8 (10¹³ vg/kg), expresando la G6Pasa nativa o humana optimizada por codones dirigida por el promotor/potenciador de GPE. La actividad de G6Pasa hepática en ratones de 12 semanas de edad fue de 165,4 ± 18,2 nmol/min/mg.

La Figura 12 es un gráfica que muestra el peso del hígado en ratones con GSD-Ia de 12 semanas de edad de tipo salvaje (+/+) y tratados con rAAV.

Las Figuras 13A y 13B son gráficas que muestran los perfiles de tolerancia a la glucosa y de glucosa en sangre en ayunas, respectivamente, en ratones de 12 semanas de edad de tipos salvaje (○) y con GSD-Ia tratados con rAAV8-GPE-co-G6Pasa (●).

LISTA DE SECUENCIAS

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos enumeradas en la lista de secuencias adjunta se muestran

usando abreviaturas de letras estándar para bases de nucleótidos, y un código de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solamente se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada. La lista de secuencias se envía como un archivo de texto ASCII, creado el miércoles, 12 de noviembre de 2014, 39,6 KB. En la 5 Lista de secuencias adjunta:

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos del plásmido UF11-GPE-G6PC, incluyendo las siguientes características:

10 ITR - nucleótidos 17-163
 promotor/potenciador de G6PC - nucleótidos 182-3045
 Relleno - nucleótidos 3051-3184
 Intrón - nucleótidos 3185-3321
 Relleno - nucleótidos 3322-3367
 15 Secuencia codificante de G6PC - nucleótidos 3368-4441
 ITR - nucleótidos 4674-4819

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de nucleótidos del plásmido UF11-K29-G6PC, incluyendo las siguientes características:

20 ITR - nucleótidos 17-163
 promotor/potenciador de G6PC - nucleótidos 182-3045
 Intrón - nucleótidos 3052-3188
 Secuencia codificante de G6PC - nucleótidos 3202-4275
 25 ITR - nucleótidos 4508-4653

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos del plásmido UF11-GPE-co-G6PC, incluyendo las siguientes características:

30 ITR - nucleótidos 17-163
 promotor/potenciador de G6PC - nucleótidos 182-3045
 Relleno - nucleótidos 3051-3184
 Intrón - nucleótidos 3185-3321
 Relleno - nucleótidos 3322-3367
 35 Secuencia codificante de G6PC - nucleótidos 3368-4441
 ITR - nucleótidos 4674-4819

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la proteína G6PC humana.

SEQ ID NOs: 5-8 son secuencias de cebador.

40 **SEQ ID NO: 9** es la secuencia de nucleótidos de G6PC canina.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de G6PC canina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 I. Abreviaturas

AAV	virus adenoasociado
IMC	índice de masa corporal
CBA	β -actina de pollo
50 CMV	citomegalovirus
ELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
G6P	glucosa-6-fosfato
G6PC	glucosa-6-fosfatasa, subunidad catalítica
G6PT	transportador de glucosa-6-fosfato
55 GPE	promotor/potenciador de G6PC
GSD	enfermedad de almacenamiento de glucógeno
H&E	hematoxilina y eosina
HCA	adenoma hepatocelular
HCC	carcinoma hepatocelular

ITR	repetición terminal invertida
ORF	marco de lectura abierto
rAAV	AAV recombinante
vg	genomas virales
5 vp	partículas virales

II. Términos y métodos

A menos que se indique otra cosa, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la descripción, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Virus adeno-asociado (AAV): Un virus pequeño sin envoltura de replicación defectuosa que infecta a seres humanos y otras especies de primates. No se sabe que el AAV cause enfermedad y provoque una respuesta inmune muy leve. Los vectores de terapia génica que utilizan AAV pueden infectar tanto células divisorias como quiescentes y pueden persistir en un estado extracromosómico sin integrar en el genoma de la célula huésped. Estas características hacen del AAV un vector viral atractivo para la terapia génica. En este momento hay 11 serotipos reconocidos de AAV (AAV1-11).

Administración/Administrador: Proporcionar o dar a un sujeto un agente, tal como un agente terapéutico (por ejemplo un AAV recombinante), por cualquier vía eficaz. Vías de administración de ejemplo incluyen, pero sin limitación, inyección (tal como subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal e intravenosa), ruta oral, intraductal, sublingual, rectal, transdérmica, intranasal, vaginal e inhalación.

Optimizado por codones: Un ácido nucleico "optimizado por codones" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ha sido alterada de tal manera que los codones son óptimos para la expresión en un sistema en particular (tal como una especie o grupo de especies en particular. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico puede ser optimizada para la expresión en células de mamífero o en una especie de mamífero en particular (tales como células humanas). La optimización por codones no altera la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

Potenciador: Una secuencia de ácido nucleico que aumenta la velocidad de transcripción mediante el aumento de la actividad de un promotor.

G6PC: Un gen localizado en el cromosoma humano 17q21 que codifica la glucosa-6-fosfatasa- α (G6Pasa- α). La G6Pasa- α es una proteína hidrófoba de 357 aminoácidos que tiene 9 hélices que la anclan al retículo endoplasmático (Chou et al., *Nat Rev Endocrinol* 6:676-688, 2010). La proteína G6Pasa- α cataliza la hidrólisis de la glucosa 6-fosfato en glucosa y fosfato en la etapa terminal de la gluconeogénesis y la glucogenólisis, y es una enzima clave en la homeostasis de la glucosa. Las mutaciones en el gen G6PC causan la enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo Ia (GSD-Ia), que es un trastorno metabólico caracterizado por hipoglucemia severa en ayunas asociada con la acumulación de glucógeno y grasa en el hígado y los riñones.

Enfermedad de almacenamiento de glucógeno (GSD): Un grupo de enfermedades que son resultado de defectos en el procesamiento de la síntesis de glucógeno o ruptura dentro de los músculos, hígado y otros tejidos. La GSD puede ser genética o adquirida. La GSD genética es causada por cualquier error innato del metabolismo involucrado en estos procesos. En la actualidad hay 11 enfermedades de almacenamiento de glucógeno reconocidas (GSD de tipo I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, XI, XII y XIII). La GSD-I consiste en dos trastornos autosómicos recesivos, GSD-Ia y GSD-Ib (Chou et al., *Nat Rev Endocrinol* 6:676-688, 2010). La GSD-Ia es resultado de una deficiencia en la glucosa-6-fosfatasa- α . Las deficiencias en el transportador de glucosa-6-fosfato (G6PT) son responsables de la GSD-Ib.

Enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo Ia (GSD-Ia): También conocida como enfermedad de Von Gierke, GSD-Ia es la enfermedad de almacenamiento de glucógeno más común, que posee una incidencia de aproximadamente 1 por cada 100.000 nacimientos vivos. La GSD-Ia es una enfermedad genética resultante de la deficiencia de la enzima glucosa-6-fosfatasa- α (G6Pasa- α). La deficiencia en la G6Pasa- α deteriora la capacidad del hígado para producir glucosa libre a partir del glucógeno y de la gluconeogénesis. Los pacientes afectados por GSD-Ia no pueden mantener la homeostasis de la glucosa y pueden presentar hipoglucemia en ayunas, retraso del crecimiento,

hepatomegalia, nefromegalia, hiperlipidemia, hiperuricemia y acidemia láctica (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). Actualmente no existe cura para la GSD-Ia.

Intrón: Un fragmento de ADN dentro de un gen que no contiene información codificante para una proteína. Los intrones se eliminan antes de la traducción de un ARN mensajero.

5 **Repetición terminal invertida (ITR):** Secuencias simétricas de ácido nucleico en el genoma de los virus adeno-asociados necesarias para replicación eficiente. Las secuencias ITR se encuentran en cada extremo del genoma de ADN de AAV. Las ITR sirven como los orígenes de replicación para síntesis de ADN viral y son componentes *cis* esenciales para la generación de vectores de integración de AAV.

10 **Aislado:** Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico, proteína, virus o célula) se ha separado o purificado sustancialmente aparte de otros componentes biológicos en la célula o tejido del organismo, o el propio organismo, en el que se produce naturalmente el componente, tales como otro ADN cromosómico y extracromosómico y ARN, proteínas y células. Moléculas de ácido nucleico y proteínas que se han "aislado" incluyen las purificadas por métodos de purificación estándar. El término también incluye moléculas de ácidos nucleicos y proteínas preparadas por expresión recombinante en una

15 célula huésped, así como moléculas de ácido nucleico y proteínas sintetizadas químicamente.
Unido operativamente: Una primera secuencia de ácido nucleico está operativamente unida a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la

20 secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones de codificación de proteínas, están en el mismo marco de lectura.
Vehículo farmacéuticamente aceptable: Los portadores farmacéuticamente aceptables (vehículos) útiles en la presente descripción son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin,

25 Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de uno o más compuestos terapéuticos, moléculas o agentes. En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas

30 equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitán.

35 **Prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad:** "Prevenir" una enfermedad (tal como GSD Ia) se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de que ha comenzado a desarrollarse. "Mejora" se refiere a la reducción en el número o la gravedad de los signos o

40 síntomas de una enfermedad.
Promotor: Una región de ADN que dirige/inicia la transcripción de un ácido nucleico (por ejemplo, un gen). Un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción. Típicamente, los promotores se encuentran cerca de los genes que transcriben. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales que pueden localizarse tanto como

45 varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción.
Purificado: El término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, pretende ser un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, un péptido, proteína, virus u otro compuesto activo purificado es uno que está aislado en su totalidad o en parte de proteínas asociadas de forma natural y otros contaminantes. En ciertas realizaciones, el término "sustancialmente purificado" se refiere a un péptido, proteína, virus u otro

50 compuesto activo que se ha aislado de una célula, medio de cultivo celular u otra preparación en bruto y sometido a fraccionamiento para eliminar diversos componentes de la preparación inicial, tales como proteínas, restos celulares y otros componentes.
Recombinante: Una molécula de ácido nucleico recombinante es una que tiene una secuencia que no se produce de forma natural o tiene una secuencia que se hace mediante una combinación artificial de dos

55 segmentos de secuencia separados de otro modo. Esta combinación artificial puede realizarse por síntesis química o por la manipulación artificial de segmentos aislados de moléculas de ácidos nucleicos, tales como mediante técnicas de ingeniería genética.

De forma similar, un virus recombinante es un virus que comprende la secuencia (tal como la secuencia genómica) que no es de origen natural o que se fabrica por la combinación artificial de al menos dos

secuencias de diferente origen. El término "recombinante" también incluye ácidos nucleicos, proteínas y virus que han sido alterados únicamente por adición, sustitución o delección de una parte de una molécula de ácido nucleico, proteína o virus natural. Como se usa en el presente documento, "**AAV recombinante**" se refiere a una partícula de AAV en la que se ha empaquetado una molécula recombinante de ácido nucleico (por ejemplo, un molécula recombinante de ácido nucleico que codifica G6Pasa- α).

Identidad de secuencia: La identidad o similitud entre dos o más secuencias de ácido nucleico, o dos o más secuencias de aminoácidos, se expresa en términos de la identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencia se puede medir en términos de porcentaje de identidad; cuanto mayor sea el porcentaje, mayor es la identidad de las secuencias. La similitud de secuencia se puede medir en términos de porcentaje de similitud (que toma en cuenta las sustituciones conservadoras de aminoácidos); cuanto mayor sea el porcentaje, mayor es la identidad de las secuencias. Los homólogos u ortólogos de secuencias de ácido nucleico o aminoácidos poseen un grado relativamente alto de identidad/similitud de secuencia, cuando se alinean usando métodos estándar. Esta homología es más significativa cuando las proteínas ortólogas o ADNc se derivan de especies que están más estrechamente relacionadas (tales como secuencias humanas y de ratón), en comparación con las especies más alejadas (tales como secuencias humanas y de *C. elegans*).

Los métodos de alineación de secuencias para comparación se conocen bien en la técnica. Se describen diversos programas y algoritmos de alineamiento en: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989; Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; y Pearson et al., Meth. Mol. Bio. 24: 307-31, 1994. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990, presenta una consideración detallada de los métodos de alineamiento de secuencias y los cálculos de homología.

La herramienta de búsqueda de alineamiento local básica del NCBI (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990) está disponible a partir de de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biological Information (NCBI) y en Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Se puede hallar información adicional en el sitio web de NCBI.

Serotipo: Un grupo de microorganismos estrechamente relacionados (tales como virus) que se distinguen por un conjunto característico de antígenos.

Secuencia de relleno: Se refiere a una secuencia de nucleótidos contenida dentro de una molécula de ácido nucleico más grande (tal como un vector), la cual se utiliza normalmente para crear espaciado deseado entre dos características de ácido nucleico (tales como entre un promotor y una secuencia codificante), o para extender una molécula de ácido nucleico, de manera que sea de una longitud deseada. Las secuencias de relleno no contienen información codificante de proteína y pueden ser de origen desconocido/sintético y/o no estar relacionadas con otras secuencias de ácido nucleico dentro de una molécula de ácido nucleico más grande.

Sujeto: Organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye mamíferos humanos y no humanos.

Sintético: Producido por medios artificiales en un laboratorio, por ejemplo, un ácido nucleico sintético puede sintetizarse químicamente en un laboratorio.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Una cantidad de un agente farmacéutico o terapéutico específico (por ejemplo un AAV recombinante) suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto, o en una célula, que está siendo tratado con el agente. La cantidad eficaz del agente dependerá de varios factores, incluyendo, pero sin limitación, el sujeto o células a tratar, y la forma de administración de la composición terapéutica.

Vector: Un vector es una molécula de ácido nucleico que permite la inserción de ácido nucleico extraño sin interrumpir la capacidad del vector de replicarse y/o integrarse en una célula huésped. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula huésped, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos. Un vector de expresión es un vector que contiene las secuencias reguladoras necesarias para permitir la transcripción y traducción del gen o genes insertados. En algunas realizaciones del presente documento, el vector es un vector de AAV.

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiendo comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción.

Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. "Que comprende A o B" se refiere a que incluye A, o B, o A y B. Además, debe entenderse que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o ensayo

de la presente descripción, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de los términos. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

5 III. Visión general de diferentes realizaciones

En el presente documento se proporcionan moléculas recombinantes de ácido nucleico, vectores de AAV y AAV recombinante que pueden utilizarse en aplicaciones de terapia génica para el tratamiento de la enfermedad de almacenamiento de glucógeno, en especial GSD-Ia.

10

Las moléculas recombinantes de ácido nucleico incluyen un promotor/potenciador de G6PC (GPE), un intrón sintético y la región codificante de G6PC. La región codificante de G6PC está opcionalmente optimizada por codones para la expresión en células humanas. Las moléculas recombinantes de ácido nucleico incluyen además una secuencia de ácido nucleico de relleno situada entre el promotor/potenciador de G6PC y el intrón, así como
15 entre el intrón y la secuencia codificante de G6PC. Las moléculas recombinantes de ácido nucleico pueden además incluir secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de 3' y 5' cuando se encuentran dentro de un vector de AAV.

En el presente documento se describe que una G6Pasa- α que expresa AAV recombinante con el
20 promotor/potenciador de G6PC (AAV-GPE) es significativamente más eficaz en el direccionamiento de la expresión de transgén hepática *in vivo* que otro AAV recombinante que expresa G6Pasa- α que tiene un promotor/potenciador alternativo (es decir, el promotor de β -actina de pollo/potenciador de CMV). Durante un período de estudio de 24 semanas, ratones con deficiencia en G6PC (un modelo para GSD-Ia) tratados con AAV-GPE presentaron normalización completa de deficiencia de G6PC hepática, tal como se demuestra por los niveles normales de
25 glucosa en sangre, metabolitos en sangre, glucógeno hepático y grasa hepática (véase el Ejemplo 1 y Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010). Además, un estudio a largo plazo de ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE demostró que la terapia génica mediada por AAV-GPE fue eficaz durante al menos 70-90 semanas en ratones que expresan más del 3% de G6Pasa- α hepática. En especial, los ratones tratados con AAV-GPE presentaron almacenamiento hepático normal de grasa, metabolitos en sangre normales y perfiles de tolerancia a la glucosa, niveles reducidos de
30 insulina en sangre en ayunas, y ninguna evidencia de anomalías hepáticas, tales como adenoma hepatocelular (véase el Ejemplo 2 y Lee et al., Hepatology 56:1719-1729, 2012).

Se describe adicionalmente en el presente documento el hallazgo de que los elementos potenciadores aguas arriba del promotor G6PC son críticos para la expresión óptima de G6PC en un modelo animal de GSD-Ia.
35 Específicamente, se demostró que el tratamiento con AAV-GPE, que comprende el promotor/potenciador de G6PC en los nucleótidos -2684 a -1 (con respecto al sitio de inicio de G6PC) produce niveles significativamente más altos de expresión hepática de G6Pasa- α , logró una mayor reducción en acumulación hepática de glucógeno y dio lugar a una mejor tolerancia de ayuno en un modelo murino con GSD-Ia, en comparación con un AAV recombinante de expresión de G6Pasa- α que contiene sólo un promotor/potenciador de G6PC mínimo de 383 pb (véase el Ejemplo 3
40 y Lee et al., Mol Genet Metab. 110(3): 275-280, 2013).

También se describe en el presente documento el hallazgo de que las secuencias de relleno de nucleótidos presentes entre el promotor/potenciador de G6PC y el intrón, así como entre el intrón y la secuencia codificante de G6PC, son importantes para la transducción del hígado y expresión de G6Pasa- α . En particular, el AAV
45 recombinante producido a partir del plásmido UF11-K29-G6PC (SEQ ID NO: 2) que carece las secuencias de relleno, presentaron la actividad de G6Pasa de 7,3 nmol/min/mg. En comparación, el AAV recombinante producido a partir del plásmido UF11-GPE-G6PC (SEQ ID NO: 1) presentó actividad de G6Pasa de 33,0 nmol/min/mg (véase el Ejemplo 4). La presente descripción proporciona la primera descripción de las secuencias de relleno presentes en los vectores de AAV, expuestos en el presente documento como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3.

50

Además, los datos descritos en el presente documento demuestran que la optimización por codones de la secuencia codificante de G6PC aumenta la eficiencia de traducción aproximadamente de 1,5 a 2,5 veces, dando como resultado una expresión de G6Pasa- α significativamente mayor en el hígado tras la administración de AAV-co-GPE (que contiene una secuencia de ácido nucleico de G6PC optimizada por codones), en comparación con la
55 administración de AAV-GPE, que codifica G6PC de tipo salvaje (véase el Ejemplo 5).

Tomados en conjunto, estos resultados indican que el AAV recombinante que comprende el promotor/potenciador de G6PC en los nucleótidos -2684 a -1, un intrón sintético, secuencias de relleno que flanquean el intrón, y la región codificante de G6PC (de tipo salvaje u optimizada por codones) son características críticas para la expresión del

transgén hepático eficiente y el tratamiento de GSD-Ia *in vivo*.

Se proporcionan en el presente documento moléculas de ácido nucleico recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntica a los nucleótidos 182-4441 de SEQ ID NO: 1 o nucleótidos 182-4441 de SEQ ID NO: 3. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede contener sustituciones de nucleótidos dentro de la región codificante de G6PC, tal como para optimización por codones. Como otro ejemplo, la región codificante de G6PC puede ser una G6PC de una especie diferente, tal como una G6PC canina o una versión optimizada por codones (para expresión en seres humanos) de G6PC canina. En algunos ejemplos, la región codificante de G6PC expuesta como los nucleótidos 182-3045 SEQ ID NO: 1 o nucleótidos 182-3045 de SEQ ID NO: 3 se reemplaza por la secuencia codificante de G6PC canina (SEQ ID NO: 9). Como alternativa, la región codificante de G6PC humana de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 puede contener sustituciones de nucleótidos que dan como resultado cambios codificantes en residuos que difieren entre las secuencias de proteínas G6PC humanas y caninas. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos pueden introducirse para dar como resultado cambios codificantes en los residuos 3, 54, 139, 196, 199, 242, 247, 292, 298, 301, 318, 324, 332, 347, 349, 350 y/o 353 de la proteína G6PC humana (SEQ ID NO: 4). La Figura 9 muestra un alineamiento de las secuencias de proteínas G6Pasa- α humana y canina y la Figura 10 proporciona una tabla que muestra las diferencias de aminoácidos entre la G6Pasa- α humana, de ratón, de rata y canina. La presente descripción contempla sustituciones de nucleótidos que alteran la secuencia de aminoácidos en cualquiera de los residuos enumerados en la Figura 10.

En otros casos, las sustituciones de nucleótidos pueden estar presentes en la secuencia de relleno o en la secuencia del intrón sintético. Las sustituciones de nucleótidos también son propensas a tolerarse dentro de la secuencia del vector, tal como la secuencia del vector aguas abajo (es decir, 3' a) la ITR de 3', o entre la ITR y GPE 5', o entre la región codificante de G6PC y la ITR de 3'. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico recombinantes comprenden los nucleótidos 182-4441 de SEQ ID NO: 1 o nucleótidos 182-4441 de SEQ ID NO: 3. Estas moléculas recombinantes de ácido nucleico incluyen la secuencia del promotor/potenciador de G6PC en nucleótidos -2684 a -1, un intrón sintético, secuencias de relleno que flanquean el intrón, y la región codificante de G6PC. SEQ ID NO: 1 incluye una secuencia codificante de G6PC de tipo salvaje, mientras que la SEQ ID NO: 3 incluye una secuencia codificante de G6PC optimizada por codones.

En algunas realizaciones, las moléculas recombinantes de ácido nucleico incluyen además secuencias de ITR 5' y 3'. Por lo tanto, se proporcionan moléculas de ácido nucleico recombinantes que comprenden una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntica a los nucleótidos 17-4819 de SEQ ID NO: 1 o nucleótidos 17-4819 de SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico recombinantes comprenden los nucleótidos 17-4819 de SEQ ID NO: 1 o nucleótidos 17-4819 de SEQ ID NO: 3. En ejemplos no limitantes particulares, las moléculas de ácido nucleico recombinantes comprenden la secuencia completa de SEQ ID NO: 1 (el plásmido UF11-GPE-G6PC usado para generar AAV-GPE) o la SEQ ID NO: 3 (el plásmido UF11-GPE-co-G6PC usado para generar AAV-co-GPE optimizado por codones). En otros ejemplos, las moléculas de ácido nucleico recombinantes comprenden una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

En otras realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntica a los nucleótidos 182-4275 de SEQ ID NO: 2. En algunos ejemplos, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende los nucleótidos 182-4275 de SEQ ID NO: 2. En algunos ejemplos, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntica a los nucleótidos 17-4653 de SEQ ID NO: 2. En algunos ejemplos, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende los nucleótidos 17-4653 de SEQ ID NO: 2. En ejemplos no limitantes específicos, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende la secuencia completa de SEQ ID NO: 2 (el plásmido UF11-K29-G6PC que carece de la secuencia de relleno). En otros ejemplos, la molécula de ácido nucleico recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idéntica a la SEQ ID NO: 2.

Además se proporcionan vectores que comprenden las moléculas recombinantes de ácido nucleico descritas en el

- presente documento. En algunas realizaciones, el vector es un vector de AAV. El serotipo de AAV puede ser cualquier serotipo adecuado para la administración de transgenes a un sujeto. En algunos ejemplos, el vector de AAV es un AAV de serotipo 8 (AAV8). En otros ejemplos, el vector de AAV es un vector de serotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 o 12 (es decir, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, AAV10, AAV11 o AAV12). En aún otros ejemplos, el vector de AAV es un híbrido de dos o más serotipos de AAV (tales como, pero sin limitación, AAV2/1, AAV2/7, AAV2/8 o AAV2/9). La selección del serotipo de AAV dependerá en parte del tipo o tipos celulares que están dirigidos a terapia génica. Para el tratamiento de GSD-Ia, el hígado y riñón son los órganos diana relevantes.
- 10 También se proporcionan en el presente documento células huésped aisladas que comprenden las moléculas recombinantes de ácido nucleico o los vectores descritos en el presente documento. Por ejemplo, la célula huésped aislada puede ser una célula (o línea de célula) apropiada para la producción de AAV recombinante (rAAV). En algunos ejemplos, la célula huésped es una célula de mamífero, tal como una célula HEK-293, BHK, Vero, RD, HT-1080, A549, Cos-7, ARPE-19, o MRC-5.
- 15 También se proporcionan rAAV que comprenden una molécula recombinante de ácido nucleico descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, el rAAV es rAAV8 y/o rAAV2. Sin embargo, el serotipo de AAV puede ser cualquier otro serotipo de AAV adecuado, tal como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, AAV10, AAV11 o AAV12, o un híbrido de dos o más serotipos de AAV (tales como, pero sin limitación, AAV2/1, AAV2/7, AAV2/8 o AAV2/9). Las composiciones que comprenden un rAAV descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable también se proporcionan por la presente descripción. En algunas realizaciones, las composiciones se formulan mediante administración intravenosa o intramuscular. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración de rAAV se pueden encontrar, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente N.º 2012/0219528.
- 20 Además, se proporcionan métodos para tratar un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, que comprende seleccionar un sujeto con GSD-Ia y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un rAAV (o una composición que comprende un rAAV) descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el rAAV se administra por vía intravenosa.
- 25 En algunas realizaciones, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{11} a aproximadamente 1×10^{14} partículas virales (vp)/kg. En algunos ejemplos, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{12} a aproximadamente 8×10^{13} vp/kg. En otros ejemplos, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{13} a aproximadamente 6×10^{13} vp/kg. En ejemplos no limitantes específicos, el rAAV se administra a una dosis de al menos aproximadamente 1×10^{11} , al menos aproximadamente 5×10^{11} , al menos aproximadamente 1×10^{12} , al menos aproximadamente 5×10^{12} , al menos aproximadamente 1×10^{13} , al menos aproximadamente 5×10^{13} , o al menos aproximadamente 1×10^{14} vp/kg. En otros ejemplos no limitantes, el rAAV se administra a una dosis de no más de aproximadamente 5×10^{11} , no más de aproximadamente 1×10^{12} , no más de aproximadamente 5×10^{12} , no más de aproximadamente 1×10^{13} , no más de aproximadamente 5×10^{13} , o no más de aproximadamente 1×10^{14} vp/kg. En un ejemplo no limitante, el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{12} vp/kg. El rAAV puede administrarse en una única dosis, o en múltiples dosis (tales como, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 dosis) según sea necesario para los resultados terapéuticos deseados.

IV. AAV recombinante para aplicaciones de terapia génica

- 45 AAV pertenece a la familia *Parvoviridae* y el género *Dependovirus*. El AAV es un virus pequeño no envuelto que empaqueta un genoma lineal de ADN monocatenario. Ambas cadenas sentido y antisentido de ADN de AAV se empaquetan en cápsides de AAV de igual frecuencia.
- 50 El genoma de AAV está caracterizado por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean dos marcos de lectura abiertos (ORF). En el genoma de AAV2, por ejemplo, los primeros 125 nucleótidos de la ITR son un palíndromo, que se pliega sobre sí mismo para maximizar el apareamiento de bases y forma una estructura de horquilla en forma de T. Las otras 20 bases de la ITR, denominada la secuencia D, siguen estando no apareadas. Las ITR son secuencias que actúan en *cis* importantes para la replicación del ADN de AAV; la ITR es el origen de replicación y sirve como cebador para la síntesis de segunda cadena mediante ADN polimerasa. El ADN monocatenario formado durante esta síntesis, que se denomina monómero con forma replicante, se usa para un segundo ciclo de replicación autocebadora y forma un dímero con forma replicante. Estos intermedios monocatenarios se procesan a través de un mecanismo de desplazamiento de cadena, dando como resultado un ADN monocatenario que se usa para el empaquetamiento y ADN bicatenario usado para la transcripción. Los

elementos de unión Rep y un sitio de resolución terminal (TRS) se encuentran situados dentro de la ITR. Estas características se usan por la proteína reguladora viral Rep durante replicación de AAV para procesar los intermedios bicatenarios. Además de su papel en la replicación de AAV, la ITR es también esencial para el empaquetamiento del genoma de AAV, la transcripción, la regulación negativa en condiciones no permisivas y la integración específica de sitio (Daya y Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008).

El ORF izquierdo de AAV contiene el gen Rep, que codifica cuatro proteínas - Rep78, Rep 68, Rep52 y Rep40. El ORF derecho contiene el gen Cap, que produce tres proteínas de cápside viral (VP1, VP2 y VP3). La cápside de AAV contiene 60 proteínas de cápside viral dispuestas en una simetría icosaédrica. Las VP1, VP2 y VP3 están presentes en una relación molar 1:1:10 (Daya y Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008).

El AAV es actualmente uno de los virus que se utilizan con mayor frecuencia para terapia génica. Aunque el AAV infecta a los seres humanos y algunas otras especies de primates, no se sabe que cause enfermedad y que provoque una respuesta inmune muy leve. Los vectores de terapia génica que utilizan AAV pueden infectar tanto células divisorias como quiescentes y persisten en un estado extracromosómico sin integrar en el genoma de la célula huésped. Debido a las características ventajosas del AAV, la presente descripción contempla el uso del AAV para las moléculas recombinantes de ácido nucleico y métodos descritos en el presente documento.

El AAV posee varias características deseables para un vector de terapia génica, que incluyen la capacidad de unirse y entrar en células diana, entrar en el núcleo, la capacidad de expresarse en el núcleo durante un periodo prolongado de tiempo y su baja toxicidad. Sin embargo, el tamaño pequeño del genoma de AAV limita el tamaño del ADN heterólogo que se puede incorporar. Para minimizar este problema, los vectores de AAV se han construido para que no codifiquen Rep y el elemento de eficiencia de integración (IEE). Las ITR se conservan, ya que son señales *cis* requeridas para el empaquetamiento (Daya y Berns, Clin Microbiol Rev 21(4):583-593, 2008).

Se conocen bien en la técnica métodos para producir el rAAV adecuado para terapia génica (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2012/0100606; 2012/0135515; 2011/0229971; y 2013/0072548; y Ghosh et al., Gene Ther 13(4):321-329, 2006), y pueden utilizarse con las moléculas recombinantes de ácido nucleico y métodos descritos en el presente documento.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o realizaciones particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de la descripción a las características o realizaciones particulares descritas.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Normalización completa de deficiencia hepática de G6PC de la enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo Ia usando terapia génica

Este ejemplo describe una comparación de dos vectores de AAV que expresan G6Pasa- α , impulsada por dos promotores diferentes, en eficiencia de la administración génica hepática y la expresión de G6Pasa- α en ratones con deficiencia de G6PC. Los resultados demuestran que el vector de AAV con el promotor/potenciador de G6PC (AAV-GPE) fue más eficiente en dirigir la expresión del transgén hepático *in vivo* persistente que el vector de AAV con el promotor de β -actina de pollo/potenciador de CMV (AAV-CBA). Además, los ratones con deficiencia de G6PC tratados con AAV-GPE presentaron niveles normales de glucosa en sangre, metabolitos en sangre, glucógeno hepático y grasa hepática.

MATERIALES Y MÉTODOS

50 Construcción de pUF11-GPE-G6PC y preparación de vectores de AAV

El plásmido UF11-GPE-G6PC, que contiene G6Pasa- α humana bajo el control del promotor/potenciador de G6PC humano se construyó modificando pUF11-mG6Pasa- α -CBA (Ghosh et al., Gene Ther 13:321-329, 2006) donde la G6Pasa- α murina se impulsa por el promotor de CBA/potenciador de CMV (Xu et al., Hum Gene Ther 12:563-573, 2001) como se indica a continuación: El fragmento Tkp-neo de pUF11-mG6Pasa- α -CBA se eliminó por digestión *XhoI/SphI*, el vector restante se purificó en gel, se pulió con ADN polimerasa T4, después se autoligó para producir pUF11-mG6Pasa- α -CBA-[Tkp-neo]^{-/-}. La mG6Pasa- α , junto con el promotor de CBA/potenciador de CMV, en pUF11-mG6Pasa- α -CBA-[Tkp-neo]^{-/-} después se sustituyó con el ADNc de G6Pasa- α humana en los sitios 5'-SbfI y 3'-NotI, produciendo pUF11-G6PC. Después, se usó PCR para clonar los nucleótidos - 2864 a -1 de la región flanqueante 5'

de *G6PC* que contiene el promotor/potenciador de *G6PC* humano. La plantilla de PCR era un cromosoma bacteriano artificial que contenía el gen *G6PC* humano (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) y los pares de cebadores fueron: 1S (5'-CCTTTGAGAATCCACGGTGT-3'; SEQ ID NO: 5) y 2AS (5'-CCTCATTTCCTTGGCACCTC-3'; SEQ ID NO: 6), que contienen los sitios KpnI y XbaI adicionales en los extremos 5' y 3', respectivamente. El fragmento KpnI-XbaI que contiene el promotor/potenciador de *G6PC* se ligó entonces en el pUF11-G6PC linealizado con KpnI-XbaI, para producir pUF11-G6PC-GPE-1. A continuación, se usó PCR para clonar el intrón quimérico del vector pCI (Promega, Madison, WI) usando el par de cebadores 3S (5'-AGGTAAGTATCAAGGTTACA-3'; SEQ ID NO: 7) y 4AS (5'-ACCTGTGGAGAGAAAGGCAA-3'; SEQ ID NO: 8) que contienen sitios SpeI y SbfI adicionales en los extremos 5' y 3', respectivamente. Después, este intrón quimérico se ligó como un fragmento SpeI-SbfI en el fragmento grande linealizado con SpeI-SbfI de pUF11-G6PC-GPE-I, para producir pUF11-GPE-G6PC (SEQ ID NO: 1). Todas las construcciones se verificaron por secuenciación de ADN.

Se produjeron AAV-GPE y AAV-CBA usando pUF11-GPE-G6PC y pUF11-mG6Pasa- α -CBA, respectivamente, y se generaron, se purificaron y se titularon como se ha descrito previamente (Ghosh et al., *Gene Ther* 13:321-329, 2006). La cuantificación del genoma del vector se realizó mediante el uso de PCR en tiempo real con cebadores y sondas dirigidas contra la *G6PC* o el promotor de CBA.

Infusión de ratones *G6pc*^{-/-} con vectores de AAV

Una terapia de glucosa, que consiste en una inyección intraperitoneal de 25-100 μ l de glucosa al 15% cada 12 h, se administró a los ratones *G6pc*^{-/-} como se ha descrito previamente (Lei et al., *Nat Genet* 13:203-209, 1996). A los ratones que sobrevivieron el destete se les dio acceso sin restricciones a comida (Zeigler Bros., Inc., Gardners, PA).

El vector AAV se infundió en ratones *G6pc*^{-/-} de 2 días de edad a través de la vena temporal, y se infundieron en ratones *G6pc*^{-/-} de 2 o 4 semanas de edad a través del seno retro-orbital. Se usaron ratones *G6pc*^{+/+}/*G6pc*^{+/-} emparejados por edad, así como ratones *G6pc*^{-/-} de 4 a 6 semanas de edad, como control. Para los ratones con infusión de virus, la terapia de glucosa se terminó inmediatamente después de la infusión.

La prueba de tolerancia a la glucosa de ratones 12 o 14 semanas de edad *G6pc*^{-/-} con infusión de AAV-GPE consistió en un ayuno durante 6 horas antes de la toma de muestras de sangre, seguido de la inyección de 0,25 ml de dextrosa al 10% por vía subcutánea, y la repetición del muestreo de sangre a través de la vena de la cola cada 30 minutos durante 2 horas más.

Ensayos de fosfohidrolasa

Los ensayos del aislamiento de microsomas y de fosfohidrolasa se determinaron esencialmente como se ha descrito previamente (Lei et al., *Nat Genet* 13:203-209, 1996). Las mezclas de reacción (100 μ l) contenían tampón de cacodilato 50 mM, a pH 6,5, G6P 10 mM y se incubaron cantidades apropiadas de preparaciones microsomales a 37 °C durante 10 minutos. Se prepararon membranas microsomales interrumpidas mediante incubación de membranas intactas en desoxicolato al 0,2% durante 20 minutos a 0 °C. Se estimó actividad de fosfatasa no específica mediante pre-incubación de preparaciones microsomales interrumpidas a pH 5 durante 10 minutos a 37 °C, para inactivar la G6Pasa- α lábil de ácido.

Se realizó análisis histoquímico enzimático de G6Pasa- α mediante la incubación de secciones de tejido del hígado de espesor de 10 μ m durante 10 minutos a temperatura ambiente en una solución que contenía pH 6,5 de Tris-maleato 40 mM, G6P 10 mM, sacarosa 300 mM y nitrato de plomo 3,6 mM (Teutsch, *Prog Histochem Cytochem* 14:1-92, 1981). El fosfato de plomo atrapado se visualizó después de la conversión en sulfuro de plomo de color marrón (Teutsch, *Prog Histochem Cytochem* 14:1-92, 1981).

50 Análisis fenotípico

Las muestras de sangre se recogieron de la vena de la cola. Se analizaron glucosa en sangre, colesterol total y ácido úrico usando kits obtenidos de Thermo Electron (Louisville, CO). Se midieron los triglicéridos con un kit de Sigma Diagnostics (St Louis, MO) y lactato medido mediante un kit de Trinity Biotech (St. Louis, MO).

Para hematoxilina y eosina (H&E) y tinción de aceite rojo O, se conservaron secciones del hígado en formalina tamponada neutra al 10% y se seccionaron a 4-10 micrómetros de espesor. Las secciones teñidas se visualizaron utilizando el microscopio Axioskop2 plus y el software Axio Vision 4.5 (Carl Zeiss, Thornwood, NY). Para la medición histoquímica cuantitativa de acumulación de lípidos, la tinción de aceite rojo O se convirtió en unidades de densidad

de píxeles utilizando Adobe Photoshop CS3 (Adobe System Incorporated, San Jose, CA).

Para determinar el contenido de glucógeno del hígado, el tejido se homogeneizó con HCl, se hirvió durante 10 minutos y se neutralizó con acetato sódico a un pH final de 4,5 (Teutsch, Prog Histochem Cytochem 14:1-92, 1981).

- 5 Después, el tejido hidrolizado se digirió con amilo- α -1,4- α -1,6-glucosidasa y la glucosa liberada se midió usando un kit obtenido de Sigma Diagnostics. El contenido de glucógeno se indica como nmol unidades de glucosilo por mg de proteína hepática.

Ensayos de anticuerpos

10

Los anticuerpos contra G6Pasa- α humana o murina se detectaron por análisis de transferencia Western. Las proteínas microsomales de células COS-1 infectadas con G6Pasa- α Ad-humana o G6Pasa- α Ad-murina (Ghosh et al., J Biol Chem 277: 32837-32842, 2002) se resolvieron por electroforesis a través de un gel de poliacrilamida al 12%-SDS y se transfirió en trans en membranas de fluoruro de polivinilideno (Millipore, Bedford, MA). La membrana se puso en un aparato Multiscreen (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) que contenía de múltiples canales. La tira de membrana en cada canal se incubó con un suero de G6Pasa- α anti-humana de conejo (Ghosh et al., J Biol Chem 277: 32837-32842, 2002) diluido 1:3000, o muestras de suero de animales con infusión de AAV-GPE o con infusión de AAV-CBA diluidas 1:200. Se usaron muestras de suero de compañeros de camada sin tratar $G6pc^{-/-}$ y $G6pc^{+/-}/G6pc^{+/-}$ diluidas 1:200 como controles. Después de incubación durante una noche, las tiras de membrana se incubaron con IgG de cabra anti-conejo de conjugado de peroxidasa de rábano picante o IgG de cabra anti-ratón (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). El inmunocomplejo se visualizó por el sistema quimioluminiscente usando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico de Pierce (Rockford, IL).

15

20

Inmunodetección de linfocitos CD8+

25

Los hígados de ratones se congelaron rápidamente, se incluyeron en O.C.T. (Sakura Finetek, Terrance, CA), y se seccionaron a 8 micrómetros de espesor. Las secciones se fijaron en acetona durante 10 minutos a -20°C , se secaron, se lavaron con PBS, se bloquearon con PBS que contenía el 2% de BSA durante 30 minutos, y se incubaron a 4°C durante una noche con un anticuerpo policlonal de conejo contra CD8 (Abeam Inc., Cambridge, MA) en PBS complementado con BSA al 1%. Después de lavados con PBS, las secciones se incubaron durante 1 hora a 25°C en la oscuridad con un anticuerpo IgG de cabra anti-rata conjugado con tinte Alexa Fluor® 488 (Invitrogen). Después de lavados con PBS, las células marcadas se montaron con un medio anti-desvanecimiento de montaje a base de agua que contenía DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se visualizaron usando el microscopio de fluorescencia Axioskop2 plus (Carl Zeiss, Thornwood, NY). Las células CD8+ se contaron en diez campos seleccionados al azar con un aumento de 200 veces y se indicaron como la media aritmética.

30

35

Análisis estadístico

La prueba t no pareada se realizó utilizando el programa GraphPad Prism®, versión 4 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los valores se consideraron estadísticamente significativos en $p < 0,05$.

40

RESULTADOS

La infusión con AAV-GPE dirige la expresión hepática a largo plazo de G6Pasa- α

45

Con el fin de examinar el impacto *in vivo* de secuencias aguas arriba de nucleótidos -298 del elemento promotor de G6PC humano estudiado previamente (Koeberl et al., Mol Ther 16:665-672, 2008), AAV-GPE, se construyó un vector AAV8 que expresaba G6Pasa- α humana bajo el control de los nucleótidos -2864 a -1 de la región flanqueante 5' de G6PC 5' humana. Puesto que no hay edad estándar a la que iniciar la terapia génica mediada por AAV en ratones (Ghosh et al., Gene Ther 13:321-329, 2006; Koeberl et al., Gene Ther 13:1281-1289, 2006; Koeberl et al., Mol Ther 16:665-672, 2008) y que hay evidencia de que la pérdida de eficacia y persistencia de la transferencia de genes se ve influenciada por el aumento de la tasa de proliferación hepatocelular asociada con el crecimiento del hígado (Cunningham et al., Mol Ther 16:1081-1088, 2008), los ratones $G6pc^{-/-}$ se infundieron a tres edades diferentes, 2 días de edad, 2 semanas de edad o 4 semanas de edad, y se examinó una expresión hepática de G6Pasa- α a las 24 semanas de edad. A pesar de la diferencia de edad, cada grupo de ratones se infundió con la misma dosis de AAV-GPE ($1,2 \times 10^{11}$ genomas virales (vg)/ratón). Se controlaron los perfiles metabólicos de los animales infundidos durante el estudio de 24 semanas, y todas las mediciones se compararon con las de sus compañeros de camada $G6pc^{+/-}/G6pc^{+/-}$ y ratones $G6pc^{-/-}$ de 4 a 6 semanas de edad sin tratar. La GSD-la es un trastorno autosómico recesivo, y estudios previos han demostrado que el fenotipo de los compañeros de camada

50

55

G6pc^{+/+} y *G6pc^{+/-}* son indistinguibles y de tipo salvaje (Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996).

No hubo muertes prematuras en los animales *G6pc^{-/-}* infundidos a lo largo de la duración del estudio de 24 semanas, independientemente de la edad de infusión. En los ratones *G6pc^{-/-}* infundidos a los 2 días de edad con AAV-GPE (1,2 x 10¹¹ vg/ratón, equivalente a 6 x 10¹³ vg/kg), la actividad hepática de G6Pasa-α fue del 77,6% de la actividad de control a las 2 semanas de edad, disminuyendo al 16,2% a las 4 semanas de edad y el 6,5% de actividad de control a las 6 semanas de edad (Tabla 1). Sin embargo, más allá de 6 semanas, los niveles de actividad hepática de G6Pasa-α se estabilizaron al cabo de 24 semanas (Tabla 1). Por lo tanto, la expresión se redujo 11,9 veces en todo el estudio de 24 semanas, teniendo lugar la mayor reducción en las primeras 6 semanas.

En contraste, en ratones *G6pc^{-/-}* infundidos a las 2 semanas de edad con AAV-GPE (1,2 x 10¹¹ vg/ratón, equivalente a 1,5 x 10¹³ vg/kg), la actividad hepática de G6Pasa-α a las 2 semanas de edad posterior a la infusión (a las 4 semanas de edad) fue 2,4 veces mayor que la actividad en sus compañeros de camada *G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}* (Tabla 1), alcanzando 433,4 ± 11,1 nmol/mg/min. A pesar de que la actividad hepática de G6Pasa-α se sometió posteriormente a una reducción de 2,6 veces entre las edades de 4 a 6 semanas, dio como resultado una actividad hepática casi normal de G6Pasa-α (174,0 ± 22,4 nmol/mg/min) que se mantuvo desde la edad de 6 semanas durante la duración del estudio de 24 semanas (Tabla 1). De forma similar, en ratones *G6pc^{-/-}* con infusión de AAV-GPE a la edad de 4 semanas con la misma dosificación (1,2 x 10¹¹ vg/ratón, equivalente a 1 x 10¹³ vg/kg), la actividad de G6Pasa-α hepática a la edad de 24 semanas fue de 335,6 ± 40,2 nmol/min/mg, 1,9 veces mayor que la actividad en los compañeros de camada de control (Tabla 1). Estos hallazgos son consistentes con la propuesta anterior (Cunningham et al., Mol Ther 16:1081-1088, 2008) de que la pérdida de eficacia y persistencia de la transferencia génica se ve influenciada por el aumento de la tasa de proliferación hepatocelular asociada con el crecimiento del hígado. Las inyecciones en etapas posteriores de desarrollo, cuando la tasa de crecimiento del hígado es más baja, dieron como resultado una menor pérdida de la expresión génica.

Se investigó la distribución de la expresión de transgén de G6Pasa-α en el hígado. Como era de esperar, no hubo actividad teñible de G6Pasa-α en las secciones del hígado de ratones *G6pc^{-/-}* sin tratar. En ratones *G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}*, el análisis histoquímico enzimático demostró G6Pasa-α distribuida por todo el hígado, pero con niveles significativamente más altos en proximidad a los vasos sanguíneos.

En ratones *G6pc^{-/-}* infundidos a la edad de 2 días con AAV-GPE, se distribuyó la actividad de G6Pasa-α hepática por todo el hígado a las 2 semanas de edad. A diferencia de los ratones de tipo salvaje, la expresión era desigual con focos que se tiñeron con mayor fuerza que en los hígados de control. La actividad teñida de G6Pasa-α disminuyó notablemente de 2 a 4 semanas de edad, consecuentemente con una disminución de 4,8 veces la actividad de fosfohidrolasa (Tabla 1). De nuevo, la actividad teñida de G6Pasa-α disminuyó y se estabilizó a las 6 semanas de edad o más.

En ratones *G6pc^{-/-}* infundidos con AAV-GPE a las 2 o 4 semanas de edad, el análisis histoquímico enzimático mostró de nuevo que el transgén de G6Pasa-α se distribuyó por todo el hígado con focos que contenían niveles significativamente más altos de actividad enzimática. De nuevo, las actividades de G6Pasa-α estimadas mediante análisis histoquímico estaban de acuerdo con ensayos cuantitativos de fosfohidrolasa (Tabla 1). En ratones *G6pc^{-/-}* infundidos con AAV-GPE a las 2 semanas de edad, habían células en el hígado que se tiñeron con menor intensidad que las células en los hígados de tipo salvaje. Por lo tanto, no se restauró un patrón normal de expresión hepática de G6Pasa-α en ratones infundidos con AAV-GPE, a pesar de presentar actividad de G6Pasa-α de tipo salvaje.

Tabla 1. Actividad hepática de G6Pasa en ratones *G6pc^{-/-}* infundidos con 1,2 x 10¹¹ vg/ratón de AAV-GPE

Ratones	Edad semanas	Actividad de fosfohidrolasa nmol/mg/min	Actividad relativa %	% (+/+ o +/-) de actividad
+/+ o +/- (n = 16)	2-24	178,1 ± 10,0		100
Infusión a los 2 días de edad				
-/-/AAV-GPE (n = 2)	2	138,3 ± 22,6	100	77,6
-/-/AAV-GPE (n = 4)	4	28,8 ± 9,9	20,8	16,2

Ratones	Edad semanas	Actividad de fosfohidrolasa nmol/mg/min	Actividad relativa %	% (+/+ o +/-) de actividad
-/-/AAV-GPE (n = 7)	6-24	11,6 ± 5,0	8,4	6,5
Infusión a las 2 semanas de edad				
-/-/AAV-GPE (n = 2)	4	433,4 ± 11,1	100	243,3
-/-/AAV-GPE (n = 2)	6	156,1 ± 7,0	36,0	87,6
-/-/AAV-GPE (n = 3)	24	174,0 ± 22,4	40,1	97,7
Infusión a las 4 semanas de edad				
-/-/AAV-GPE (n = 3)	24	335,6 ± 40,2		188,4

Los ratones *G6pc*^{-/-} se infundieron con $1,2 \times 10^{11}$ vg/ratón de AAV-GPE a los 2 días, 2 semanas o 4 semanas de edad como se describe en MATERIALES y MÉTODOS. Se usaron ratones *G6pc*^{+/+}/*G6pc*^{+/-} (+/+ y +/-) emparejados por edad como controles positivos y se usaron ratones *G6pc*^{-/-} (-/-) de 4 a 6 semanas de edad como controles negativos. Los valores en la tabla se han corregido para determinar el antecedente, restando la actividad de G6Pasa- α ($1,8 \pm 0,2$ nmol/min/mg) en los microsomas del hígado de ratones *G6pc*^{-/-} sin tratar de los resultados respectivos. Los datos se presentan como media \pm SEM.

La infusión de AAV-CBA se dirige a los niveles más bajos de expresión hepática de G6Pasa- α

El promotor de CBA/potenciador de CMV se ha usado ampliamente para dirigir altos niveles de la expresión transgén hepática (Xu et al., Hum Gene Ther 12:563-573, 2001). Sin embargo, se sabe que el promotor de CMV está silenciado por metilación extensa de CpG y no CpG (Brooks et al., J Gene Med 6:395-404, 2004; Mehta et al., Gene 428: 20-24, 2009). Los experimentos anteriores *in vivo* que usaban AAV-CBA, un vector de AAV8 que expresaba G6Pasa- α murina bajo el control del promotor de CBA/potenciador de CMV híbrido habían mostrado una expresión deficiente (Ghosh et al., Gene Ther 13:321-329, 2006), posiblemente relacionada con la metilación del promotor de CMV. Con el fin de comparar la eficacia *in vivo* de la transferencia hepática génica entre AAV-CBA y AAV-GPE, se infundieron ratones *G6pc*^{-/-} con un aumento de la dosis de AAV-CBA a $4,8 \times 10^{11}$ vg/ratón, de una manera similar a los experimentos de AAV-GPE, a los 2 días y 2 semanas de edad y seguido de las 24 semanas de edad.

Para los ratones *G6pc*^{-/-} infundidos a los 2 días de edad, la actividad de G6Pasa- α hepática a la edad de 2 semanas fue 2,8 veces mayor en ratones con infusión de AAV-CBA en comparación con ratones con infusión de AAV-GPE (Tablas 1 y 2), reflejando la dosificación 4 veces superior de la infusión de AAV-CBA. Sin embargo, la actividad hepática de G6Pasa- α en los animales con infusión de AAV-CBA en estado neonatal disminuyó rápidamente a $20,6 \pm 1,1$ nmol/mg/min a las 4 semanas de edad (Tabla 2), una disminución de 18,6 veces en 2 semanas, en comparación con una disminución de 4,8 veces en ratones *G6pc*^{-/-} neonatales con infusión de AAV-GPE (Tabla 1). Dado que CBA y GPE están en un fondo de vectores idénticos, este hallazgo sugiere que el promotor de CBA/potenciador de CMV es menos eficiente en el direccionamiento de la expresión hepática persistente del transgén *in vivo* que el promotor/potenciador de G6PC.

En ratones *G6pc*^{-/-} con infusión de $4,8 \times 10^{11}$ vg/ratón de AAV-CBA a la edad de 2 semanas, la actividad de G6Pasa- α hepática fue de $236,9 \pm 64,7$ a la edad de 4 semanas (Tabla 2), que fue 1,83 veces inferior que en ratones *G6pc*^{-/-} de 4 semanas de edad infundidos a la edad de 2 semanas con $1,2 \times 10^{11}$ vg/ratón de AAV-GPE (Tabla 1). Además, la actividad de G6Pasa- α hepática continuó disminuyendo con el vector de CBA de $55,7 \pm 2,7$ nmol/mg/min a la edad de 6 semanas a $38,1 \pm 1,7$ nmol/mg/min a la edad de 24 semanas (Tabla 2). Esto estaba en contraste con los niveles expresados con el vector de GPE que se estabilizó durante este periodo de tiempo a niveles cercanos al tipo salvaje (Tabla 1).

El análisis histoquímico enzimático de animales con infusión de AAV-CBA demostró que la tinción de actividad fue similar a la del vector de GPE, distribuida de forma desigual con numerosos focos que se tiñeron con mayor fuerza

que en los hígados de control. Sin embargo, en coherencia con los ensayos cuantitativos de fosfohidrolasa (Tabla 2), las intensidades generales de tinción fueron significativamente menores con el aumento de edad de los ratones infundidos.

5 **Tabla 2. Actividad de G6Pasa hepática en ratones $G6pc^{-/-}$ infundidos con $4,8 \times 10^{11}$ vg/ratón de AAV-CBA**

Ratones	Edad semanas	Actividad de fosfohidrolasa nmol/mg/min	Actividad relativa %	% (+/+ o +/-) de actividad
+/+ o +/- (n = 16)	2-24	178,1 ± 10,0		
Infusión a los 2 días de edad				
-/-/AAV-CBA (n = 2)	2	382,3 ± 4,2	100	214,7
-/-/AAV-CBA (n = 3)	4	20,6 ± 1,1	5,4	11,6
Infusión a las 2 semanas de edad				
-/-/AAV-CBA (n = 2)	4	236,9 ± 64,7	100	133,0
-/-/AAV-CBA (n = 2)	6	55,7 ± 2,7	23,5	31,3
-/-/AAV-CBA (n = 3)	24	38,1 ± 1,7	16,1	21,4

Los ratones $G6pc^{-/-}$ (-/-) se infundieron con $4,8 \times 10^{11}$ vg/ratón de AAV-CBA a la edad de 2 días y 2 semanas como se describe en MATERIALES y MÉTODOS. Se usaron ratones $G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}$ (+/+ y +/-) emparejados por edad como controles positivos y se usaron ratones $G6pc^{-/-}$ (-/-) de 4 a 6 semanas de edad como controles negativos. Los valores en la tabla se han corregido para determinar el antecedente, restando la actividad de G6Pasa- α ($1,8 \pm 0,2$ nmol/min/mg) en los microsomas del hígado de ratones $G6pc^{-/-}$ sin tratar de los resultados respectivos. Los datos se presentan como media ± SEM.

La infusión de AAV-GPE corrige las manifestaciones patológicas de GSD-Ia

Los ratones $G6pc^{-/-}$ en terapia de glucosa tienen un crecimiento retardado y en 2 semanas de edad su peso corporal promedio es de aproximadamente el 60% de sus compañeros de camada $G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}$ (Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996). Los ratones $G6pc^{-/-}$ neonatales con infusión de AAV-GPE tuvieron una tasa de crecimiento notablemente mejorada y los pesos corporales de los animales infundidos fueron comparables a los ratones de control (Figura 1A). Los ratones $G6pc^{-/-}$ con infusión a las 2 o 4 semanas de edad de AAV-GPE presentaron una curva de crecimiento paralelo a sus compañeros de camada $G6pc^{-/-}/G6pc^{+/-}$, pero a valores más bajos, lo que es coherente con los pesos corporales inferiores de partida de ratones $G6pc^{-/-}$ antes de iniciar terapia génica (Figura 1A).

En terapia de glucosa, los ratones $G6pc^{-/-}$ continúan manifestando hipoglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperuricemia y acidemia láctica (Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996; Kim et al., J Hepatol 48: 479-485, 2008). Por el contrario, los ratones $G6pc^{-/-}$ con infusión de AAV-GPE tenían perfiles de glucosa en sangre normales (Figura 1B) y ninguno de los animales infundidos sufrió los ataques hipoglucémicos frecuentes típicos de los ratones $G6pc^{-/-}$ sin tratar (Lei et al., Nat Genet 13:203-209, 1996) y los pacientes con GSD-Ia humana (Chou et al., Curr Mol Med 2:121-143, 2002). Los niveles de glucosa en sangre en ratones $G6pc^{-/-}$ infundidos en estado neonatal fueron significativamente más bajos que en sus compañeros de camada de control (Figura 1B), lo que sugiere que la actividad de G6Pasa- α hepática restaurada a un 6,5% de niveles de control es insuficiente para mantener un perfil normal de glucosa en sangre. En contraste, los niveles de glucosa en sangre en ratones $G6pc^{-/-}$ con infusión de AAV-GPE a las 2 o 4 semanas de edad podían distinguirse de sus compañeros de camada de control (Figura 1B). La infusión con AAV-GPE también normalizó los niveles normalizados de colesterol sérico, triglicéridos, ácido úrico y ácido láctico, aunque los ratones $G6pc^{-/-}$ con infusión en fase neonatal tenían niveles ligeramente más altos de colesterol en sangre y ácido láctico (Figura 1B).

La hepatomegalia es otra presentación clínica en GSD-Ia y es causada principalmente por el exceso de glucógeno y

deposición de lípidos (Chou et al., Curr Mol Med 2:121-143, 2002). No se observó anomalía histológica en las secciones de tejido del hígado de los ratones no afectados y transducidos con AAV-GPE de 24 semanas de edad. El contenido de glucógeno en el hígado de ratones $G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}$ de 24 semanas de edad promedió unidades de glucosilo de $1,89 \pm 0,17$ nmol por mg de proteína en animales con infusión en fase neonatal de AAV-GPE, el contenido de glucógeno a las 24 semanas de edad fue significativamente mayor en unidades de glucosilo de $4,65 \pm 0,19$ nmol por mg de proteína, indicativo del defecto de almacenamiento de glucógeno observado en ratones con GSD-Ia. En contraste, los ratones que recibieron infusiones a las 2 o 4 semanas de edad mostraron niveles de tipo salvaje de glucógeno a las 24 semanas de edad, concretamente, unidades de glucosilo de $1,61 \pm 0,39$ y $1,65 \pm 0,19$ nmol por mg de proteína, respectivamente, indicativo de la ausencia de la histología característica de la enfermedad de GSD-Ia en esta fase de desarrollo.

La tinción de aceite rojo O mostró que el contenido de lípidos en animales con infusión de AAV-GPE fue similar al de los compañeros de camada $G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}$ a las 24 semanas de edad. Para la medición histoquímica cuantitativa, se convirtieron los lípidos fotografiados con tinción de aceite rojo O en unidades de densidad de píxeles utilizando Adobe Photoshop. Las unidades de densidad en el hígado de ratones $G6pc^{+/-}$ tratados con AAV-GPE eran más bajas que las de los ratones de control (aproximadamente 150 unidades de densidad de píxeles/ μm^2 en comparación con aproximadamente 300 unidades de densidad de píxeles/ μm^2), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Tomados en conjunto, estos resultados indican que los ratones $G6pc^{+/-}$ con infusión de AAV-GPE no presentaron ninguna anomalía histológica y tuvieron un contenido normal de glucógeno y de grasas en el hígado.

Los ratones $G6pc^{+/-}$ con infusión de AAV-GPE presentan un perfil de glucosa en ayunas normal y de tolerancia a la glucosa

Los niveles de glucosa en sangre en ayunas se examinaron en ratones $G6pc^{+/-}$ de 12 y 14 semanas de edad infundidos con AAV-GPE a la edad de 2 y 4 semanas, respectivamente. Los niveles de glucosa en sangre en ratones $G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}$ no cambiaron después de 6 horas de ayuno. De forma importante, los niveles de glucosa en sangre en ratones $G6pc^{+/-}$ con infusión de AAV-GPE, a las 2 o 4 semanas de edad, tampoco cambiaron después de 6 horas de ayuno, lo que demuestra que los ratones $G6pc^{+/-}$ infundidos ya no sufrieron más de hipoglucemia en ayunas, característica de la GSD-Ia (Chou et al., Curr Mol Med 2:121-143, 2002). Los experimentos similares en ayunas con los ratones $G6pc^{+/-}$ sin tratar dieron lugar a hipoglucemia rápida seguida de ataques hipoglucémicos después de tan sólo un corto ayuno.

Los estudios han demostrado que la sobreexpresión de G6Pasa- α hepática puede inducir diabetes (Liu et al., Biochem Biophys Res Commun 205:680-686, 1994; Antinozzi et al., Annu Rev Nutr 19: 511-544, 1999; Clore et al., Diabetes 49:969-974, 2000). Dado que la actividad de G6Pasa- α hepática en ratones $cG6pc^{+/-}$ de 24 semanas de edad infundidos a las 4 semanas de edad con AAV-GPE era casi 2 veces superior a la actividad en sus compañeros de camada $G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}$, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en ratones $G6pc^{+/-}$ de 14 semanas de edad infundidos a la edad de 4 semanas con AAV-GPE. Como control, también se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en ratones $G6pc^{+/-}$ de 12 semanas de edad infundidos a las 2 semanas de edad con AAV-GPE. Estos animales presentaron niveles de tipo salvaje de actividad hepática de G6Pasa- α . Los perfiles de tolerancia a la glucosa en los ratones $G6pc^{+/-}$ infundidos no se pudieron distinguir de los de los compañeros de camada de control.

Ausencia de respuesta inmune contra G6Pasa- α humana

Para determinar si se genera una respuesta humoral dirigida contra G6Pasa- α humana en los ratones $G6pc^{+/-}$ infundidos, se realizó un análisis de transferencia Western usando sueros de ratones con infusión de AAV-GPE o AAV-CBA. Como control positivo, se utilizó un antisuero de G6Pasa- α anti-humana de conejo que reconoce también G6Pasa- α murina (Ghosh et al., J Biol Chem 277: 32837-32842, 2002). No se detectaron anticuerpos dirigidos contra G6Pasa- α en ninguno de los ratones $G6pc^{+/-}$ con infusión de AAV-GPE o AAV-CBA que vivieron hasta las 24 semanas de edad. Además, no habían anticuerpos endógenos dirigidos contra G6Pasa- α presentes en el suero de compañeros de camada $G6pc^{+/+}/G6pc^{+/-}$ o ratones $G6pc^{+/-}$ sin tratar.

La infusión de AAV-CBA provoca un aumento de la infiltración hepática de linfocitos CD8+

La ausencia de anticuerpos detectables contra G6Pasa- α en el hígado de ratones $G6pc^{+/-}$ con infusión de AAV-CBA, sugiere que una respuesta inmune mediada por células con respecto al transgén de G6Pasa- α no es la causa de la disminución rápida de la expresión de transgén dirigida por este vector. Otra posibilidad es una respuesta inflamatoria inmune provocada por el vector de AAV-CBA. Por lo tanto, la infiltración hepática de linfocitos CD8+ se examinó 2 semanas después de la infusión de ratones $G6pc^{+/-}$ con AAV-CBA o AAV-GPE. En ratones $G6pc^{+/-}$ o de

tipo salvaje de 2 y 4 semanas de edad, los recuentos hepáticos de linfocitos CD8+ eran bajos. En ratones *G6pc*^{-/-} con infusión de AAV-CBA o AAV-GPE a los 2 días de edad, los recuentos hepáticos de linfocitos CD8+ a las 2 semanas de edad fueron similares para cada uno de los tipos de vectores y comparables con los recuentos en animales de tipo salvaje o *G6pc*^{-/-} de 2 semanas de edad sin tratar. En ratones *G6pc*^{-/-} con infusión de AAV-GPE a las 2 semanas de edad, los recuentos hepáticos de linfocitos CD8+ se mantuvieron bajos a las 4 semanas de edad. En contraste, en ratones *G6pc*^{-/-} con infusión de AAV-CBA a las 2 semanas de edad, los recuentos hepáticos de linfocitos CD8+ se aumentaron notablemente a las 4 semanas de edad. Los resultados sugieren que una respuesta inflamatoria provocada por AAV-CBA puede explicar, al menos en parte, la disminución rápida y la baja eficacia de la expresión hepática de G6Pasa- α dirigida por el promotor de CBA/potenciador de CMV.

10

Ejemplo 2: Prevención de adenoma hepatocelular y corrección de anomalías metabólicas en enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo IA usando terapia génica

Este ejemplo describe estudios para evaluar la eficacia del vector de AAV-GPE en un estudio a largo plazo. La terapia génica mediada por el vector de AAV-GPE en ratones *G6pc*^{-/-} fue eficaz durante al menos 70-90 semanas en ratones que expresaban más del 3% de G6Pasa- α hepática de tipo salvaje. Los resultados demostraron que ratones tratados con AAV-GPE presentan almacenamiento hepático normal de grasa, metabolitos en sangre normales y perfiles de tolerancia a la glucosa, niveles reducidos de insulina en sangre en ayunas y ninguna evidencia de alteraciones hepáticas.

20

MATERIALES Y MÉTODOS

Infusión de ratones *G6pc*^{-/-} con AAV-GPE

El vector AAV-GPE (como se describe en el Ejemplo 1 y Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010) se infundió en ratones *G6pc*^{-/-} (Lei et al., Nat Genet 13: 203-209, 1996) a través del seno retro-orbital. Se usaron ratones *G6pc*^{+/+}/*G6pc*^{+/-} emparejados por edad, así como ratones *G6pc*^{-/-} de 6 a 10 semanas de edad, como control. Para ratones con infusión de virus, la terapia de glucosa (Lei et al., Nat Genet 13: 203-209, 1996) se determinó inmediatamente después de la infusión.

30

Las pruebas de tolerancia a la glucosa de ratones consistían en ayuno durante 6 horas, antes de la toma de muestras de sangre, seguido de inyección intraperitoneal de una solución de glucosa a un peso corporal de 2 mg/g, y se repite la toma de muestras de sangre a través de la vena de la cola durante 2 horas.

35 Ensayos de captación de fosfohidrolasa y de G6P microsomal

Se llevó a cabo aislamiento de microsomas, ensayos de fosfohidrolasa, análisis histoquímico enzimático de G6Pasa- α , y ensayos de captación de G6P microsomal, como se ha descrito previamente (Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010; Lei et al., Nat Genet 13: 203-209, 1996).

40

Análisis fenotípico

Se examinaron primero ratones para nódulos hepáticos mediante ultrasonidos utilizando el sistema Vevo 2100 (VisualSonics, Ontario, Canadá) y se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola. Se analizaron glucosa en sangre, colesterol total y ácido úrico utilizando kits obtenidos de Thermo Electron (Louisville, CO); triglicéridos, mediante un kit de Sigma Diagnostics (St Louis, MO); lactato, mediante un kit de Trinity Biotech (St. Louis, MO); e insulina, mediante un kit ELISA de insulina de ratón ultra sensible de Crystal Chem (Downers Grove, IL). Se midieron contenidos hepáticos de glucógeno como se ha descrito previamente (Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010). Para determinar contenidos hepáticos de triglicéridos, glucosa y G6P, se homogeneizaron tejidos del hígado en tampón RIPA (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, Na-desoxicolato al 0,5% y SDS al 0,1%) (Thermo Scientific, Rockford, IL) y se midieron los triglicéridos usando un kit de Sigma Diagnostics; glucosa, mediante un kit de Thermo Electron y; G6P, mediante un kit de BioVision (Mountain View, CA).

50

Para hematoxilina y eosina (H&E) y tinción de aceite rojo O (Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010), se conservaron secciones del hígado en formalina tamponada neutra al 10% y se seccionaron a 4-10 micrómetros de espesor. Las secciones teñidas se visualizaron utilizando el microscopio Axioskop2 plus y el software Axio Vision 4.5 (Carl Zeiss, Thornwood, NY).

55

RT-PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de anticuerpos

Se aislaron los ARN totales de los tejidos del hígado usando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se cuantificó la expresión de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real en un sistema de PCR de tiempo real Applied Biosystems 7300 usando sondas TaqMan de Applied Biosystems (Foster City, CA). Se analizaron los datos utilizando el software Applied Biosystems SDS v 1.3 y se normalizaron el ARN de β -actina. Se detectaron los anticuerpos contra G6Pasa- α humana mediante análisis de transferencia Western de la manera que se ha descrito previamente (Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010).

10 Análisis estadístico

La prueba t no pareada se realizó utilizando el programa GraphPad Prism®, versión 4 (San Diego, CA). Los valores se consideraron estadísticamente significativos en $P < 0,05$.

15 RESULTADOS

15 La infusión con AAV-GPE se dirige a la expresión hepática a largo plazo de G6Pasa- α

Ratones -G6pc^{-/-} de dos a cuatro semanas de edad ($n = 18$) se infundieron con dosis variables de AAV-GPE (5×10^{12} a 3×10^{13} partículas virales (vp)/kg) previstas para restaurar y mantener del 3% al 100% de la actividad de G6Pasa- α hepática de tipo salvaje. También se infundieron un ratón de 15 semanas de edad (5×10^{12} vp/kg) y un ratón de 30 semanas de edad (1×10^{13} vp/kg) G6pc^{-/-}. La baja tasa de supervivencia de ratones de GSD-la bajo terapia de glucosa restringió gravemente el número de ratones adultos disponibles para estudio (Lei et al., Nat Genet 13: 203-209, 1996). Se controlaron los perfiles histológicos y metabólicos de los 20 animales infundidos a lo largo de 70-90 semanas, y todas las mediciones se compararon con las de sus compañeros de camada G6pc^{+/+} y G6pc^{-/-}. El fenotipo de ratones tanto G6pc^{+/+} como G6pc^{-/-} no se puede distinguir del tipo salvaje (Lei et al., Nat Genet 13: 203-209, 1996).

No hubo muertes prematuras de los ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE. Se evaluó el contenido de glucógeno y la actividad hepática de G6Pasa- α en ratones sacrificados después de 24 horas de ayuno. La actividad media hepática de G6Pasa- α en ayunas de ratones de tipo salvaje de 70 a 90 semanas de edad ($n = 20$) fue de $185,8 \pm 12,7$ nmol/mg/min (Figura 2A). Como estaba previsto, hubo un intervalo de actividades hepáticas de G6Pasa- α restaurado en los ratones tratados. De los 20 ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE sacrificados a las 70 a 90 semanas de edad, 6 ratones tuvieron niveles bajos (3% al 9% de actividad de tipo salvaje) de actividad hepática de G6Pasa- α y se designaron con AAV-L, 9 ratones tuvieron niveles medios (22% al 63% de actividad de tipo salvaje) de actividad hepática de G6Pasa- α , designados con AAV-M, y 5 ratones tuvieron niveles altos (81% al 128% de actividad de tipo salvaje) de actividad hepática de G6Pasa- α , designados AAV-H (Figura 2A). El análisis por RT-PCR en tiempo real mostró una relación lineal entre la expresión hepática de ARNm de G6Pasa- α y la actividad de G6Pasa- α (Figura 2B).

El análisis histoquímico enzimático demostró que la G6Pasa- α en ratones de tipo salvaje se distribuyó por todo el hígado con niveles significativamente más altos en proximidad a los vasos sanguíneos. No hubo actividad teñible de G6Pasa- α en las secciones del hígado de ratones G6pc^{-/-} sin tratar. En ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE, se distribuyó también G6Pasa- α por todo el hígado, pero con focos, no relacionados con vasos sanguíneos, que contenían niveles considerablemente más altos de actividad enzimática. La distribución desigual de G6Pasa- α hepática en los ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE sugiere que una proporción sustancial de los hepatocitos albergaron baja o poca G6Pasa- α , incluyendo hígados de AAV-H que expresaban el 81-128% de la actividad de G6Pasa- α de tipo salvaje. No se requiere la expresión hepática de G6Pasa- α uniforme para el rescate del fenotipo de GSD-la.

50 La infusión de AAV-GPE corrige anomalías metabólicas en GSD-la

La GSD-la se caracteriza por hipoglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperuricemia y acidemia láctica (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). Los niveles de glucosa en sangre en ratones de AAV-H que expresan actividad hepática de G6Pasa- α de tipo salvaje no pudieron distinguirse de los de los compañeros de camada de control (Figura 3A). Los AAV-M y AAV-L que expresan el 22-63% y el 3-9% de actividad hepática normal de G6Pasa- α , respectivamente, también mantuvieron un estado de euglucemia (-100 mg/dl) (Yoshizawa et al., J Clin Invest 119:2807-2817, 2009) pero sus niveles de glucosa en sangre fueron sistemáticamente inferiores a la de los compañeros de camada de control (Figura 3A). Todo los ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE presentaron perfiles séricos normales de colesterol y triglicéridos, mientras que los niveles séricos de ácido úrico y ácido láctico en los

ratones G6pc^{-/-} tratados fueron inferiores a los de los compañeros de camada de control (Figura 3A).

Los pesos corporales promedio de los ratones hembra y macho tratados con AAV-GPE a las 70-90 semanas de edad fueron del 70% y 62%, respectivamente, de sus ratones de control emparejados por edad y sexo (Figura 3B).

- 5 Sin embargo, las longitudes corporales promedio de los ratones G6pc^{-/-} tratados fue del 90% de los controles (Figura 3B). En consecuencia, los valores del índice de masa corporal (IMC) (Bahary et al., Proc Natl Acad Sci USA 87:8642-8646, 1990) de ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE fueron significativamente más bajos que los de los compañeros de camada de control (Figura 3B). Si bien los valores de IMC de ambos grupos de ratones indican un crecimiento normal (Bahary et al., Proc Natl Acad Sci USA 87:8642-8646, 1990), los ratones G6pc^{-/-} tratados con
- 10 AAV-GPE fueron considerablemente más delgados. Los pesos del hígado en ratones de tipo salvaje fueron relativamente constantes (Figura 3C). En ratones con infusión de AAV-GPE, los pesos del hígado se correlacionaron inversamente con la actividad hepática de G6Pasa- α restaurada (Figura 3C). Cuando los pesos del hígado se expresaron como porcentaje del peso corporal, los ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE tenían valores significativamente más altos a causa de su peso corporal más bajo. Sin embargo, cuando se compararon los pesos
- 15 absolutos del hígado de forma directa, no hubo diferencia significativa entre el AAV-M, el AAV-H y los compañeros de camada (Figura 3C). Sin embargo, los ratones de AAV-L continuaron mostrando hepatomegalia. El AAV-GPE suministra poco o ningún transgén al riñón (Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010). Sin embargo, los ratones inyectados que expresaban mayor actividad hepática de G6Pasa- α tuvieron pesos inferiores de riñón, lo que sugiere una buena nefromegalia normalizada de control metabólico hepático.

20

Ausencia de anomalías histoquímicas, esteatosis, o HCA en hígados G6pc^{-/-} infundidos con AAV-GPE

- Con el fin de determinar la presencia de nódulos de HCA en ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE, se realizó un análisis de ultrasonido, seguido de un examen amplio de los hígados y análisis histológico de muestras de biopsia
- 25 de hígado, utilizando 5 o más secciones separadas por hígado. Los análisis de ultrasonido y morfológicos no detectaron nódulos hepáticos de tipo salvaje (n = 20) y detectaron ratones (n = 20) G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE que vivieron hasta las 70-90 semanas de edad. Los ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE infundidos a las 2 o 4 semanas de edad (n = 18) no mostraron anomalías histológicas hepáticas, excepto un aumento de almacenamiento de glucógeno. El ratón de 84 semanas de edad infundido a las 15 semanas de edad, que expresaba el 6% de
- 30 actividad hepática normal de G6Pasa- α , presentó un almacenamiento elevado de glucógeno y pocos focos necróticos en una sección del hígado. A pesar de que la mayoría de las secciones de tejido del hígado de los ratones de 90 semanas de edad inyectados a las 30 semanas de edad, que expresaron el 38% de actividad hepática normal de G6Pasa- α , no presentaron anomalías histológicas, una sección del hígado tenía muchos focos necróticos. Dado que los focos necróticos son una patología hepática característica que se observa en ratones con GSD-la sin
- 35 tratar de 6 semanas de edad o mayores (Kim et al., J Hepatol 48: 479-485, 2008), es muy probable que los focos necróticos se hubiesen desarrollado antes de la iniciación de la terapia génica a las 15 o 30 semanas de edad.

- Se indicó que los hígados de ratones con G6pc nula de hígado específico desarrollaban HCA con esteatosis marcada (Mutel et al., J Hepatol 54:529-537, 2011). Mientras que en unos pocos ratones de tipo salvaje había
- 40 aumento de almacenamiento hepático de grasas, hubo poco o ningún almacenamiento de grasas en los hígados de ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE. Además, el contenido hepático de triglicéridos en ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE (n = 20) no fueron estadísticamente diferentes de los ratones de tipo salvaje. La tinción de aceite rojo O confirmó que el contenido de lípidos en animales tratados con AAV-GPE (n = 20) fue similar al de los controles.

- 45 Se ha establecido bien que la ciclooxigenasa-2 (COX-2) es un marcador que se sobreexpresa en muchos cánceres pre-neoplásicos y neoplásicos, incluyendo HCC (Wu, Cancer Treat Rev 32:28-44, 2006). El análisis cuantitativo de RT-PCR demostró que los niveles similares de mensaje hepático de COX-2 se expresó en compañeros de camada G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE y compañeros de camada de control.

50 Los ratones G6pc^{-/-} tratados con AAV-GPE presentan perfiles de glucosa en ayunas normal y de tolerancia a la glucosa

- Los niveles medios de glucosa en sangre de los ratones de tipo salvaje (n = 20) antes de iniciar el ayuno fueron de 165,0 \pm 3,0 mg/dl (tiempo cero), los cuales se redujeron a 113,3 \pm 6,5 mg/dl después de 24 horas de ayuno (Figura
- 55 4A). Los perfiles de glucosa en sangre en ayunas de ratones de AAV-L y AAV-M eran paralelos a los de los ratones de control, pero los niveles de glucosa en sangre fueron consistentemente más bajos (Figura 4A), mientras que el perfil de glucosa en ayunas de ratones de AAV-H no se podía distinguir del de los ratones de control. En agudo contraste, los ratones G6pc^{-/-} sin tratar mostraron hipoglucemia marcada dentro de 60 a 75 minutos de ayuno (Figura 4B), una característica distintiva de la GSD-la (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). En resumen, los

ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE ya no padecieron la hipoglucemia en ayunas característica de la GSD-Ia (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010).

No se pudieron distinguir los perfiles de tolerancia a la glucosa en sangre en ratones de AAV-M y AAV-H de los de los compañeros de camada de tipo salvaje (Figura 4C). En ratones de AAV-L, después de la inyección de glucosa intraperitoneal, los niveles de glucosa en sangre se redujeron a un ritmo más rápido que en el de los controles de tipo salvaje.

Niveles reducidos de insulina en sangre en ayunas en ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE

La señalización de insulina regula la glucosa hepática y el metabolismo de lípidos (Leavens u Birnbaum, Crit Rev Biochem Mol Biol 46:200-215, 2011). Después de 24 horas de ayuno, los niveles de insulina en sangre en ratones de 70-90 semanas de edad de tipo salvaje ($n = 20$) y $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE ($n = 20$) fueron $1,84 \pm 0,29$ y $0,56 \pm 0,09$ ng/ml, respectivamente (Figura 5A). Ambos estaban dentro del intervalo normal (de Luca et al., J Clin Invest 115:3484-3493, 2005), aunque los niveles de insulina en sangre en ayunas en los ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE se encontraban más cerca de los valores normales promedio (de Luca et al., J Clin Invest 115:3484-3493, 2005). Si bien los niveles de insulina en sangre en ayunas en ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE no se correlacionaron con la G6Pasa- α hepática restaurada, los niveles de insulina en los ratones $G6pc^{-/-}$ de tipo salvaje y tratados presentaron una relación lineal con respecto a su peso corporal (Figura 5A).

El efecto de transcripción de la insulina está mediado por la proteína de unión del elemento regulador de esteroides-1c (SREBP-1c) (Leavens y Birnbaum, Crit Rev Biochem Mol Biol 46:200-215, 2011). El análisis cuantitativo de RT-PCR demostró que los niveles similares de las transcripciones hepáticas de SREBP-1c se expresaron en los ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE y de control en ayuno de 24 horas (Figura 5B). La glucocinasa es un sensor de glucosa (Massa et al., IUBMB Life 63:1-6, 2011). La actividad hepática de glucocinasa disminuye cuando los niveles de insulina en sangre son bajos, tal como en el caso de ayuno (Massa et al., IUBMB Life 63:1-6, 2011). Como se observa en los ratones de tipo salvaje, después de 24 horas de ayuno, las transcripciones hepáticas de glucocinasa en ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE fueron significativamente inferiores que las de los compañeros de camada de control (Figura 5C). De forma interesante, los niveles de ARNm de glucocinasa hepática y de insulina en sangre en ayunas presentaron una relación lineal tanto en los ratones de tipo salvaje como en los ratones $G6pc^{-/-}$ tratados con AAV-GPE (Figura 5C).

Homeostasis de glucosa en el hígado de ratones $G6pc^{-/-}$ con infusión de AAV-GPE

Durante el ayuno, la homeostasis de glucosa en sangre se mantiene por glucosa endógena producida en el hígado a partir de hidrólisis de G6P mediante el complejo de G6Pasa- α /G6PT en la etapa terminal de la gluconeogénesis y glucogenólisis (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010). Los ratones $G6pc^{-/-}$, que carecen de una G6Pasa- α funcional, son incapaces de producir glucosa endógena en el hígado, riñón o intestino. Después de 24 horas de ayuno, los niveles de glucosa libre hepáticos en ratones de tipo salvaje ($n = 20$) fueron 389 ± 17 nmol/mg de proteína y en ratones AAV-L ($n = 6$), AAV-M ($n = 9$), y AAV-H ($n = 5$) fueron del 61%, 68% y 90%, respectivamente, de aquellos en los ratones de tipo salvaje. Los niveles intracelulares de G6P en los hígados de AAV-M y AAV-L en ayunas fueron de 2,9 y 1,6 veces, respectivamente más altos que los hígados de tipo salvaje, pero los niveles intracelulares de G6P en los hígados de AAV-H en ayunas fueron estadísticamente similares a los de los hígados de tipo salvaje.

La G6P hepática participa en varias vías metabólicas, incluyendo la síntesis de glucógeno, la glucólisis, la vía pentosa-fosfato, en la producción de citoplasma y glucosa endógena en el lumen del RE. Se examinó la expresión hepática de varias enzimas clave implicadas en las vías antes mencionadas en ratones después de un ayuno de 24 horas. Estas incluyen la fosfoenolpiruvato carboxilasa citosólica (PEPCK-C) que cataliza la primera etapa comprometida en la gluconeogénesis hepática (Hanson y Reshef, Biochimie 85:1199-1205, 2003); fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa-1) que convierte la fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato (Hers, J Inherit Metab Dis 13:395-410, 1990); fosfoglucomutasa (PGMasa) que cataliza la conversión reversible de glucosa-6-P y glucosa-1-P en la síntesis de glucogenólisis y glucógeno (Hers, J Inherit Metab Dis 13:395-410, 1990); fosfofructocinasa-1 (PFK-1) que cataliza la etapa irreversible limitante de velocidad en la glucólisis mediante la conversión de fructosa-6-P en fructosa-1,6-difosfato (Hers, J Inherit Metab Dis 13:395-410, 1990); G6P deshidrogenasa (G6PDH) que cataliza la primera reacción en la vía pentosa-fosfato mediante la conversión de G6P en 6-fosfogluconolactona (Wamelink et al., J Inherit Metab Dis 31:703-717, 2008); y G6PT que transporta la G6P citoplasmática al lumen del RE (Chou et al., Nat Rev Endocrinol 6:676-688, 2010).

El análisis cuantitativo de RT-PCR en tiempo real mostró que en los hígados de ayuno, las transcripciones de PEPCK-C y PGMasa se mantuvieron sin cambios, mientras que las transcripciones de FBPasa-1 se aumentaron en los ratones *G6pc^{-/-}* tratados con AAV-GPE, en comparación con los controles. Tanto las transcripciones de PFK-1 como G6PDH en hígados AAL-L se aumentaron, aunque en los hígados AAV-M y AAV-H todavía fueron estadísticamente similares a las de los hígados de tipo salvaje. Los niveles hepáticos de ARNm de G6PT en los ratones *G6pc^{-/-}* tratados con AAV-GPE fueron 2,2 veces mayores que los controles de tipo salvaje, independientemente de los niveles de actividad hepática de G6Pasa- α restaurada. La actividad hepática de captación de G6P microsomal mediada por G6PT es el limitante de velocidad en la producción de glucosa endógena (Arion et al., J Biol Chem 251:6784-690, 1976), pero es co-dependiente de la actividad de G6Pasa- α (Lei et al., Nat Genet 13: 203-209, 1996). Los microsomas hepáticos preparados a partir de ratones *G6pc^{-/-}*, con un G6PT intacto, mostraron actividad de captación de G6P notablemente menor en comparación con los microsomas hepáticos de tipo salvaje (Lei et al., Nat Genet 13: 203-209, 1996), que pueden invertirse si se restaura la actividad de G6Pasa- α a través de la transferencia de genes (Zingone et al., J Biol Chem 275:828-832, 2000). En hígados AAV-L, AAV-M, y AAV-H, las actividades de captación de G6P microsomales fueron del 43%, 50% y del 72%, respectivamente de la actividad de tipo salvaje, lo que refleja el aumento de la actividad hepática de G6Pasa- α (Figura 2A), en paralelo a los niveles hepáticos de glucosa libre.

Ausencia de respuesta inmune contra G6Pasa- α humana

Con el fin de determinar si se genera una respuesta humoral dirigida contra G6Pasa- α humana en los ratones infundidos, se realizó un análisis de transferencia Western usando los sueros obtenidos de los ratones *G6pc^{-/-}* tratados con AAV-GPE y de 70-90 semanas de edad. Se utilizó un anticuerpo monoclonal contra G6Pasa- α humana que también reconoce G6Pasa- α murina (Yiu et al., Mol Ther 18:1076-1084, 2010) como control positivo. No se detectaron anticuerpos dirigidos contra G6Pasa- α en ninguno de los ratones de control de tipo salvaje o *G6pc^{-/-}* con infusión de AAV-GPE que vivieron hasta las 70 a 90 semanas de edad.

Ejemplo 3: Los elementos potenciadores aguas arriba del promotor *G6PC* son importantes para la expresión óptima de *G6PC* en la enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo Ia

Este ejemplo describe estudios para evaluar además la eficacia del vector de AAV-GPE. El AAV-GPE, que es un vector monocatenario que comprende 2684 pb del promotor/potenciador de *G6PC*, se comparó con el AAV-miGPE, un vector bicatenario con contenía un promotor/potenciador de *G6PC* mínimo de 382 pb. Los resultados descritos en este ejemplo muestran que el vector de AAV-GPE se dirigió a niveles significativamente más altos de expresión hepática de G6Pasa- α , logrando una mayor reducción de acumulación hepática de glucógeno y dando lugar a una mejor tolerancia de ayuno en ratones con GSD-Ia que el vector de AAV-miGPE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Infusión de ratones *G6pc^{-/-}* con vectores de rAAV

Todos los ratones de *G6pc^{-/-}* se mantuvieron vivos con terapia de glucosa (Lei et al., Nat. Genet. 13:203-209, 1996). Los vectores de rAAV se infundieron en ratones de 2 semanas de edad *G6pc^{-/-}* a través del seno retro-orbital. Se usaron ratones *G6pc^{+/-}/G6pc^{+/-}* emparejados por edad como controles. Para ratones infundidos con el vector de rAAV, la terapia de glucosa se terminó inmediatamente después de la infusión. Todas las transducciones virales se realizaron en ratones *G6pc^{-/-}* de 2 semanas de edad y la eficacia se evaluó a la edad de 12 semanas.

Ensayos de fosfohidrolasa

Los ensayos del aislamiento de microsomas y de fosfohidrolasa se determinaron esencialmente como se ha descrito previamente (Lei et al., Nat. Genet. 13:203-209, 1996). Para los ensayos de fosfohidrolasa, las mezclas de reacción (100 μ l) contenían tampón de cacodilato 50 mM, a pH 6,5, G6P de 10 mM y se incubaron cantidades apropiadas de preparaciones microsomales a 30°C durante 10 minutos. Se prepararon membranas microsomales interrumpidas mediante incubación de membranas intactas en desoxicolato al 0,2% durante 20 minutos a 0 °C. Se estimó actividad de fosfatasa no específica mediante pre-incubación de preparaciones microsomales interrumpidas a pH 5 durante 10 minutos a 37 °C, para inactivar la G6Pasa- α lábil de ácido.

Cuantificación del ADN y ARNm de vector

El ADN total de tejidos de ratón se aisló usando los kits GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep (Sigma-

Aldrich, St Louis, MO) y se aislaron ARN totales de tejidos de ratón usando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se cuantificaron los números del genoma del vector y la expresión de ARNm por PCR y RT-PCR en tiempo real, respectivamente en un sistema de PCR de tiempo real Applied Biosystems 7300 usando sondas TaqMan de Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los números del genoma del vector del gen de *G6PC* humano se normalizaron a β -actina de ratón usando conjuntos de sondas TaqMan Hs00609178_m1 para *G6PC* y Mm00607939_s1 para β -actina. El plásmido ADN correspondiente a 0,01 a 100 copias del gen *G6PC* humano se usó en una curva estándar. Para determinar el número de copias del genoma del vector, los valores de Ct de la muestra se compararon con la curva estándar. La expresión de ARNm *G6PC* se normalizó a ARN Rp119 usando conjuntos de sonda TaqMan® Hs00609178_m1 para *G6PC* y Mm02601633_g1 para Rp119.

10

Análisis fenotípico

Se analizó la glucosa en sangre usando kits obtenidos de Thermo Electron (Louisville, CO). Se midió el contenido hepático de glucógeno y triglicéridos de la manera en que se ha descrito previamente (véanse los Ejemplos 1 y 2, y Yiu et al., Mol. Ther. 18:1076-1084, 2010; Lee et al., Hepatology 56:1719-1729, 2012). Para determinar los triglicéridos hepáticos, se homogeneizaron tejidos del hígado en tampón RIPA (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, Na-desoxicolato al 0,5% y SDS al 0,1%) (Thermo Scientific, Rockford, IL) y se midieron los triglicéridos usando un kit de Sigma Diagnostics (St Louis, MO).

20 Las pruebas de tolerancia a la glucosa de ratones consistían en ayuno durante 6 horas, antes de la toma de muestras de sangre, seguido de inyección intraperitoneal de una solución de glucosa a un peso corporal de 2 mg/g, y se repite la toma de muestras de sangre a través de la vena de la cola durante 2 horas.

Análisis estadístico

25

La prueba t no pareada se realizó utilizando el programa GraphPad Prism®, versión 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Los valores se consideraron estadísticamente significativos en $p < 0,05$.

RESULTADOS

30

Expresión de G6Pasa- α hepática en ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV-GPE o rAAV-miGPE

Se realizaron estudios para examinar la eficacia de los vectores de rAAV-GPE (véase el Ejemplo 1 y Yiu et al., Mol. Ther. 18:1076-1084, 2010) y rAAV-miGPE (Koeberl et al., Mol. Ther. 16:665-672, 2008) en el tratamiento de ratones *G6pc*^{-/-} durante 12 semanas. Se usó cada vector en dos dosis, 1×10^{13} partículas virales (vp)/kg (dosis alta) y 2×10^{12} vp/kg (dosis baja) con 6 ratones por grupo, en dos centros de investigación diferentes. Se obtuvieron resultados similares de ambos centros. Mientras que la actividad hepática de G6Pasa- α en los ratones *G6pc*^{-/-} transducidos representa los datos combinados de los dos centros, otros datos indicados se registran a partir de un solo estudio. Los estudios han demostrado que la eficacia y persistencia de la transferencia génica hepática mediada por rAAV es más baja durante el desarrollo temprano debido a la rápida velocidad de proliferación hepatocelular asociada con el crecimiento del hígado, lo que diluye el número de células infectadas eficazmente con rAAV (Yiu et al., Mol. Ther. 18:1076-1084, 2010; Cunningham, Mol. Ther. 16:1081-1088, 2008). En este estudio, los vectores de rAAV se administraron a ratones *G6pc*^{-/-} de 2 semanas de edad, momento en el que la proliferación hepatocelular se mantiene alta. En consecuencia, la expresión hepática de G6Pasa- α examinada a las 12 semanas de edad es significativamente menor que la que se observa en ratones adultos con infusión de la misma dosis del vector. Aún no se ha establecido el mejor momento de intervención en la enfermedad humana.

Todo los ratones *G6pc*^{-/-} tratados sobrevivieron a las 12 semanas de edad, sin muertes prematuras en ninguno de los centros. En el hígado de ratones de tipo salvaje de 12 semanas de edad, la actividad microsomal de G6Pasa- α fue de $203,5 \pm 10,3$ nmol/min/mg ($n = 24$). Los datos combinados ($n = 12$ por tratamiento), determinados de manera independiente en los dos centros, mostraron que a las 12 semanas de edad, la terapia de rAAV-GPE de dosis alta reconstituyó aproximadamente el 18% de actividad hepática de G6Pasa- α de tipo salvaje que tenía 3,5 veces mayor actividad que rAAV-miGPE, mientras que la terapia de rAAV-GPE de dosis baja produjo más de 3,6 veces mayor actividad que rAAV-miGPE (Figura 6A). La actividad hepática de G6Pasa- α aumentó linealmente con el número hepático de copias del genoma del vector, y el número de copias en ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV-GPE ($n = 6$) fueron significativamente más altos que en los ratones tratados con rAAV-miGPE ($n = 6$) (Figura 6A).

Perfiles metabólicos de ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV-GPE o rAAV-miGPE

- Todos los ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV-GPE y rAAV-miGPE presentaron curvas de crecimiento paralelas a sus compañeros de camada de tipo salvaje, aunque a pesos más bajos (Figura 6B). Los valores del índice de masa corporal (IMC) de los ratones tratados no se pudieron distinguir de los de los ratones de tipo salvaje, independientemente del vector o el nivel de dosis (Figura 6C). Todo los ratones *G6pc*^{-/-} tenían niveles de glucosa en sangre consistentemente más bajos que los controles de tipo salvaje, pero todavía por encima del extremo inferior del intervalo normal (Figura 6D), 6D), y ninguno de los animales infundidos sufrió los ataques hipoglucémicos frecuentes típicos de la GSD-1a (Chou et al., Curr. Mol. Med. 2:121-143, 2002; Chou et al., Nat. Rev. Endocrinol. 6: 676-688, 2010; Lee et al., Hepatology 56:1719-1729, 2012).
- 10 El peso relativo del hígado con respecto al cuerpo, una medida de glucógeno hepático y/o acumulación de grasa neutra (Chou et al., Curr. Mol. Med. 2:121-143, 2002; Chou et al., Nat. Rev. Endocrinol. 6: 676-688, 2010), fue mayor en los 4 grupos de ratones *G6pc*^{-/-} tratados que el de los ratones de tipo salvaje, aunque los ratones tratados con rAAV-GPE de dosis alta estuvieron significativamente más cerca al normal que el de los otros grupos (Figura 7A). De acuerdo con esto, el contenido de glucógeno en ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV-GPE y rAAV-miGPE fueron notablemente más altos que los de sus controles de tipo salvaje (Figura 7B) con las dosis más altas de vectores que disminuían el glucógeno mejor que las dosis más bajas de vectores, lo que demuestra que al restaurar una mayor expresión hepática de G6Pasa- α mejora la hepatomegalia. Sin embargo, al comparar sólo terapias de dosis altas, los ratones tratados con rAAV-miGPE tenían un 43% más de glucógeno que los ratones tratados con rAAV-GPE. A pesar de la elevación continua en el glucógeno hepático, no se observaron anomalías histológicas en las secciones de tejido hepático de cualquiera de los ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV a las 12 semanas de edad. Con la excepción de los ratones tratados con rAAV-miGPE a una dosis baja, el contenido hepático de triglicéridos no fue estadísticamente diferente entre el tipo salvaje y los otros 3 grupos de ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV (Figura 7C).
- 25 **Perfiles de glucosa en ayunas y de tolerancia a la glucosa en ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV-GPE o rAAV-miGPE**
- Para ratones de tipo salvaje (n = 24), el nivel medio de glucosa en sangre antes de ayuno fue de 172,2 \pm 2,6 mg/dl (tiempo cero), el cual se redujo a 134,6 \pm 3,8 mg/dl después de 8 horas de ayuno (Figura 8A). Los perfiles de glucosa en sangre en ayunas de ratones de terapia de dosis alta (n = 6 por tratamiento) fueron significativamente mejores que los ratones de terapia de dosis baja (n = 6 por tratamiento), sin embargo, incluso a dosis altas, los ratones tratados con rAAV-GPE sostuvieron niveles de glucosa significativamente más altos que se estabilizaron a niveles de tipo salvaje 6 horas en el ayuno, mientras que los ratones tratados con rAAV-miGPE mostraron mucho se estabilizaron mucho menos del 60% de niveles de tipo salvaje (Figura 8A). Los ratones tratados con rAAV-GPE y rAAV-miGPE de dosis alta también podrían mantener un ayuno de 24 horas, pero los niveles de glucosa en sangre en ayunas fueron significativamente mayores en ratones tratados con rAAV-GPE que en ratones tratados con rAAV-miGPE (Figura 8B). En resumen, los ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV-GPE estaban más cerca del tipo salvaje y fueron más capaces de tolerar el ayuno que los ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV-miGPE.
- 40 Se controlaron los perfiles de tolerancia a la glucosa en sangre de los ratones *G6pc*^{-/-} tratados (n = 6 por tratamiento) después de una inyección de glucosa intraperitoneal. En general, los perfiles paralelos a los de los ratones de tipo salvaje (Figura 8C) con los ratones tratados en dosis alta respondieron mejor que los ratones tratados de dosis baja.
- 45 La bio-distribución del transgén de *G6PC* humano en hígado, riñón, intestino, cerebro, testículos y ovarios en ratones *G6pc*^{-/-} tratados con rAAV-GPE de dosis alta de 12 semanas de edad se analizó mediante PCR cuantitativo (Tabla 1). En el hígado transducido, el número de copias del genoma del vector/ μ g de ADN fue de 94,440 \pm 7,624 (o 0,51 \pm 0,04 copias del vector/genoma diploide). En el riñón e intestino transducido, los números eran drásticamente inferiores, con un promedio solo del 2,57% y el 0,64%, respectivamente del número de copias del hígado, lo que muestra que el virus de rAAV8 no transdujo el riñón y el intestino de manera eficiente. El número de copias del genoma/ μ g de ADN en el cerebro y testículos fue incluso inferior al 0,12% y 0,02%, respectivamente del número de copias del hígado. Sólo los niveles de fondo de los genomas de *G6PC* humana se detectaron en el ovario.
- 55 El vector de rAAV-GPE contiene un elemento promotor/potenciador de tejido específico expresado principalmente en el hígado, los túbulos proximales en el riñón y el intestino (Chou et al., Curr. Mol. Med. 2:121-143, 2002; Chou et al., Nat. Rev. Endocrinol. 6: 676-688, 2010). El análisis cuantitativo de RT-PCR en tiempo real de las transcripciones humanas de *G6PC* mostró una correlación entre el número de copias del genoma y la expresión génica (Tabla 3). En el hígado, los niveles del ARNm de *G6PC* humana en relación con la transcripción de Rpl 19 fue de 0,62740 \pm 0,04445. Como era de esperar a partir del análisis de copias del genoma, el riñón expresó sólo 0,03% del ARNm

hepático de G6PC humana y sólo los niveles de fondo del ARNm de G6PC humana se detectaron en el intestino, cerebro, testículos y ovario.

Tabla 3. Distribución del genoma humano de G6PC y expresión de ARNm en ratones G6pc^{-/-} de 12 semanas de edad tratados con rAAV-GPE en dosis alta

Tejido	Número de copias de G6PC humana/ μ g de ADN genómico	ARNm de G6PC humano relativo a ARNm de Rpl19 x 10 ⁵
Tejidos de tipo salvaje, sin transgén (n = 6)	8 \pm 2	8 \pm 1
Hígado, -/-rAAV-GPE (n = 6)	94.440 \pm 7.624 (100)	62740 \pm 4445 (100)
Riñón, -/-rAAV-GPE (n = 6)	2.429 \pm 626 (2,57)	22 \pm 5 (0,033)
Intestino, -/-rAAV-GPE (n = 6)	601 \pm 124 (0,64)	9 \pm 1
Cerebro, -/-rAAV-GPE (n = 6)	121 \pm 23 (0,12)	8 \pm 1
Testículos, -/-rAAV-GPE (n = 6)	25 \pm 8 (0,02)	9 \pm 1
Ovario, -/-rAAV-GPE (n = 6)	7 \pm 2	9 \pm 1

Los datos son medias \pm SEM. Los valores de los tejidos de tipo salvaje, que no contienen transgén, eran la media \pm SEM de hígado, riñón, intestino, cerebro, testículos y ovario. Los números entre paréntesis son el % del valor del hígado.

Ejemplo 4: Comparación de vectores de AAV con y sin secuencias de relleno

Este ejemplo describe el hallazgo de que la secuencia de relleno de nucleótidos que flanquea el intrón en vectores de AAV que expresan G6Pasa- α es importante para la transducción hepática eficiente.

Para evaluar la contribución de la secuencia de relleno a la administración de transgén y la expresión hepática de G6Pasa- α , se construyó el plásmido UF11-K29-G6PC. UF11-K29-G6PC (SEQ ID NO: 2) difiere de UF11-GPE-G6PC (SEQ ID NO: 1) en que carece de la secuencia de relleno alrededor del intrón. El promotor/potenciador de G6PC (GPE) y las secuencias codificantes de G6PC son idénticos en cada plásmido.

A los ratones G6pc^{-/-} se les administró 1 x 10¹³ vp/kg de AAV-K29-G6PC recombinante o AAV-GPE-G6PC recombinante. Los resultados indicaron que el AAV-K29-G6PC presentó una eficiencia de transducción hepática notablemente reducida en ratones con GSD-Ia, en comparación con AAV-GPE-G6PC. Las actividades de G6Pasa en hígado traducido con AAV-K29-G6PC y AAV-GPE-G6PC eran de 7,3 y 33,0 nmol/min/mg, respectivamente. Estos resultados demuestran que la secuencia de relleno que flanquea el intrón es importante para una transducción hepática eficiente.

Ejemplo 5: Generación de un vector de AAV que codifica G6PC optimizada por codones

Este ejemplo describe la construcción y la caracterización de un vector de AAV que contiene G6PC optimizada por codones.

El plásmido UF11-GPE-co-G6PC (que comprende G6PC optimizada por codones; SEQ ID NO: 3) se derivó del plásmido UF11-GPE-G6PC (SEQ ID NO: 1), pero la secuencia codificante de G6Pasa de tipo salvaje en AAV-GPE-G6PC se reemplazó con una G6Pasa optimizada por codones sintética (nucleótidos 3368-4441 de SEQ ID NO: 3).

Los ensayos transitorios de expresión *in vitro* mostraron que la co-G6Pasa presentó una actividad enzimática 1,9 veces más alta que la G6Pasa humana de tipo salvaje. Además, se evaluaron dos lotes de AAV-GPE-CO-G6PC recombinante para la determinar la actividad *in vivo* y se comparó con la actividad del AAV-GPE-G6PC recombinante en ratones con GSD-Ia. El primer lote de AAV-GPE-co-G6PC fue un 50% más eficiente que el AAV-GPE-G6PC en la transducción del hígado que el AAV-GPE-G6PC. El segundo lote de AAV-GPE-co-G6PC fue 2,5 veces más eficiente en la transducción del hígado que el AAV-GPE-G6PC recombinante.

Estos resultados demuestran que la optimización por codones de G6PC aumenta la capacidad de transducción del hígado del AAV recombinante que expresa G6Pasa- α .

Ejemplo 6: Evaluación de la eficacia de un vector de AAV recombinante que expresa la G6Pasa humana optimizada por codones

45

El ejemplo describe un estudio para comparar la eficacia de la administración génica mediada por rAAV8-GPE-G6Pasa y rAAV8-GPE-co-G6Pasa en ratones con GSD-Ia.

La eficacia de la administración génica en ratones con GSD-Ia se comparó usando 2-3 lotes independientes de dos
5 vectores de AAV: 1) rAAV8-GPE-G6Pasa (un vector de rAAV8 que expresa G6Pasa- α humana dirigida por el promotor/potenciador de G6PC humana ~3 kb (GPE); y 2) rAAV8-GPE-co-G6Pasa (un vector de rAAV8 que expresa una G6Pasa- α humana (co) optimizada por codones dirigida por el GPE). Los resultados en la Figura 11 muestran que las actividades hepáticas de G6Pasa tanto en los ratones de 4 semanas de edad como en los de 12 semanas de edad con GSD-Ia tratados con rAAV8-GPE-co-hG6Pasa fueron 1,9 veces mayores que las actividades
10 respectivas restauradas por el vector de rAAV8-GPE-G6Pasa.

Todos los ratones con GSD-Ia tratados presentaron perfiles séricos normales de colesterol, triglicéridos, ácido úrico y ácido láctico y los niveles normales de grasa hepática. En ratones con infusión de rAAV, los pesos del hígado se correlacionaron inversamente con la actividad hepática de G6Pasa restaurada. Los ratones tratados con rAAV-GPE-
15 G6Pasa presentaron hepatomegalia significativamente más grave en comparación con los ratones tratados con rAAV-GPE-co-G6Pasa (Figura 12).

Funcionalmente, a las 12 semanas de edad, los ratones con GSD-Ia tratados con rAAV8-GPE-co-G6Pasa mostraron perfiles normales de tolerancia a la glucosa (Figura 13A) y mantuvieron la normoglucemia en un ayuno de 24 horas
20 (Figura 13B).

Ejemplo 7: Tratamiento de GSD-Ia humana usando terapia génica a base de AAV

Este ejemplo describe un método ejemplar para el uso clínico de vectores de AAV que codifican G6PC para el
25 tratamiento de GSD-Ia.

Se selecciona un paciente diagnosticado con GSD-Ia para tratamiento. Típicamente, el paciente tiene al menos 18 años de edad y puede o no haber tenido una exposición previa a la inmunomodulación. Al paciente se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un AAV recombinante que expresa G6PC, tal como AAV-GPE-G6PC o
30 AAV-GPE-co-G6PC, como se describe en el presente documento. El AAV recombinante se puede administrar por vía intravenosa. Una dosis terapéutica apropiada puede seleccionarse por un médico. En algunos casos, la dosis terapéuticamente eficaz está en el intervalo de 1×10^{11} a 1×10^{14} partículas virales (vp)/kg, tal como aproximadamente 1×10^{12} vp/kg. En la mayoría de casos, al paciente se le administra una única dosis. En ausencia de la inmunomodulación, es probable que el paciente sólo tolere una única infusión de rAAV. Si el sujeto tuvo
35 exposición previa a la inmunomodulación, se pueden administrar dos o más dosis. La salud del sujeto se puede controlar en el tiempo para determinar la eficacia del tratamiento.

En vista de las muchas realizaciones posibles a las que se pueden aplicar los principios de la invención descrita, se ha de reconocer que las realizaciones ilustradas son solamente ejemplos preferidos de la invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En su lugar, el alcance de la invención se define por las
40 siguientes reivindicaciones. Por lo tanto, se reclama como invención propia todo lo que se encuentra dentro del alcance de estas reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

45 <110> THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

<120> VECTORES VIRALES ADENO-ASOCIADOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD DE ALMACENAMIENTO DE GLUCÓGENO

50 <130> 4239-91776-02

<150> US 61/908.861

55 <151> 26-11-2013

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 690 643 T3

<210> 1
<211> 7671
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética (plásmido UF11-GPE-G6PC)

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(163)
<223> Repetición terminal invertida

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (182)..(3045)
<223> promotor/potenciador de G6PC

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (3051)..(3184)
<223> Secuencia de relleno

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (3185)..(3321)
<223> Intrón

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (3322)..(3367)
<223> Secuencia de relleno

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (3368)..(4441)
<223> Secuencia codificante de G6PC

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (4674)..(4819)
<223> Repetición terminal invertida

45 <400> 1
gggggggggg ggggggggtt ggccactccc tctctgcgcg ctgctcgct cactgaggcc 60

ES 2 690 643 T3

gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga 120
 gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actagggggt cctagatctg aattcggtag 180
 ccctttgaga atccacgggtg tctcgatgca gtcagctttc taacaagctg gggcctcacc 240
 tgttttccca cggataaaaa cgtgctggag gaagcagaaa ggggctggca ggtggaaga 300
 tgaggaccag ctcatcgtct catgactatg aggttgctct gatccagagg gtccccctgc 360
 ctggtggccc accgccagga agactcccac tgtccctgga tgcccagagt gggatgtcaa 420
 ctccatcact tatcaactcc ttatccatag gggatttctt cctgaggcgt ctcaaaaaac 480
 agggccctcc ccatatgctg accacataat agaaccctc ccaactcaga gaccctggct 540
 gctagctgcc ctggcatgac ccagacagtg gcctttgtat atgttttttag actcaccttg 600
 actcacctct gaccatagaa actctcatcc cagaggtcac tgcaatagtt actccacaac 660
 agaggcttat ctgggtagag ggaggctccc tacctatggc ccagcagccc tgacagtgca 720
 gatcacatat accccacgcc ccagcactgc ctgccacgca tgggcttact ttacaccac 780
 ccacagtcaac caacacatta cctgctctcc aaggtaggc gtggcaggag aagtttgctt 840
 ggaccagcag aaacctgca gtcaaggaca actggagtca gcatgggctg ggtgcgagcc 900
 cttggtgggg tggggaggag actccaggtc atacctcctg gaggatgttt taatcatttc 960
 cagcatggaa tgctgtcaac ttttgccaca gattcattag ctctgagttt cttttttctg 1020
 tccccagcta ccccttacat gtcaatatgg acttaatgat gggaaattca ggcaagtttt 1080
 taaacatttt attccccctg gctcttatcc tcaaaaaatg catgaatttg gaggcagtgg 1140
 ctcatgectg taatcccaat gctttgctag gttgaggcgg gaggatcact tgaagccagg 1200
 aatttgagac cagcctgggc cgcatagtga gaccccgttt ctacaaaaat aaataaataa 1260
 ataataaata atagtgatat gaagcatgat taaatagccc tatttttttaaatgcatgag 1320
 ttcgttacct gattcatcc ctggttcctt tcacagtcct ccgtgacca agtgtaggg 1380
 ttttggctct tctactattht gtaggctgat atatagtata cacacacaca cacacacaca 1440
 tatacacaca cacagtgtat cttgagcttt cttttgtata tctacacaca tatgtataag 1500
 aaagctcaag atatagaagc cttttttcaa aaataactga aagtttcaa ctctttaagt 1560
 ctccagttac cattttgctg gtattcctt ttggaacct acattcatca tattgttgca 1620
 cagtaagact atacattcat tattttgctt aaacgtatga gttaaaacac ttggccaggc 1680
 atggtggttc acacctgtaa tcccagagct ttgggaagcc aagactggca gatctcttga 1740
 gctcaggaat tcaagaccag cctgggcaac atggaaaaac cccatctcta caaaagatag 1800
 aaaaattagc caggcatggg gccgtgtgcc tgtggtccca gctactcagg aggctgaggt 1860
 gggaggatca cattagccca ggaggttgag gctgcagtga gccgtgatta tgccactgca 1920

ES 2 690 643 T3

ctccagcctg ggagacagag tgagaccctg tttcaaaaa aagagagaga aaatttaaaa 1980
aagaaaacia caccaagggc tgtaacttta aggtcattaa atgaattaat cactgcattc 2040
aaaaacgatt actttctggc cctaagagac atgaggccaa taccaggaag ggggttgatc 2100
tcccaaacca gaggcagacc ctagactcta atacagttaa ggaaagacca gcaagatgat 2160
agtccccaat acaatagaag ttactatatt ttatttgttg tttttctttt gttttgtttt 2220
gttttgtttt gttttgtttt agagactggg gtcttgctcg attgcccagg ctgtagtgca 2280
gcggtgggac aatagctcac tgcagactcc aactcctggg ctcaagcaat cctcctgcct 2340
cagcctcctg aatagctggg actacaaggg tacaccatca cacacaccaa aacaattttt 2400
taaatttttg tgtagaacag agggctctgc tttgttgccc aggctggtct ccaactcctg 2460
gcttcaaggg atcctcccac ctgagcctcc caaattgctg ggattacagg tgtgagccac 2520
cacaaccagc cagaacttta ctaattttaa aattaagaac ttaaaacttg aatagctaga 2580
gcaccaagat ttttctttgt ccccaaataa gtgcagttgc aggcataгаа aatctgacat 2640
cttgcaaga atcatcgtgg atgtagactc tgtcctgtgt ctctggcctg gtttcgggga 2700
ccaggagggc agacccttgc actgccaaga agcatgcaa agttaatcat tggcctgct 2760
gagtacatgg ccgatcaggc tgtttttgtg tgcctgtttt tctattttac gtaaatacacc 2820
ctgaacatgt ttgcatcaac ctactggtga tgcacctttg atcaatacat tttagacaaa 2880
cgtgggtttt gagtccaaag atcagggctg ggttgacctg aatactggat acagggcata 2940
taaaacaggg gcaaggcaca gactcatagc agagcaatca ccaccaagcc tggataaact 3000
gcaagggctc tgctgacatc ttcctgaggt gccaaagaaa tgaggtctag agaagcttta 3060
ttgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag tgcttctgac acaacagtct 3120
cgaacttaag ctgcagtgac tctcttaagg tagccttgca gaagttggtc gtgaggcact 3180
gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg 3240
tcgagacaga gaagactcct gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac tgacatccac 3300
tttgctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta aggcctgca 3360
ggccaccatg gaggaaggaa tgaatgttct ccatgacttt gggatccagt caacacatta 3420
cctccagggtg aattaccaag actcccagga ctggttcac tcggtgtccg tgatcgcaga 3480
cctcaggaat gccttctacg tcctcttccc catctggttc catcttcagg aagctgtggg 3540
cattaaactc ctttgggtag ctgtgattgg agactggctc aacctcgtct ttaagtggat 3600
tctctttgga cagcgtccat actggtgggt tttggatact gactactaca gcaacacttc 3660
cgtgccctg ataaagcagt tcctgtaac ctgtgagact ggaccagggg gccctctgg 3720
ccatgccatg ggcacagcag gtgtatacta cgtgatggtc acatctactc tttccatctt 3780
tcagggaaag ataaagccga cctacagatt tcggtgcttg aatgtcattt tgtggttggg 3840

ES 2 690 643 T3

attctgggct gtgcagctga atgtctgtct gtcacgaatc taccttgctg ctcatthttcc 3900
 tcatcaagtt gttgctggag tcctgtcagg cattgctggt gcagaaactt tcagccacat 3960
 ccacagcatc tataatgcc a gcctcaagaa atatthttctc attaccttct tcctgttcag 4020
 cttcgccatc ggatthttatc tgctgtctcaa gggactgggt gtagacctcc tgtggactct 4080
 ggagaaagcc cagaggtggt gcgagcagcc agaatgggtc cacattgaca ccacaccctt 4140
 tgccagcctc ctcaagaacc tgggcacgct ctttgccctg gggctggctc tcaactccag 4200
 catgtacagg gagagctgca aggggaaact cagcaagtgg ctcccattcc gcctcagctc 4260
 tattgtagcc tccctcgtcc tcctgcacgt ctttgactcc ttgaaacccc catcccaagt 4320
 cgagctggtc ttctacgtct tgccttctg caagagtgcg gtagtgcccc tggcatccgt 4380
 cagtgtcatc ccctactgcc tcgcccaggt cctgggccag ccgcacaaga agtcgttgta 4440
 agcggccgcg gggatccaga catgataaga tacattgatg agtttgaca aaccacaact 4500
 agaatgcagt gaaaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttga 4560
 accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgthttcag 4620
 gttcaggggg aggtgtggga ggtthtttag tcgacctgc tggggagaga tctaggaacc 4680
 cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg 4740
 ggcaaagccc gggcgtcggg cgaccttg tgcgccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 4800
 cagagagggga gtggccaacc ccccccccc cccccctgca gccctgcatt aatgaatcgg 4860
 ccaacgcgcg gggagagcg gtttgcgat tgggcgctct tccgcttccct cgctcactga 4920
 ctcgctgcgc tcggctcgttc ggtgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcgtaat 4980
 acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca 5040
 aaaggccag aaccgtaaaa agccgcgctt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 5100
 tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata 5160
 aagataccag gcgthttccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc 5220
 gcttaccgga tacctgtccg cthttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc 5280
 acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgthtcgctcc aagctgggct gtgtgcaaga 5340
 accccccgth cagccccgacc gctgcgcctt atccgtaac tatcgtcttg agtccaacc 5400
 ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcag 5460
 gtatgtaggc ggtgctacag agthcttgaa gtgggtgcct aactacgct aactagaag 5520
 gacagtatth ggtatctcgc ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagthtgtag 5580
 ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt thttthgttt gcaagcagca 5640
 gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctthg atctthttcta cggggtctga 5700

ES 2 690 643 T3

cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 5760
 cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga 5820
 gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 5880
 tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtag tagataacta cgatacggga 5940
 gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcca gaccacgct caccggctcc 6000
 agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtccctgcaac 6060
 tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcgcc 6120
 agttaatagt ttgcgcaacg ttggtgcat tgctacaggc atcgtggtgt cagcctcgtc 6180
 gtttggtatg gcttcattca gctccggctt ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 6240
 catggtgtgc aaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagtt 6300
 ggccgagtg ttactactca tgggtatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 6360
 atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 6420
 tatgcccga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 6480
 cagaacttta aaagtgctca tcattgaaa acgcttctcg gggcgaaaac tctcaaggat 6540
 cttaccgctg ttgagatcca gttcagatga acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 6600
 atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaagcaaa atgccgcaaa 6660
 aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 6720
 ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 6780
 aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tcccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga 6840
 aaccattatt atcatgacat taacctataa aaatagcgt atcacgaggc cctttcgtct 6900
 cgcgcggttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggctac 6960
 agcttgctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt 7020
 tggcgggtgt cgggctggc ttaactatgc ggcacagag cagattgtac tgagagtgca 7080
 ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggaaatt 7140
 gtaaacgtta atattttgtt aaaattcgcg ttaaattttt gttaaatcag ctcatTTTTT 7200
 aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg 7260
 ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaactgga ctccaacgtc 7320
 aaagggcga aaaccgtcta tcaggcgat ggccactac gtgaaccatc accctaataca 7380
 agtttttgg ggtcagagtg ccgtaaagca ctaaactcga accctaaagg gagccccga 7440
 tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaaggaa gaaagcga 7500
 ggagcgggct ctagggcgct ggcaagtga gcggctcagc tgcgcgtaac caccacaccc 7560
 gccgcgctta atgcgcgct acagggcgcg tcgcccatt cgccattcag gctacgcaac 7620
 tgttgggaag ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac gccaggctgc a 7671

<210> 2
 <211> 7505

ES 2 690 643 T3

```

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Construcción sintética (plásmido UF11-K29-G6PC)

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(163)
10 <223> Repetición terminal invertida

<220>
<221> misc_feature
<222> (182)..(3045)
15 <223> promotor/potenciador de G6PC

<220>
<221> misc_feature
<222> (3052)..(3188)
20 <223> Intrón

<220>
<221> misc_feature
<222> (3202)..(4275)
25 <223> Secuencia codificante de G6PC

<220>
<221> misc_feature
<222> (4508)..(4653)
30 <223> Repetición terminal invertida

<400> 2
gggggggggg gggggggggt ggccactccc tctctgcgcg ctgcctcgct cactgaggcc      60
gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttagccggg cggcctcagt gagcgagcga      120
gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actagggggt cctagatctg aattcgggtac      180
ccctttgaga atccacgggtg tctcgatgca gtcagctttc taacaagctg gggcctcacc      240
tgttttccca cggataaaaa cgtgctggag gaagcagaaa ggggctggca ggtggaaga      300
tgaggaccag ctcatcgtct catgactatg aggttgctct gatccagagg gtccccctgc      360
ctggtggccc accgccagga agactcccac tgtccctgga tgcccagagt gggatgtcaa      420
ctccatcact tatcaactcc ttatccatag ggtattctt cctgaggcgt ctcagaaaac      480
agggccctcc ccatatgctg accacataat agaaccctc ccaactcaga gaccctggct      540
gctagctgcc ctggcatgac ccagacagtg gcctttgtat atgttttag actcaccttg      600
actcacctct gaccatagaa actctcatcc cagaggtcac tgcaatagtt actccacaac      660
agaggcttat ctgggtagag ggaggctccc tacctatggc ccagcagccc tgacagtgca      720

```

ES 2 690 643 T3

gatcacatat accccacgcc ccagcactgc ctgccacgca tgggcttact ttacacccac 780
ccacagtcac caacacatta cctgctctcc aaggtaggc gtggcaggag aagtttgctt 840
ggaccagcag aaacatgca gtcaaggaca actggagtca gcatgggctg ggtgagacc 900
cttggtaggg tggggaggag actccaggtc atacctcctg gaggatgttt taatcatttc 960
cagcatggaa tgctgtcaac ttttgccaca gattcattag ctctgagttt ctttttctg 1020
tcccagcta ccccttacct gtcaatatgg acttaatgat gggaaattca ggcaagtttt 1080
taaacatttt attccccctg gctcttatcc tcaaaaaatg catgaatttg gaggcagtgg 1140
ctcatgcctg taatcccaat gctttgctag gttgagggg gaggatcact tgaagccagg 1200
aatttgagac cagcctgggc cgcagtatga gaccccgttt ctacaaaaat aaataaataa 1260
ataataaata atagtatat gaagcatgat taaatagccc tattttttaa aatgcatgag 1320
ttcgttacct gattcattcc ctggttcctt tcacagtcct cctgaccca agtgtaggg 1380
ttttggtctc tctactatth gttagctgat atatagtata cacacacaca cacacacaca 1440
tatacacaca cacagtgtat cttgagcttt cttttgtata tctacacaca tatgtataag 1500
aaagctcaag atatagaagc cctttttcaa aaataactga aagtttcaa ctctttaagt 1560
ctccagttac cattttgctg gtattcttat ttggaacct acattcatca tattgttgca 1620
cagtaagact atacattcat tttttgctt aaacgtatga gttaaaacac ttggccaggc 1680
atggtgggtc acacctgtaa tcccagagct ttgggaagcc aagactggca gatctctga 1740
gctcaggaat tcaagaccag cctgggcaac atggaaaaac cccatctcta caaagatag 1800
aaaaattagc caggcatggt ggcgtgtgcc tgtggtcca gctactcagg aggctgaggt 1860
gggaggatca cattagccca ggaggttgag gctgcagtga gccgtgatta tgccactgca 1920
ctccagcctg ggagacagag tgagaccctg tttcaaaaaa aagagagaga aaatttaaaa 1980
aagaaaaca caccaagggc tgtaacttta aggtcattaa atgaattaat cactgcattc 2040
aaaaacgatt actttctggc octaagagac atgaggccaa taccaggaag ggggttgatc 2100
tccc aaacca gagcagacc ctgactcta atacagttaa ggaaagacca gcaagatgat 2160
agtccc caat acaatagaag ttactatatt ttattgttg ttttctttt gttttgttt 2220
gtttgtttt gttttgttt agagactggg gtcttgctcg attgcccagg ctgtagtgca 2280
gcggtgggac aatagctcac tgcagactcc aactcctggg ctcaagcaat cctcctgcct 2340
cagcctcctg aatagctggg actacaaggg tacaccatca cacacaccaa acaattttt 2400
taaatttttg ttagaaaacg aggtcttgcc tttgttgccc aggctggtct ccaactcctg 2460
gctcaaggg atcctccac ctgagcctcc caaattgctg ggattacagg tgtgagccac 2520
cacaaccagc cagaacttta ctaattttaa aattaagaac ttaaaacttg aatagctaga 2580
gcaccaagat tttctttgt ccccaataa gtgcagttgc aggcataga aatctgacat 2640

ES 2 690 643 T3

ctttgaaga atcatcgtgg atgtagactc tgtcctgtgt ctctggcctg gtttcgggga 2700
 ccaggagggc agacccttgc actgccaaga agcatgccaa agttaatcat tggccctgct 2760
 gagtacatgg ccgatcaggc tgtttttgtg tgcctgtttt tctattttac gtaaatacacc 2820
 ctgaacatgt ttgcatcaac ctactggtga tgcacctttg atcaatacat tttagacaaa 2880
 cgtgggtttt gagtccaaag atcagggctg gggtgacctg aatactggat acagggcata 2940
 taaaacaggg gcaaggcaca gactcatagc agagcaatca ccaccaagcc tggataaact 3000
 gcaagggctc tgctgacatc ttctgaggt gccaaagaaa tgaggtctag taggtaagta 3060
 tcaaggttac aagacaggtt taaggagacc aatagaaact gggcttgcg agacagagaa 3120
 gactcttgcg tttctgatag gcacctattg gtcttactga catccacttt gcctttctct 3180
 ccacaggtcc tgcaggccac catggaggaa ggaatgaatg ttctccatga ctttgggatc 3240
 cagtcaacac attacctcca ggtgaattac caagactccc aggactggtt catcttggtg 3300
 tccgtgatcg cagacctcag gaatgccttc tacgtcctct tccccatctg gttccatctt 3360
 caggaagctg tgggcattaa actcctttgg gtagctgtga ttggagactg gctcaacctc 3420
 gtctttaagt ggattctctt tggacagcgt ccatactggt gggttttgga tactgactac 3480
 tacagcaaca cttccgtgcc cctgataaag cagttccctg taacctgtga gactggacca 3540
 gggagcccct ctggccatgc catgggcaca gcaggtgat actacgtgat ggtcacatct 3600
 actctttcca tctttcaggg aaagataaag ccgacctaca gatttcggtg cttgaatgtc 3660
 attttgggtg tgggattctg ggctgtgcag ctgaatgtct gtctgtcacg aatctacctt 3720
 gctgctcatt ttcctcatca agttgttgcg ggagtcctgt caggcattgc tgttcagaa 3780
 actttcagcc acatccacag catctataat gccagcctca agaaatattt tctcattacc 3840
 ttcttctgt tcaagcttgc catcggattt tatctgtgc tcaagggact ggggtgtagac 3900
 ctctgtgga ctctggagaa agcccagagg tgggtgcgagc agccagaatg ggtccacatt 3960
 gacaccacac cctttgccag ctcctcaag aacctgggca cgctctttgg cctggggctg 4020
 gctctcaact ccagcatgta caggagagc tgcaagggga aactcagcaa gtggctcca 4080
 ttccgcctca gctctattgt agcctcctc gtccctcctg acgtctttga ctcttgaaa 4140
 ccccatccc aagtcgagct ggtcttctac gtcttgcct tctgcaagag tgcggtagt 4200
 cccctggcat ccgtcagtg catcccctac tgcctcgccc aggtcctggg ccagccgcac 4260
 aagaagtcgt tgtaagcggc cgcggggatc cagacatgat aagatacatt gatgagttg 4320
 gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta 4380
 ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc 4440
 atttatggt tcaggttcag ggggaggtgt gggaggtttt ttagtcgacc atgctgggga 4500

ES 2 690 643 T3

gagatctagg aacccttagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgcgc 4560
actgaggccg cccgggcaaa gcccgggctt cgggacacct ttggtcgccc ggccctcagtg 4620
agcgagcgag cgcgcagaga gggagtggcc aacccccccc ccccccccc tgcagccctg 4680
cataatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct 4740
tcctcgcctc ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac 4800
tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga 4860
gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 4920
aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac 4980
ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct 5040
gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg 5100
ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg 5160
ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt 5220
cttgagtcca acccggtgag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 5280
attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggcg gcctaactac 5340
ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 5400
aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg tggttttttt 5460
gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt 5520
tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt aaggatcttt ggtcatgaga 5580
ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc 5640
taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct 5700
atctcagcga tctgtctatt tcggtcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata 5760
actacgatac gggagggctt accatctggc ccagtgctg caatgatacc gcgagacca 5820
cgctcaccgg ctccagatct atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga 5880
agtggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attggtgccc ggaagctaga 5940
gtaagtagtt cggcagttaa tagtttgcgc aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg 6000
gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaagcga 6060
gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt 6120
gtcagaagta agttggccgc agtggtatca ctcatggta tggcagcact gcataattct 6180
cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca 6240
ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat 6300
accgcccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga 6360
aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc 6420

ES 2 690 643 T3

aactgatcctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg 6480
caaaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc 6540
ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt 6600
gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc 6660
cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg 6720
aggccctttc gtctcgcgcg tttcgtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc 6780
ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc 6840
gcgtcagcgg gtgttgccgg gtgtcggggc tggcttaact atgcccgcac agagcagatt 6900
gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac 6960
cgcacagga aattgtaaac gttaatattt tgttaaaatt cgcgttaaat ttttgttaaa 7020
tcagctcatt ttttaaccaa taggccgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat 7080
agaccgagat agggttgagt gttgttccag tttggaacaa gagtccacta ttaaagaacg 7140
tggactocaa cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggcca ctacgtgaac 7200
catcacccca atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaacccca 7260
aaggagccc ccgatttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag 7320
ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg 7380
taaccaccac acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg cgcgtcgcgc cattcgccat 7440
tcaggctacg caactgttg gaagggcgat cgggtcgggc ctcttcgcta ttacgccagg 7500
ctgca 7505

- 5 <210> 3
- <211> 7671
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Construcción sintética (plásmido UF11-GPE-co-G6PC)
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (17)..(163)
- <223> Repetición terminal invertida
- 15 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (182)..(3045)
- <223> promotor/potenciador de G6PC
- 20 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3051)..(3184)
- <223> Secuencia de relleno
- 25 <220>

ES 2 690 643 T3

<221> misc_feature
 <222> (3185)..(3321)
 <223> Intrón

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3322)..(3367)
 <223> Secuencia de relleno

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3368)..(4441)
 <223> Secuencia codificante de G6PC optimizada por codones

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4674)..(4819)
 <223> Repetición terminal invertida

20 <400> 3
 gggggggggg gggggggggt ggccactccc tctctgcgcg ctgcctcgct cactgaggcc 60
 gggcgaccaa aggtcgcccc acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga 120
 gcgcgcagag agggagtggc caactccatc actagggggt cctagatctg aattcggtag 180
 ccctttgaga atccacgggt tctcgatgca gtcagctttc taacaagctg gggcctcacc 240
 tgttttccca cggataaaaa cgtgctggag gaagcagaaa ggggctggca ggtgaaaga 300
 tgaggaccag ctcatcgtct catgactatg aggttgctct gatccagagg gtccccctgc 360
 ctggtggccc accgccagga agactcccac tgtccctgga tgcccagagt gggatgtcaa 420
 ctccatcact tatcaactcc ttatccatag ggttattctt cctgaggcgt ctcaaaaaac 480
 agggccctcc ccatatgctg accacataat agaaccctc ccaactcaga gaccctggct 540
 gctagctgcc ctggcatgac ccagacagtg gcctttgtat atgtttttag actcaccttg 600
 actcacctct gaccatagaa actctcatcc cagaggtcac tgcaatagtt actccacaac 660
 agaggcttat ctgggtagag ggaggctccc tacctatggc ccagcagccc tgacagtgca 720
 gatcacatat accccacgcc ccagcactgc ctgccacgca tgggcttact ttacaccac 780
 ccacagtcc caacacatta cctgctctcc aaggttaggc gtggcaggag aagtttgctt 840
 ggaccagcag aaaccatgca gtcaaggaca actggagtca gcatgggctg ggtgcgagcc 900
 cttggtgggg tggggaggag actccaggtc atacctcctg gaggatgttt taatcatttc 960
 cagcatggaa tgctgtcaac ttttgccaca gattcattag ctctgagttt ctttttctg 1020
 tccccagcta ccccttaccat gtcaatatgg acttaatgat gggaaattca ggcaagtttt 1080
 taaacatttt attccccctg gctcttatcc tcaaaaaatg catgaatttg gaggcagtgg 1140
 ctcatgcctg taatcccaat gctttgctag gttgaggcgg gaggatcact tgaagccagg 1200
 aatttgagac cagcctgggc cgcatagtga gaccocgttt ctacaaaaat aaataaataa 1260

ES 2 690 643 T3

ataataaata atagtgatat gaagcatgat taaatagccc tatttttttaa aatgcatgag 1320
 ttcgttacct gattcatcc ctggttcctt tcacagtcct ccgtgacca agtggttagg 1380
 ttttggctct tctactatct gtaggctgat atatagtata cacacacaca cacacacaca 1440
 tatacacaca cacagtgtat cttgagcttt cttttgtata tctacacaca tatgtataag 1500
 aaagctcaag atataagaag cctttttcaa aaataactga aagtttcaa ctctttaagt 1560
 ctccagttac cattttgctg gtattcctat ttggaacct acattcatca tattgttgca 1620
 cagtaagact atacattcat tattttgctt aaacgtatga gttaaaacac ttggccaggc 1680
 atggtgggtc acacctgtaa tcccagagct ttgggaagcc aagactggca gatctcttga 1740
 gctcaggaat tcaagaccag cctgggcaac atggaaaaac cccatctcta caaaagatag 1800
 aaaaattagc caggcatggt ggcgtgtgcc tgtggtccca gctactcagg aggctgaggt 1860
 gggaggatca cattagccca ggaggttgag gctgcagtga gccgtgatta tgccactgca 1920
 ctccagcctg ggagacagag tgagaccctg tttcaaaaaa aagagagaga aaatttaaaa 1980
 aagaaaacaa caccaagggc tgtaacttta aggtcattaa atgaattaat cactgcattc 2040
 aaaaacgatt actttctggc cctaagagac atgaggccaa taccaggaag ggggttgatc 2100
 tcccaaacca gaggcagacc ctgactccta atacagttaa ggaaagacca gcaagatgat 2160
 agtcccaat acaatagaag ttactatatt ttatttgttg tttttctttt gttttgtttt 2220
 gttttgtttt gttttgtttt agagactggg gtcttgcctg attgccagc ctgtagtgca 2280
 gcggtgggac aatagctcac tgcagactcc aactcctggg ctcaagcaat cctcctgcct 2340
 cagcctcctg aatagctggg actacaaggg tacaccatca cacacaccaa aacaattttt 2400
 taaatttttg tgtagaaaag aggtcttgc tttgttgccc aggctggtct ccaactcctg 2460
 gcttcaaggg atcctcccac ctcagcctcc caaattgctg ggattacag tgtgagccac 2520
 cacaaccagc cagaacttta ctaattttaa aattaagaac ttaaaacttg aatagctaga 2580
 gcaccaagat ttttctttgt ccccaaataa gtgcagttgc aggcattaga aatctgacat 2640
 ctttgaaga atcatcgtg atgtagactc tgtcctgtgt ctctggcctg gtttcgggga 2700
 ccaggagggc agacccttgc actgccaga agcatgcaa agttaatcat tggccctgct 2760
 gagtacatgg ccgatcagc tgtttttgtg tgcctgtttt tctattttac gtaaataacc 2820
 ctgaacatgt ttgcatcaac ctactggtga tgcaccttg atcaatacat tttagacaaa 2880
 cgtggttttt gagtccaaag atcagggctg ggttgacctg aatactggat acagggcata 2940
 taaaacaggg gcaaggcaca gactcatagc agagcaatca ccaccaagcc tggaataact 3000
 gcaagggctc tgctgacatc ttcctgaggt gccaaagaaa tgaggtctag agaagcttta 3060
 ttgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag tgcttctgac acaacagtct 3120

ES 2 690 643 T3

cgaacttaag ctgcagtgac tctcttaagg tagccttgca gaagttggtc gtgaggcact 3180
 gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg 3240
 tcgagacaga gaagactcct gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac tgacatccac 3300
 tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta aggccctgca 3360
 ggccaccatg gaagagggca tgaacgtgct gcacgacttc ggcatccaga gcaccacta 3420
 tctgcaggtc aactaccagg acagccagga ctggttcac ctggtgtccg tgatcgccga 3480
 cctgcgggaa gccttctacg tgctgttccc catctggctc catctgcaag aagccgtcgg 3540
 catcaagctg ctgtgggtgg ccgtgatcgg cgattggctg aacctggtgt tcaagtggat 3600
 cctgttcggc cagcggccct attggtgggt gctggacacc gactactaca gcaacaccag 3660
 cgtgcccctg atcaagcagt tccccgtgac ctgagagaca ggccctggct ctccctctgg 3720
 ccacgccatg ggaacagccg gcgtgtacta cgtgatggtc accagcacc tgagcatctt 3780
 ccagggcaag atcaagccca cctaccggtt ccggtgcctg aacgtgatcc tgtggctggg 3840
 cttctgggcc gtgcagctga acgtgtgcct gagccggatc tacctggccg cccacttccc 3900
 acatcaagtg gtggccggcg tgctgagcgg aatcgccgtg gccgagacat tcagccacat 3960
 ccacagcatc tacaacgcca gcctgaagaa gtacttctctg atcacattct ttctgttcag 4020
 cttcgccatc ggcttctacc tgctgctgaa gggcctgggc gtggacctgc tgtggaccct 4080
 ggaaaaggcc cagcggtggt gcgagcagcc cgagtgggtg cacatcgaca ccacccctt 4140
 cgccagcctg ctgaagaacc tgggcaccct gtttgactg ggccctggcc tgaacagcag 4200
 catgtacaga gagagctgca agggcaagct gagcaagtgg ctgcccttcc ggctgagcag 4260
 catcgtggcc agcctggtgc tgctgcacgt gttcgacagc ctgaagcccc ccagccaggt 4320
 ggaactgggt ttttacgtgc tgagcttctg caagagcggc gtggtgcccc tggcctccgt 4380
 gtctgtgatc ccctactgcc tggctcaggt gctgggcccag cccacaaga agtccctctg 4440
 agcggcccg cggtatccaga catgataaga tacattgatg agtttgaca aaccacaact 4500
 agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttcta 4560
 accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag 4620
 gttcaggggg aggtgtggga ggttttttag togacatgc tggggagaga tctaggaacc 4680
 cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc togctcactg aggccgcccg 4740
 ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttgg togcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 4800
 cagagagggg gtggccaacc ccccccccc cccccctgca gccctgcatt aatgaatcgg 4860
 ccaacgcgcg gggagagggc gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttctt cgctcactga 4920
 ctgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat 4980
 acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca 5040

ES 2 690 643 T3

aaagccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcgttt ttccataggc tccgcccc 5100
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata 5160
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc 5220
gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc 5280
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagt cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga 5340
acccccggt cagcccagcc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc 5400
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 5460
gtatgtaggc ggtgctacag agttctttaa gtgggtgcct aactacggct aactagaag 5520
gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag 5580
ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca 5640
gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 5700
cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 5760
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga 5820
gtaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 5880
tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga 5940
gggcttacca tctggcccc gctgtgcaat gataccgga gaccacgct caccggctcc 6000
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 6060
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 6120
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtgggtg cacgctcgtc 6180
gtttggtagt gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 6240
catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcc atcgttgca gaagtaagtt 6300
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 6360
atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 6420
tatgcggcga ccgagttgct ctgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag 6480
cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttgc gggcgaaaac tctcaaggat 6540
cttaccgctg ttgagatcca gttcagatga acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 6600
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa 6660
aaaggaata agggcgacac gaaatggtg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 6720
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 6780
aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga 6840
aaccattatt atcatgacat taacctataa aatagggct atcacgaggc cctttcgtct 6900

ES 2 690 643 T3

cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac 6960
 agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcggt cagcgggtgt 7020
 tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtga 7080
 ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggaatt 7140
 gtaaactgta atattttgtt aaaattcggc ttaaattttt gttaatcag ctcatttttt 7200
 aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct tataaatcaa aagaatagac cgagataggg 7260
 ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc 7320
 aaaggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat ggcccactac gtgaaccatc accctaatca 7380
 agttttttgg ggtcgaggtg ccgtaaagca ctaaactcga accctaaagg gagccccga 7440
 tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaaa 7500
 ggagcgggcg ctagggcgct ggcaagtgta gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacacc 7560
 gccgcgctta atgcgccgct acagggcgcg tcgcgccatt cgccattcag gctacgcaac 7620
 tgttgggaag ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac gccaggctgc a 7671

<210> 4

<211> 357

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Glu Gly Met Asn Val Leu His Asp Phe Gly Ile Gln Ser Thr
 1 5 10 15

His Tyr Leu Gln Val Asn Tyr Gln Asp Ser Gln Asp Trp Phe Ile Leu
 20 25 30

Val Ser Val Ile Ala Asp Leu Arg Asn Ala Phe Tyr Val Leu Phe Pro
 35 40 45

Ile Trp Phe His Leu Gln Glu Ala Val Gly Ile Lys Leu Leu Trp Val
 50 55 60

Ala Val Ile Gly Asp Trp Leu Asn Leu Val Phe Lys Trp Ile Leu Phe
 65 70 75 80

Gly Gln Arg Pro Tyr Trp Trp Val Leu Asp Thr Asp Tyr Tyr Ser Asn
 85 90 95

Thr Ser Val Pro Leu Ile Lys Gln Phe Pro Val Thr Cys Glu Thr Gly
 100 105 110

Pro Gly Ser Pro Ser Gly His Ala Met Gly Thr Ala Gly Val Tyr Tyr

5

ES 2 690 643 T3

115 120 125

Val Met Val Thr Ser Thr Leu Ser Ile Phe Gln Gly Lys Ile Lys Pro
130 135 140

Thr Tyr Arg Phe Arg Cys Leu Asn Val Ile Leu Trp Leu Gly Phe Trp
145 150 155 160

Ala Val Gln Leu Asn Val Cys Leu Ser Arg Ile Tyr Leu Ala Ala His
165 170 175

Phe Pro His Gln Val Val Ala Gly Val Leu Ser Gly Ile Ala Val Ala
180 185 190

Glu Thr Phe Ser His Ile His Ser Ile Tyr Asn Ala Ser Leu Lys Lys
195 200 205

Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Phe Leu Phe Ser Phe Ala Ile Gly Phe Tyr
210 215 220

Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Val Asp Leu Leu Trp Thr Leu Glu Lys
225 230 235 240

Ala Gln Arg Trp Cys Glu Gln Pro Glu Trp Val His Ile Asp Thr Thr
245 250 255

Pro Phe Ala Ser Leu Leu Lys Asn Leu Gly Thr Leu Phe Gly Leu Gly
260 265 270

Leu Ala Leu Asn Ser Ser Met Tyr Arg Glu Ser Cys Lys Gly Lys Leu
275 280 285

Ser Lys Trp Leu Pro Phe Arg Leu Ser Ser Ile Val Ala Ser Leu Val
290 295 300

Leu Leu His Val Phe Asp Ser Leu Lys Pro Pro Ser Gln Val Glu Leu
305 310 315 320

Val Phe Tyr Val Leu Ser Phe Cys Lys Ser Ala Val Val Pro Leu Ala
325 330 335

Ser Val Ser Val Ile Pro Tyr Cys Leu Ala Gln Val Leu Gly Gln Pro
340 345 350

His Lys Lys Ser Leu
355

<210> 5
<211> 20
<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 5	
	ccttgagaa tccacggtg	20
	<210> 6	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 6	
	cctcattcc ttggcacctc	20
	<210> 7	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 7	
	aggtaagtat caaggtaca	20
30	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Polinucleótido sintético	
	<400> 8	
40	acctgtggag agaaaggcaa	20
	<210> 9	
	<211> 1074	
	<212> ADN	
45	<213> Canis familiaris familiaris	
	<400> 9	
	atggagaaag gaatggatgt gtcctatgac tttggaatcc agtcaacgca ctacctccag	60
	gtgaattacc aggactctca ggattggttc atcttgggtgt ccgtgattgc agacctcagg	120
	aatgccttct atgtcctctt tcccatctgg ttccatctgc gtgaagctgt gggcatcaaa	180
	cttctctggg tagctgtgat tggagactgg ctcaacctcg tctttaaatg gattctgttt	240
	ggacagcgtc cactactggtg ggtcatggac accgactact atagcaacac ctctgtgcca	300

ES 2 690 643 T3

ctgataaagc aatttccagt tacctgtgaa actggaccag ggagtcctc tggatcatgcc 360
atgggtacag caggtgtata ctacgtgatg gtcacatcta ccctttctat ctttcggggg 420
agaaaaaggc caacctacag atttcggtgc ttgaatatcc ttctgtggtt gggattctgg 480
gctgtgcagc tgaacgtctg tctgtcccga atctaccttg ctgctcattt cccccatcag 540
gttgttgctg gagtccctgc aggcatgtct gttgctgaaa ctttccgcca catccagagc 600
atctacaatg ccagcctcaa gaaatatttt ctctactt tcttcctgtt cagttttgcc 660
attggatttt acctgctgct caaggggctg ggtgtggacc tcctgtggac actggaaaaa 720
gccaggagat ggtgtgagcg gccggaatgg gttcacattg acaccacacc ctttgccagc 780
cttctcaaga acgtggggac cctccttggc ctgggggtga ctctcaactc cagcatgtac 840
agggaaagct gcaagggcaa gcttagcaag tggttcccat tccgcctcag ctgcattgtg 900
gtgtctctca tcctcctgca cctccttgac tctttgaaac ccccatccca aactgagctg 960
atcttctaca ccttgcctt ctgcaagagt gcagcagtgc ccctggcatc tgtcagcctc 1020
atcccctact gccttgcccg ggtcttcgac cagccagaca agaagtcttt gtaa 1074

<210> 10

<211> 357

<212> PRT

<213> Canis lupus familiaris

<400> 10

Met Glu Lys Gly Met Asp Val Leu His Asp Phe Gly Ile Gln Ser Thr
1 5 10 15

His Tyr Leu Gln Val Asn Tyr Gln Asp Ser Gln Asp Trp Phe Ile Leu
20 25 30

Val Ser Val Ile Ala Asp Leu Arg Asn Ala Phe Tyr Val Leu Phe Pro
35 40 45

Ile Trp Phe His Leu Arg Glu Ala Val Gly Ile Lys Leu Leu Trp Val
50 55 60

Ala Val Ile Gly Asp Trp Leu Asn Leu Val Phe Lys Trp Ile Leu Phe
65 70 75 80

Gly Gln Arg Pro Tyr Trp Trp Val Met Asp Thr Asp Tyr Tyr Ser Asn
85 90 95

Thr Ser Val Pro Leu Ile Lys Gln Phe Pro Val Thr Cys Glu Thr Gly
100 105 110

5

ES 2 690 643 T3

Pro Gly Ser Pro Ser Gly His Ala Met Gly Thr Ala Gly Val Tyr Tyr
 115 120 125

Val Met Val Thr Ser Thr Leu Ser Ile Phe Arg Gly Arg Lys Arg Pro
 130 135 140

Thr Tyr Arg Phe Arg Cys Leu Asn Ile Leu Leu Trp Leu Gly Phe Trp
 145 150 155 160

Ala Val Gln Leu Asn Val Cys Leu Ser Arg Ile Tyr Leu Ala Ala His
 165 170 175

Phe Pro His Gln Val Val Ala Gly Val Leu Ser Gly Ile Ala Val Ala
 180 185 190

Glu Thr Phe Arg His Ile Gln Ser Ile Tyr Asn Ala Ser Leu Lys Lys
 195 200 205

Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Phe Leu Phe Ser Phe Ala Ile Gly Phe Tyr
 210 215 220

Leu Leu Leu Lys Gly Leu Gly Val Asp Leu Leu Trp Thr Leu Glu Lys
 225 230 235 240

Ala Arg Arg Trp Cys Glu Arg Pro Glu Trp Val His Ile Asp Thr Thr
 245 250 255

Pro Phe Ala Ser Leu Leu Lys Asn Val Gly Thr Leu Phe Gly Leu Gly
 260 265 270

Val Thr Leu Asn Ser Ser Met Tyr Arg Glu Ser Cys Lys Gly Lys Leu
 275 280 285

Ser Lys Trp Phe Pro Phe Arg Leu Ser Cys Ile Val Val Ser Leu Ile
 290 295 300

Leu Leu His Leu Phe Asp Ser Leu Lys Pro Pro Ser Gln Thr Glu Leu
 305 310 315 320

Ile Phe Tyr Thr Leu Ser Phe Cys Lys Ser Ala Ala Val Pro Leu Ala
 325 330 335

Ser Val Ser Leu Ile Pro Tyr Cys Leu Ala Arg Val Phe Asp Gln Pro
 340 345 350

Asp Lys Lys Ser Leu
 355

REIVINDICACIONES

1. Un vector viral adeno-asociado (AAV) que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante, en el que la molécula de ácido nucleico recombinante comprende los nucleótidos 182-4441 de SEQ ID NO: 1 o 5 nucleótidos 182-4441 de SEQ ID NO: 3.
2. El vector de AAV de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico recombinante comprende los nucleótidos 17-4819 de SEQ ID NO: 1 o nucleótidos 17-4819 de SEQ ID NO: 3.
- 10 3. El vector de AAV de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la molécula de ácido nucleico recombinante comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.
4. El vector de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el vector de AAV es un vector de AAV de serotipo 8 (AAV8).
- 15 5. Una célula huésped aislada que comprende el vector de AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un AAV recombinante (rAAV) que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante, en el que el ácido nucleico recombinante comprende los nucleótidos 182-4441 de SEQ ID NO: 1 o nucleótidos 182-4441 de SEQ ID NO: 3.
- 20 7. Un AAV recombinante (rAAV) de la reivindicación 6, en el que el rAAV es rAAV8.
8. Una composición que comprende el rAAV de la reivindicación 6 o 7 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. La composición de la reivindicación 8 formulada para administración intravenosa.
- 30 10. El rAAV de la reivindicación 6 o 7 para su uso en un método para tratar un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, comprendiendo el método seleccionar un sujeto con enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo Ia (GSD-Ia) y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del rAAV.
- 35 11. La composición de la reivindicación 8 o 9 para su uso en un método para tratar un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento de glucógeno, comprendiendo el método seleccionar un sujeto con enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo Ia (GSD-Ia) y administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición.
- 40 12. El rAAV o la composición para el uso de la reivindicación 10 u 11, en el que el rAAV se administra por vía intravenosa.
13. El rAAV o la composición para el uso de la reivindicación 10, 11 o 12, en el que el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{11} a aproximadamente 1×10^{14} partículas virales (vp)/kg.
- 45 14. El rAAV o la composición para el uso de la reivindicación 13, en el que el rAAV se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^{12} a 8×10^{13} vp/kg.
15. El rAAV o la composición para el uso de la reivindicación 13, en el que el rAAV se administra a una 50 dosis de aproximadamente 1×10^{13} a 6×10^{13} vp/kg.
16. El rAAV o la composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-15, en el que la administración de rAAV comprende la administración de una única dosis de rAAV.
- 55 17. El rAAV o la composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10-15, en el que la administración de rAAV comprende la administración de múltiples dosis de rAAV.

FIG. 1A

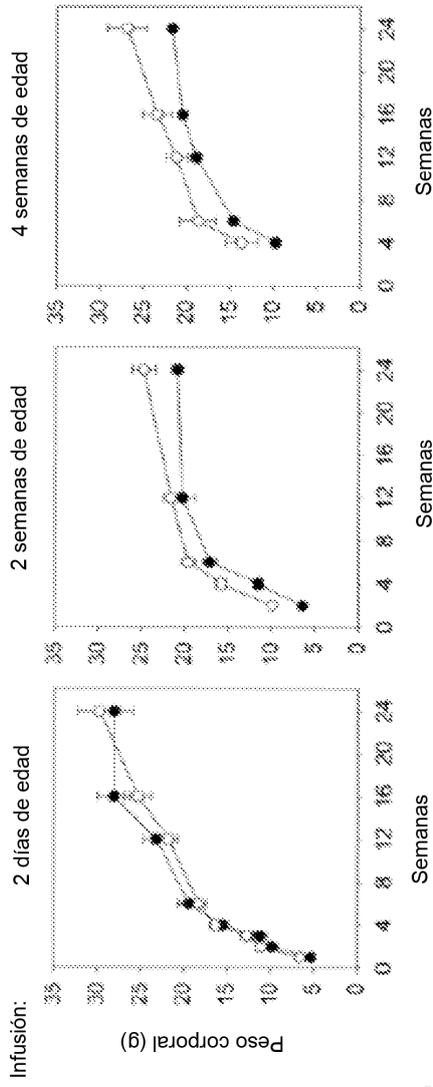


FIG. 1B

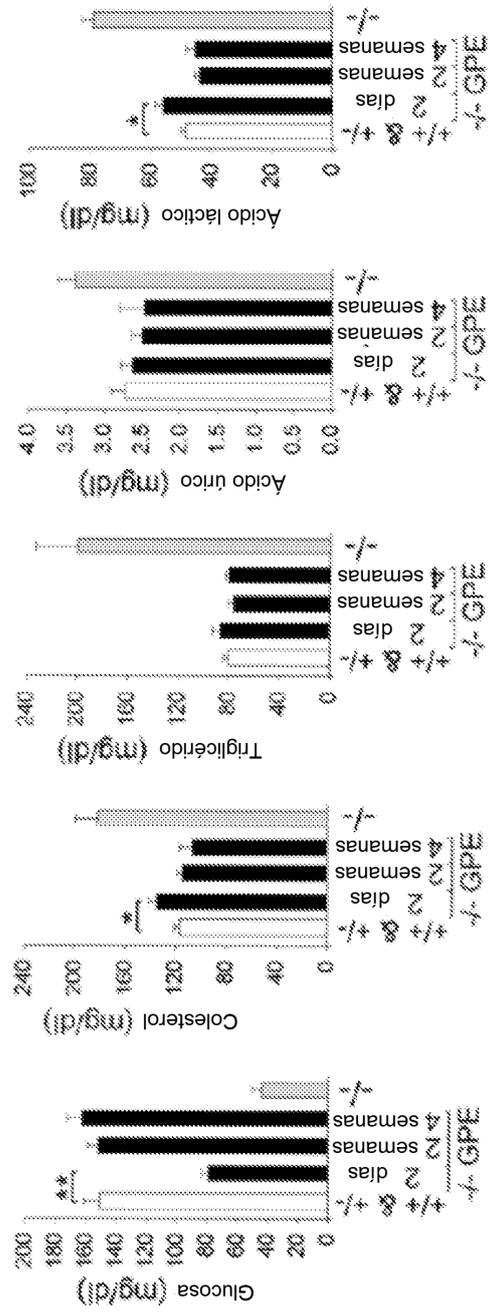


FIG. 2A

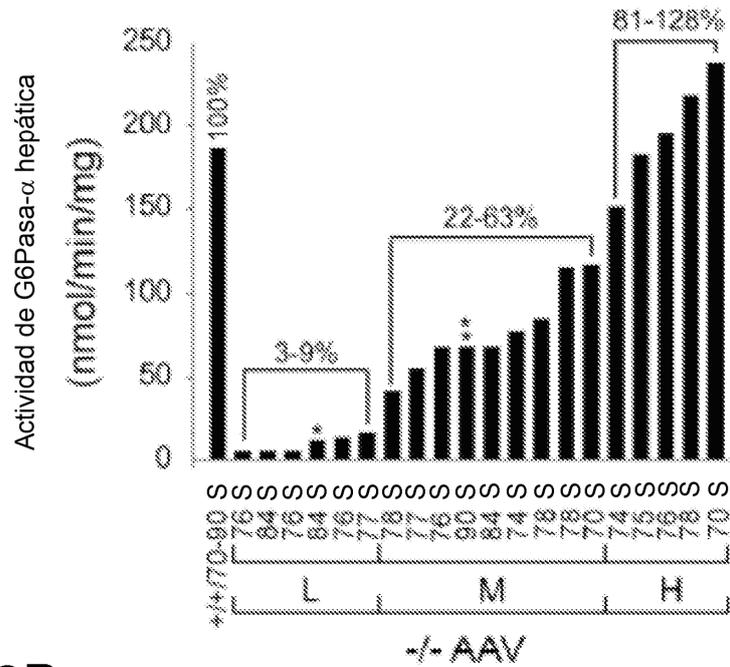


FIG. 2B

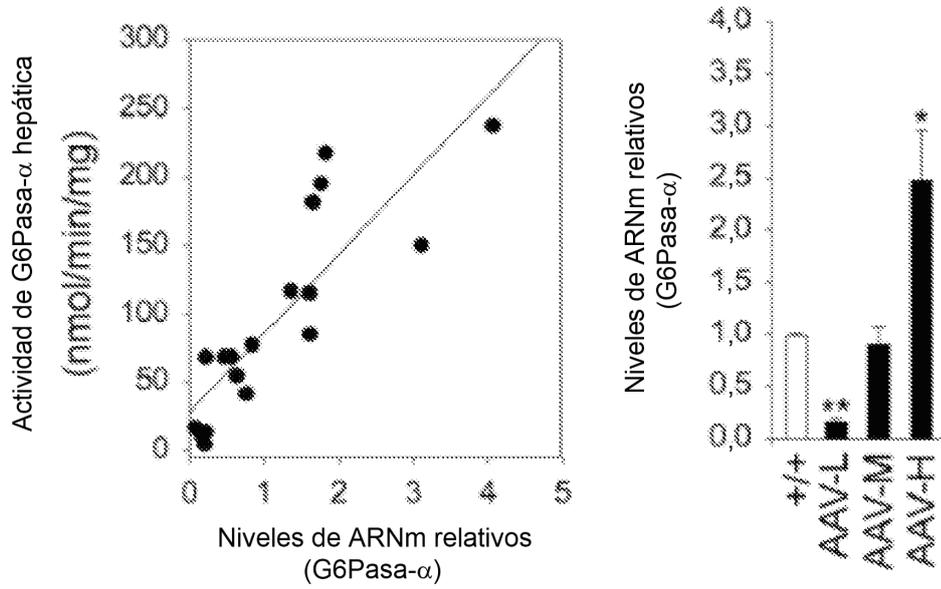


FIG. 3C

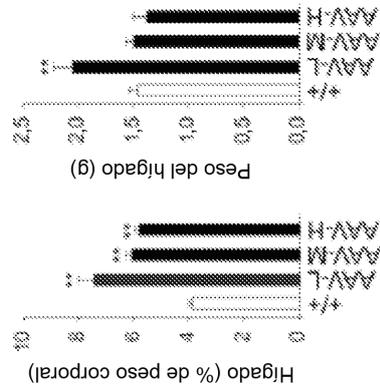


FIG. 3B

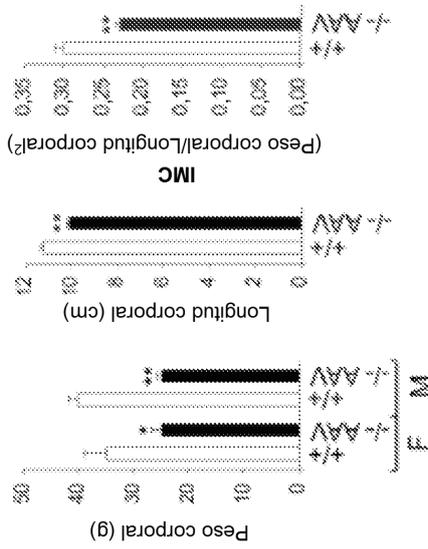


FIG. 3A

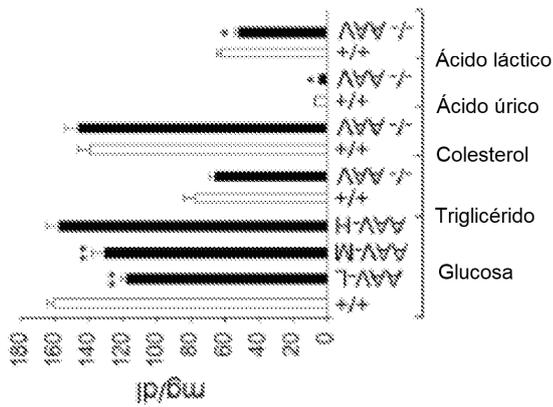


FIG. 4C

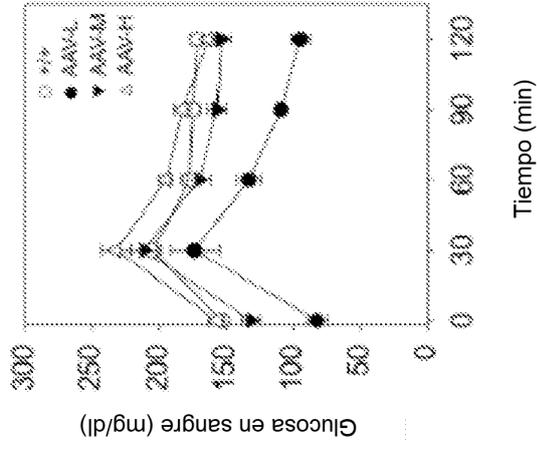


FIG. 4B

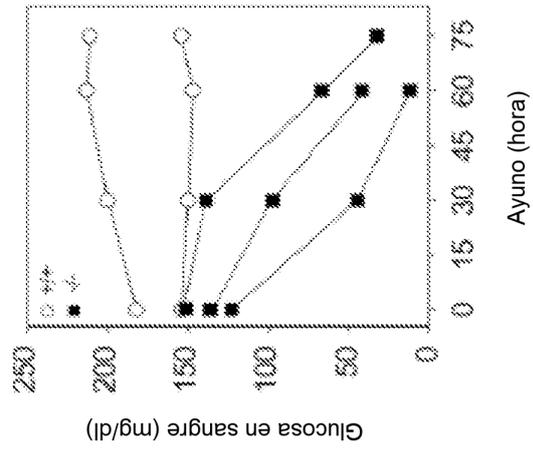


FIG. 4A

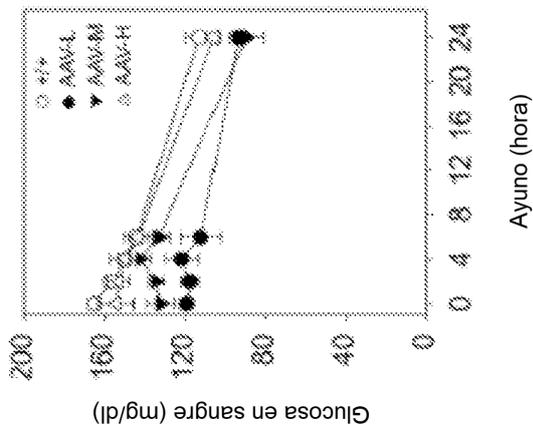


FIG. 5A

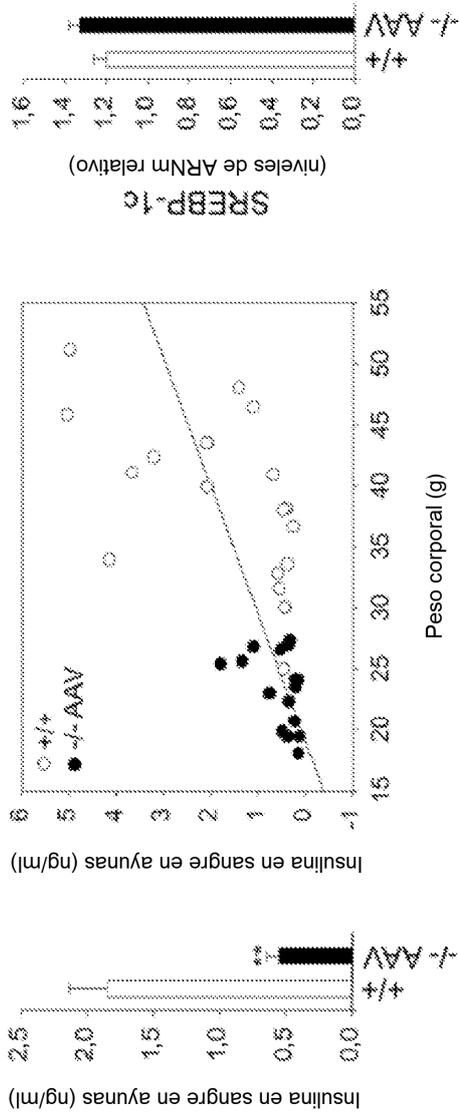


FIG. 5B

FIG. 5C

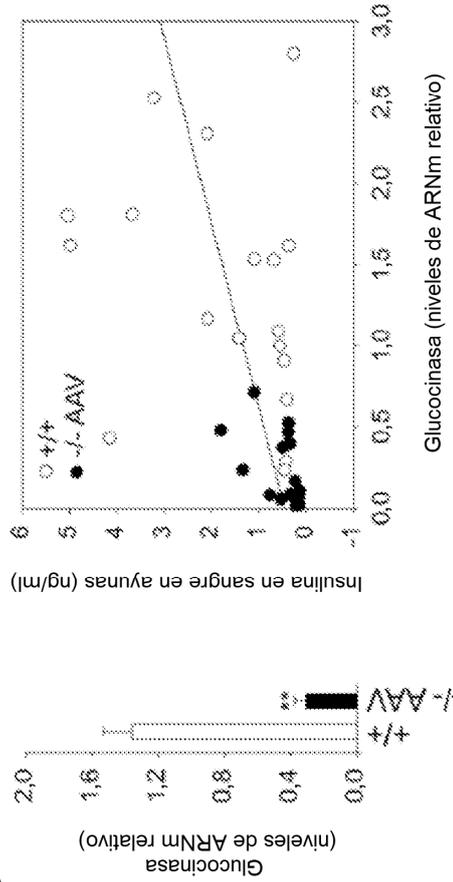


FIG. 6A

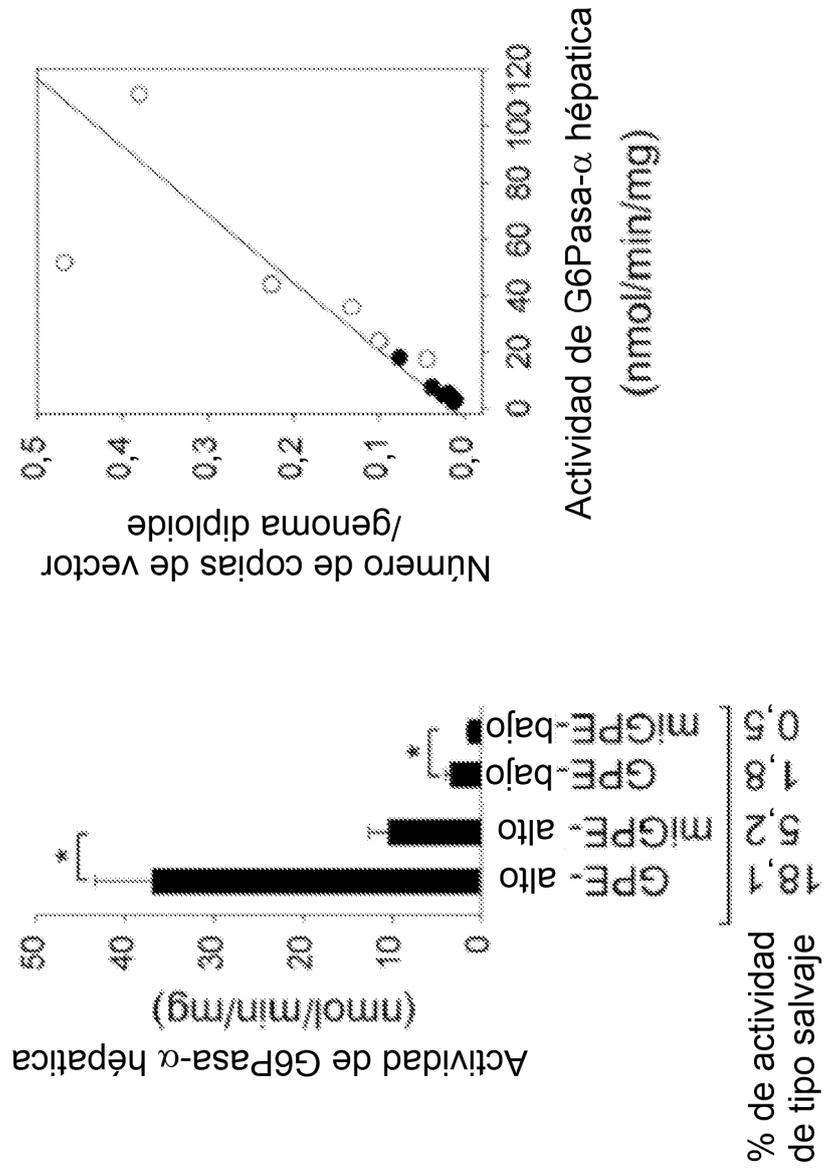


FIG. 6D

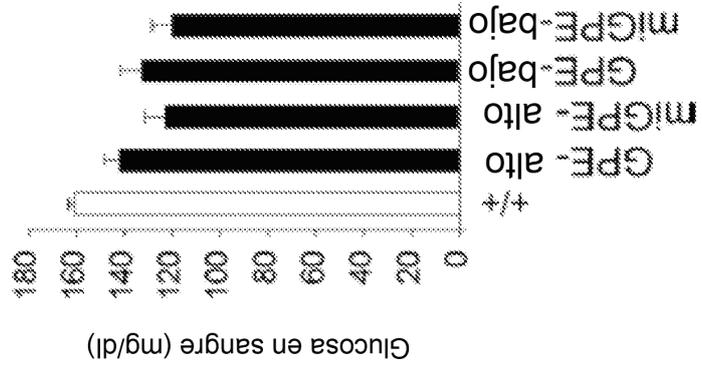


FIG. 6C

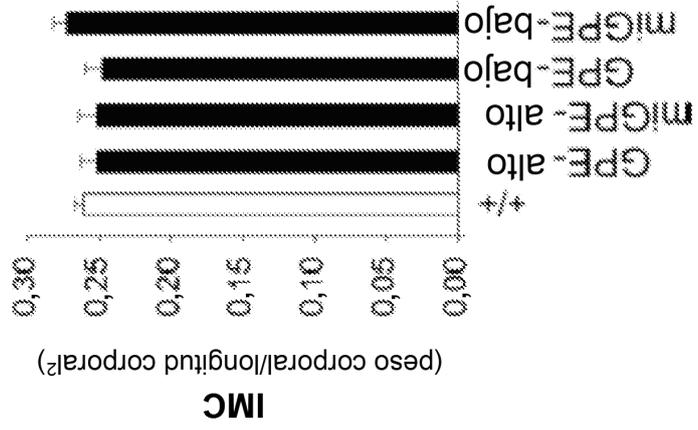


FIG. 6B

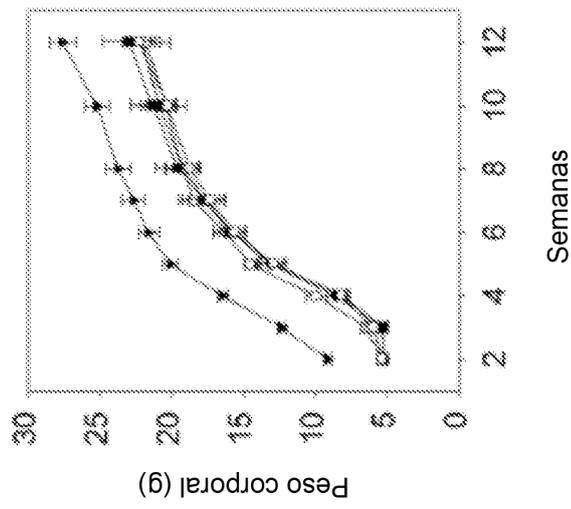


FIG. 7C

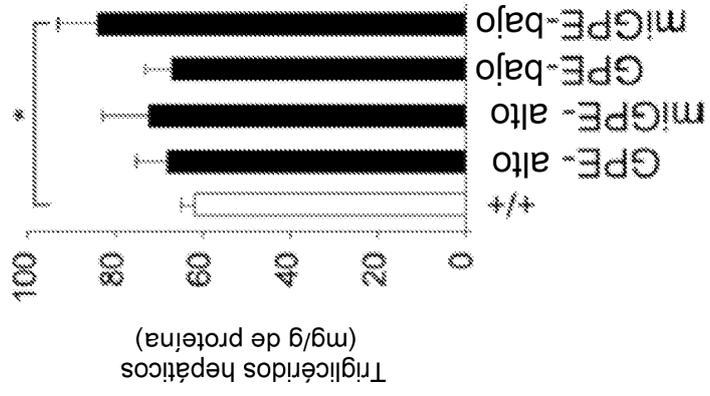


FIG. 7B

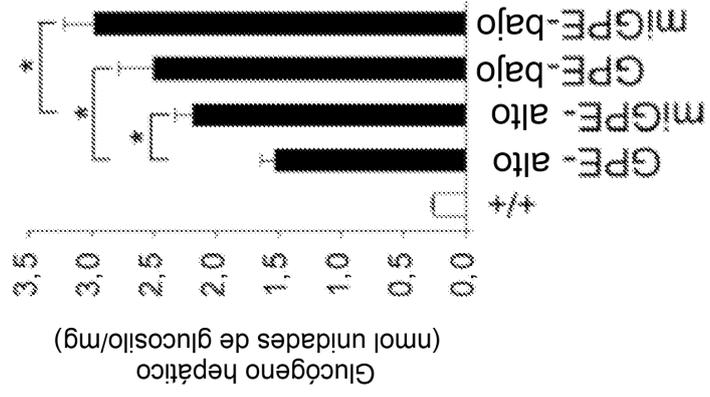


FIG. 7A

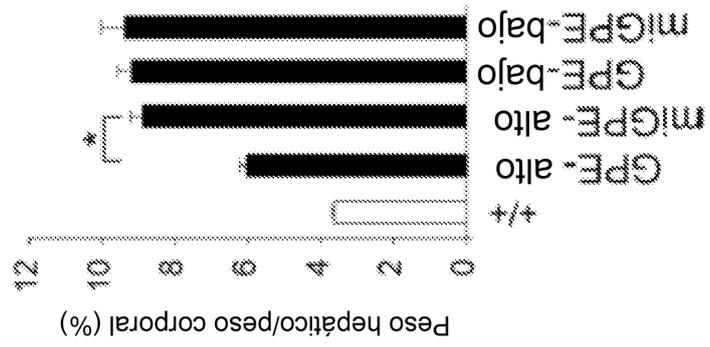


FIG. 8B

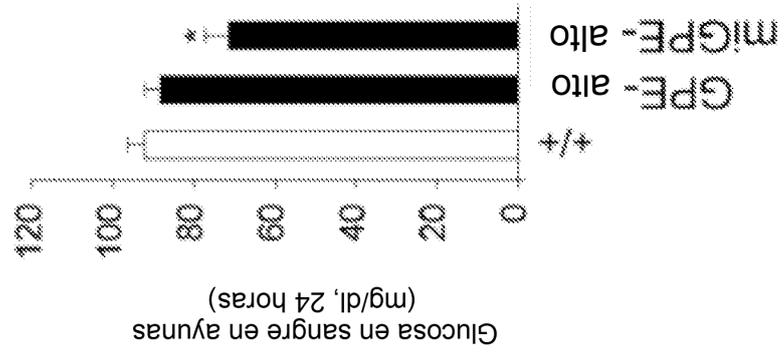


FIG. 8A

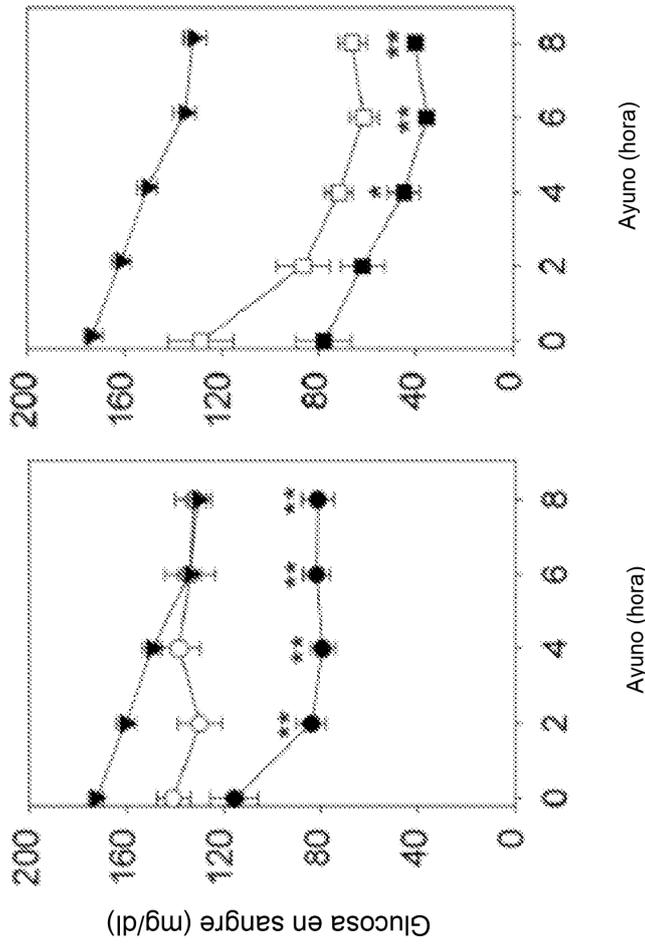


FIG. 8C

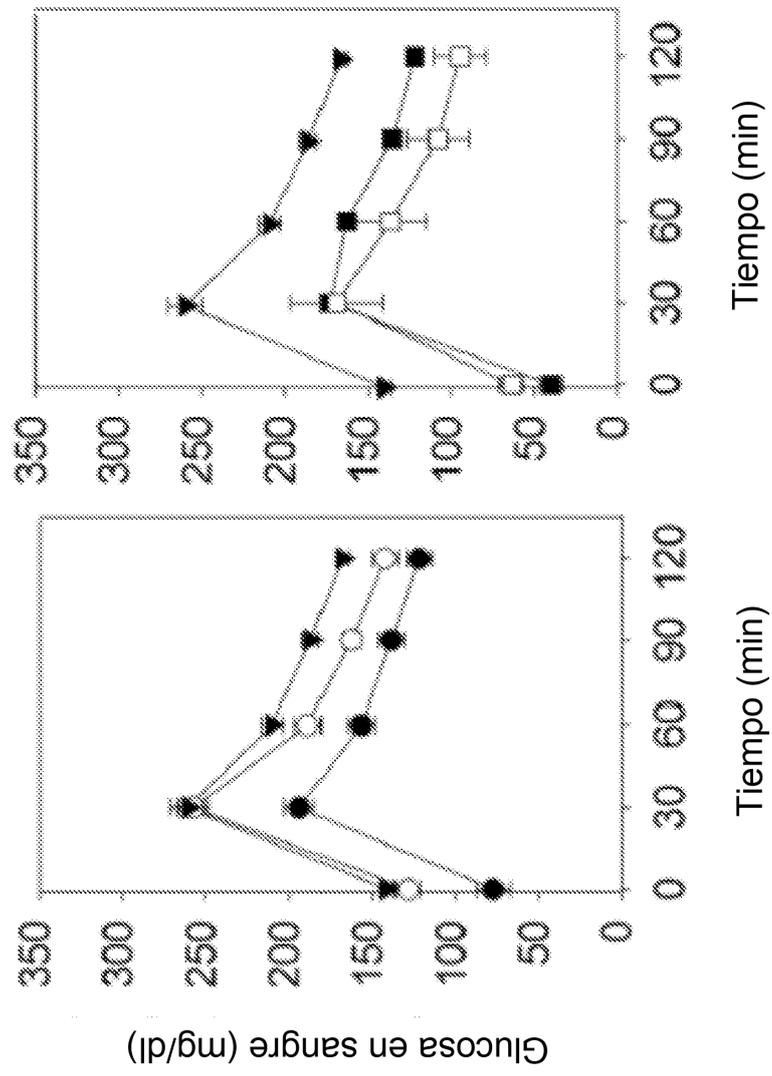


FIG. 9

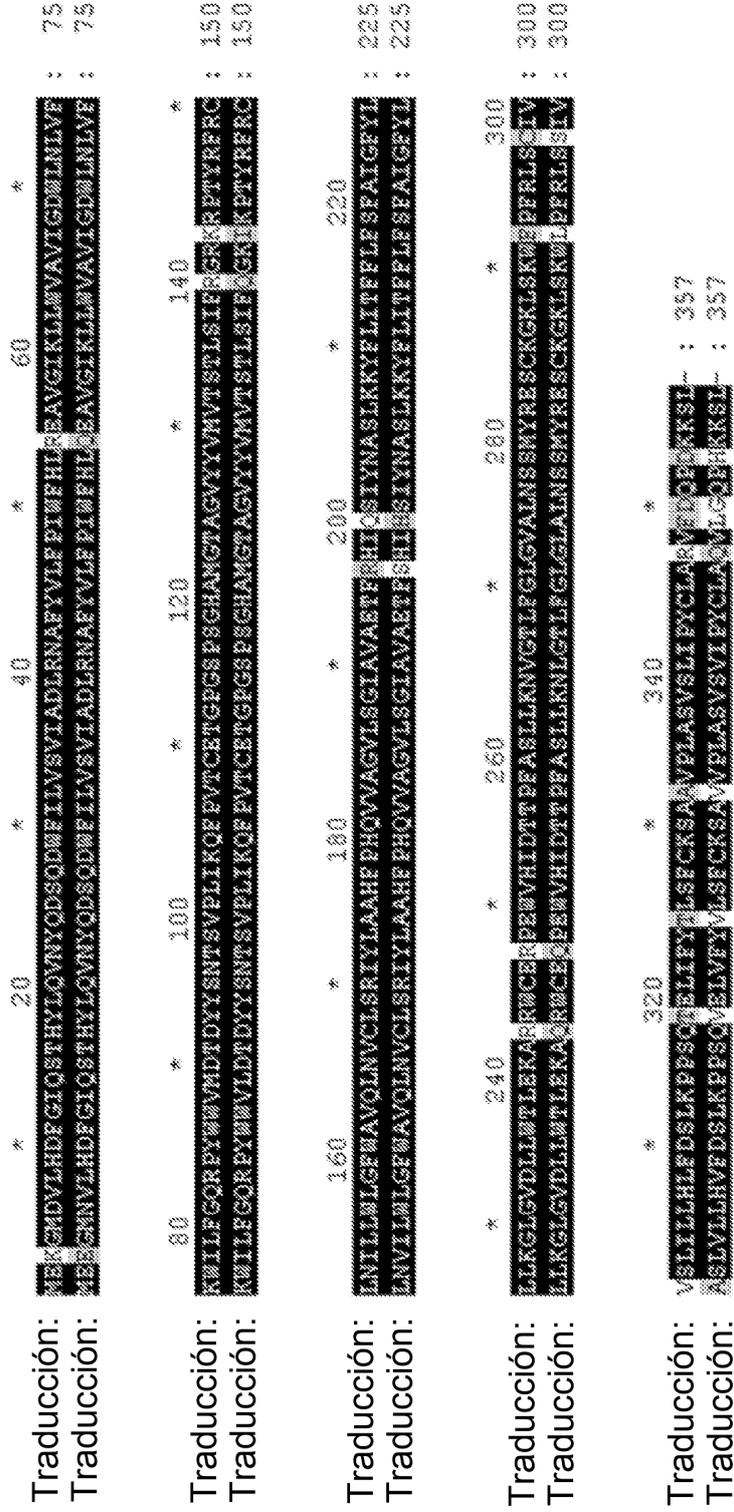


FIG. 10

Diferencia de aminoácidos entre G6Pasa- α humana, de ratón, de rata y canina

	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido
Humano	E3 (N)	Q54 (C1)	Q139 (C2)	S196 (H5)	H199 (C3)	Q242 (L3)	Q247 (L3)	L292 (H8)			
Ratón	E3	K54	R139	S196	H199	K242	R247	F292			
Rata	E3	Q54	R139	S196	H199	K242	R247	L292			
Perro	K3	R54	R139	R196	Q199	R242	R247	F292			
	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido
Humano	S298 (H8)	A301 (H8)	V318 (L4)	V324 (H9)	V332 (H9)	Q347 (C)	L349 (C)	G350 (C)			
Ratón	C298	A301	V318	I324	T332	R347	L349	G350			
Rata	C298	A301	I318	I324	T332	R347	L349	G350			
Perro	C298	V301	T318	T324	A332	R347	F349	D350			
	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido	Aminoácido
Humano	H353 (C)										
Ratón	H353										
Rata	H353										
Perro	D353										

H: Dominio helicoidal (H1 a H9)

N- Dominio N-terminal

C: Dominio carboxi terminal

L- Bucle: Bucle luminal

C-Bucle: Bucle citoplasmático (C1 a C4)

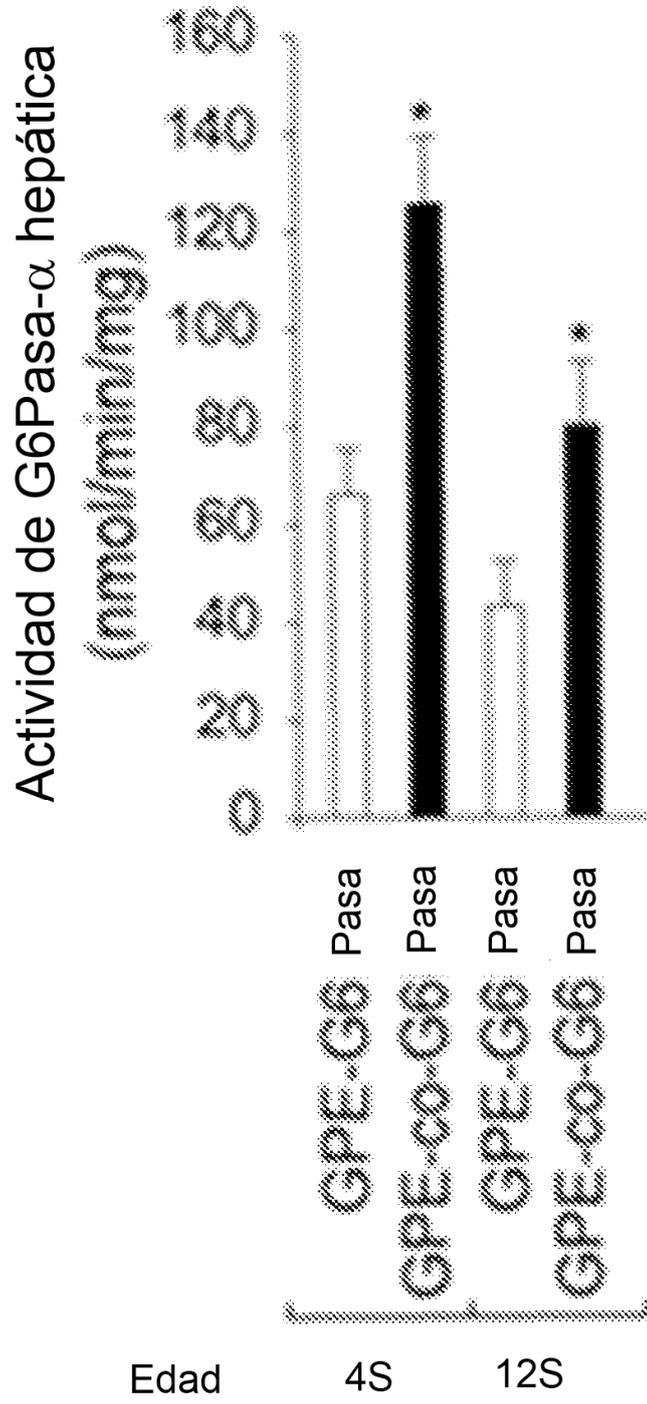


FIG. 11

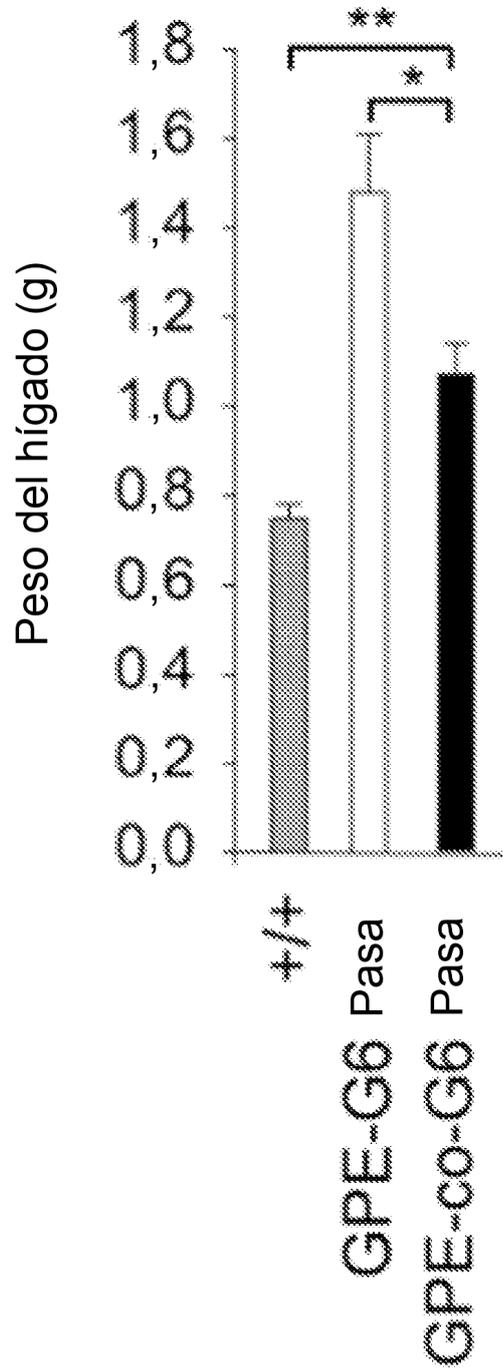


FIG. 12

